

jan 2-125639

50376  
1995  
379

30346  
1995  
379

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
FLANDRES-ARTOIS

N° Ordre:

Laurent KREMER

Thèse de Doctorat  
Sciences de la Vie et de la Santé

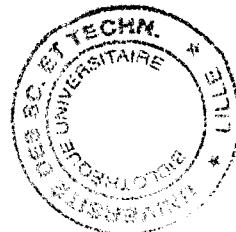
\*

DEVELOPPEMENT D'UN BCG RECOMBINANT  
EXPRIMANT LA GLUTATHION S-TRANSFERASE DE  
*Schistosoma mansoni* DANS LE CADRE D'UNE STRATEGIE  
VACCINALE CONTRE LA SCHISTOSOMIASE

\*

Présentée le 20 décembre 1995 devant la commission d'examen:

Président:	Pr. G. SPIK
Directeur de thèse:	Pr. A. CAPRON
Co-directeur de thèse:	Dr. C. LOCHT
Rapporteurs:	Dr. A. MERCENIER
	Pr. G. MARCHAL
Examinateur:	Pr. S. BALL



**Je dédie cette thèse  
à mes parents,  
à ma soeur,  
à ma famille,  
à tous mes amis,  
en témoignage de mon affection.**

**Ce travail a été réalisé en étroite collaboration entre le**

**Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire  
INSERM U167  
à l'Institut Pasteur de Lille,**

**sous la direction du Professeur A. CAPRON**

**et le**

**Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire  
INSERM CJF-9109  
à l'Institut Pasteur de Lille,  
1 rue du Pr. Calmette  
59019 LILLE,**

**sous la direction du Docteur C. LOCHT**

**A Monsieur le Professeur André CAPRON,**

Vous m'avez chaleureusement accueilli au sein de L'Institut Pasteur de Lille il y a 3 ans et vous m'avez permis d'y réaliser ce travail de recherche. Je vous exprime ici toute ma gratitude pour le soutien que vous m'avez apporté. Que cette thèse soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur le Docteur Camille LOCHT,**

Vous m'avez accepté dans votre groupe de recherche. Vous avez été à l'origine de ce travail que vous avez suivi quotidiennement avec compétence, vigilance, dynamisme et enthousiasme. Je vous remercie tout particulièrement pour l'aide que vous m'avez apporté, pour votre contribution à l'élaboration de ce travail, pour votre soutien et vos encouragements. Je vous en suis très reconnaissant.

**A Madame le Professeur Geneviève SPIK,**

Vous avez accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse. Je vous en remercie très vivement.

**A Madame le Docteur Annick MERCENIER,**

Vous portez un intérêt tout particulier aux domaines fascinants de la mycobactériologie et de la vaccinologie et me faites l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude. C'est aussi avec un très grand plaisir que je vous compte parmi les membres de ce jury.

**A Monsieur le Professeur Gilles MARCHAL,**

Pour l'honneur que vous me faites de juger l'ensemble de ce travail, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Steven BALL,**

Pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, je tiens à vous remercier très sincèrement.

**A Alain Baulard,**

Nous avons eu l'occasion de travailler longuement ensemble durant ces années. C'est toujours avec grand plaisir que j'ai aimé travailler avec toi et apprécié à la fois tes qualités scientifiques et humaines. Je voudrais également te remercier pour ta grande disponibilité et ta bonne humeur.

**A Messieurs les Docteurs Gilles Riveau et Jérôme Estaquier,**

Vous avez suivi ce travail depuis le début et m'avez apporté des conseils judicieux au cours d'échanges quotidiens particulièrement sympathiques. Veuillez accepter aujourd'hui mes très sincères remerciements.

Je tiens également à associer mes remerciements

A tous les membres du laboratoire MGM et du CIBP pour les précieux conseils qu'ils m'ont apporté, pour leur disponibilité et leur amitié. Sans eux, ce mémoire n'aurait pas vu le jour.

## RESUME

La bilharziose représente actuellement la deuxième endémie parasitaire au monde après le paludisme. Dans le but de réduire la pathologie et de limiter la transmission de la maladie, une protéine de 28 kDa produite par *Schistosoma mansoni* et possédant une activité glutathion S-transférase (Sm28GST) constitue un candidat vaccinal très prometteur.

Dans le cadre d'une démarche destinée à augmenter les potentialités vaccinales de la Sm28GST contre la bilharziose, nous avons développé un système basé sur l'utilisation d'un BCG recombinant exprimant la Sm28GST. Le BCG offre, en effet, de multiples avantages en tant que vecteur vaccinal. Il représente à l'heure actuelle le vaccin le plus administré chez l'homme, avec un taux d'effets secondaires relativement faible. Il peut être administré dès la naissance et engendre un免疫 durable pendant plusieurs années. Par ailleurs, il constitue un puissant adjuvant. L'objectif de ce travail à tout d'abord consisté à étudier et analyser la région promotrice de l'antigène 85A de *Mycobacterium tuberculosis* que nous avons alors utilisé pour exprimer et sécréter la Sm28GST chez le BCG. Cette souche recombinante est capable d'induire chez des souris une réponse cellulaire spécifique mais de faible intensité contre la Sm28GST. Par contre, des souris immunisées avec un BCG recombinant exprimant la Sm28GST sous forme cytoplasmique (sous contrôle du promoteur *hsp60* de BCG) développent une importante réponse humorale anti-Sm28GST. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'anticorps inhibant l'activité enzymatique de la Sm28GST, une particularité corrélée à une réduction de la fécondité des vers et de la viabilité des oeufs.

Les gènes conférant la résistance aux antibiotiques sont fréquemment utilisés pour sélectionner et maintenir le plasmide au sein de la bactérie. Malheureusement, l'usage de tels gènes n'est pas compatible avec la vaccination chez l'homme. Afin de contourner ce problème, nous avons développé un système de sélection basé sur la résistance aux composés mercuriels.

L'identification de promoteurs mycobactériens inductibles *in vivo* dans la cellule hôte infectée devrait permettre d'optimiser l'expression de protéines recombinantes dans le BCG. Dans ce but, nous avons développé un outil puissant basé sur l'utilisation de la "Green Fluorescent Protein" (GFP) chez le BCG. Ce marqueur est particulièrement intéressant puisqu'il nous a également permis de visualiser les mycobactéries fluorescentes au sein des macrophages infectés.

Afin d'éviter la perte du plasmide porté par le BCG recombinant dans l'organisme immunisé, nous avons développé un système génétique permettant la stabilisation de l'information exogène dans le chromosome du BCG par recombinaison homologue. L'intégration intrachromosomique d'un fragment d'ADN ne nécessite plus l'utilisation d'une pression de sélection continue. Cette méthodologie ouvre également la voie sur l'interruption de gènes mycobactériens, une technique particulièrement efficace pour déterminer la fonction de certaines protéines.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

- ADCC:** Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps  
**ADN:** Acide Désoxyribonucléique  
**ADNc:** Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
**AMPc:** Adénosine Monophosphate cyclique  
**ARNm:** Acide Ribonucléique messager  
**BCG:** Bacille de Calmette-Guérin  
**hCG $\beta$ :** sous-unité  $\beta$  de l'hormone Chorionique Gonadotrope humaine  
**CDC:** "Center of Disease Control"  
**CMH:** Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CTL:** Lymphocyte T Cytotoxique  
**DTH:** Hypersensibilité de type retardée  
**EPI:** Programme d'Immunisation Etendu  
**FABP-14:** Fatty Acid Binding Protein  
**GM-CSF:** Facteur Stimulant les Colonies de Macrophages et de Granulocytes  
**GSH:** Glutathion  
**GST:** Glutathion S-transférase  
**HSP:** Protéine de choc thermique  
**iNOS:** forme inducible de la NO-synthase  
**IFN- $\gamma$ :** Interféron gamma  
**Ig:** Immunoglobuline  
**IL:** Interleukine  
**IrV-5:** Irradiation-associated vaccine antigen  
**ISCOM:** "Immuno Stimulating Complex"  
**kb:** kilobase  
**kDa:** kilodalton  
**LAM:** Lipoarabinomannane  
**LAMP-1:** Lysosomal Membrane Protein  
**LBA:** Lavage Broncho Alvéolaire  
**LPS:** Lipopolysaccharide  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**pb:** paire de base  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PMN:** cellule polymorphonucléaire  
**PPD:** "Purified Protein Derivative"  
**PVD:** Pays en Voie de Développement  
**PZQ:** Praziquantel  
**RFLP:** "Restriction Fragment Length Polymorphism"  
**SIDA:** Syndrome d'Immunodéficience Acquise  
**Sb28GST:** Glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. bovis*  
**Sj26GST:** Glutathion S-transférase de 26 kDa de *S. japonicum*  
**Sm26GST:** Glutathion S-transférase de 26 kDa de *S. mansoni*  
**Sm28GST:** Glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni*  
**SEA:** antigènes solubles d'oeuf  
**Store:** "Selection Technique of Recombinant Events"  
**SWAP:** préparation d'antigènes solubles de ver  
**TetC:** fragment C-terminal de la toxine tétanique  
**Th1:** cellules T auxiliare de type 1  
**Th2:** cellules T auxiliare de type 2  
**TNF- $\alpha$ :** Facteur de Nécrose des Tumeurs alpha  
**TNF- $\beta$ :** lymphotoxine  
**TPI:** Triose Phosphate Isomérase  
**VIH:** Virus de l'immunodéficience humaine

Première partie:

**INTRODUCTION GENERALE**

# **Chapitre 1:**

## **La vaccination: généralités**

### **1-Un bref rappel historique**

Les premiers essais de prévention des maladies infectieuses remontent à plus de mille ans. C'est en effet en Inde et en Chine, que des pustules de malades faiblement atteints de variole étaient prélevées, séchées, réduites en poussières, puis inhalées. Les individus inoculés subissaient alors d'intenses fièvres mais se trouvaient protégés contre l'infection variolaire naturelle (Fenner *et al.*, 1988). La variolisation fut intensément pratiquée en Asie du sud-est et en Afrique du Nord durant les XVI<sup>o</sup> et XVII<sup>o</sup> siècles. C'est au cours du XVIII<sup>o</sup> siècle qu'elle se répandit en Angleterre puis dans le reste de l'Europe. En 1776, Jenner observa que la variole atteignait rarement les fermières qui étaient en contact permanent avec des vaches atteintes de variole bovine ou "cow-pox". Il inocula alors un extrait de pustule variolaire bovin chez un enfant. Quelques temps plus tard, Jenner surinfecta l'enfant par la variole humaine; celui-ci ne déclencha aucune maladie. Ainsi, l'inoculation d'une variole bénigne permettait d'éviter une variole grave.

Quatre-vingt années plus tard, Pasteur créa le premier vaccin humain développé en laboratoire, et proposa le terme de "vaccination". Ce vaccin était constitué de virus rabique vivant atténué par passage chez le lapin. En 1881, Pasteur produisit également le vaccin contre l'anthrax obtenu en cultivant la bactérie *Bacillus anthracis* à température élevée (42-43°C) (Mackett and Williamson, 1995).

Tableau 1:

<b>Les principaux vaccins utilisés actuellement et les vaccins expérimentaux ou en cours de recherche</b>			
	commercialisés	en cours d'essais cliniques	à l'état de recherche fondamentale ou d'essais chez l'animal
<b>vaccins anti-viraux</b>			
vivants atténués	* adénovirus * fièvre jaune * oreillons * poliomérite (oral) * rougeole * rubéole * vaccine	* cytomégalovirus * dengue * parainfluenza B * rotavirus * varicelle	* virus respiratoire syncitial * grippe
entiers inactivés	* grippe * encéphalite japonaise * polyomérite (injectable) * rage		* VIH * parainfluenza
protéines virales ou vaccin recombinant	* hépatite B * rage (chez l'animal)	* hépatite A * VIH * dengue * rougeole * herpès	* virus respiratoire syncitial * hépatite C * papillomavirus * Epstein-Barr
vaccin à ADN			* grippe * VIH * rougeole * hépatite B, etc
<b>vaccins anti-bactériens</b>			
anatoxines purifiées	* diphtérie * téтанos	* coqueluche	
bactéries atténuées	* tuberculose (BCG) * typhoïde	* choléra * typhoïde	* shigellose
bactéries inactivées	* typhoïde * choléra (injectable) * coqueluche	* lèpre * tuberculose	* shigellose
protéines et polysaccharides purifiés	* coqueluche * infection respiratoire à <i>Haemophilus influenzae</i> * méningocoque A et C * pneumocoque * typhoïde		* choléra (oral) * shigellose * typhoïde * tuberculose * maladie de Lyme * maladies sexuellement transmissibles

(d'après Leclerc, 1995)

En 1890, von Behring et Kitasato immunisaient des animaux avec la toxine diphtérique inactivée par traitement chimique. Un an plus tard, l'anti-sérum provenant de l'animal était utilisé pour traiter un enfant atteint de diphtérie. Il fallut cependant attendre 1923 pour que Ramon introduise le processus d'inactivation des toxines bactériennes par le formaldéhyde sans perte de leur immunogénicité. Ces "anatoxines" constituaient alors une nouvelle classe de vaccins (Brown *et al.*, 1993).

C'est également en 1923 que fut introduit en France le bacille de Calmette et Guérin (BCG) destiné à prévenir la tuberculose. Ce vaccin sera abordé plus en détail dans la suite de notre mémoire.

Après la seconde guerre mondiale, les techniques de culture cellulaire ont permis le développement d'un grand nombre de nouveaux vaccins viraux. L'immunogénicité d'un certain nombre d'antigènes a alors été découverte, grâce notamment aux progrès réalisés dans le domaine de la purification. C'est en 1955 que Jonas Salk produisit le poliovirus à l'aide de cellules de rein de singe en culture. Le vaccin était alors obtenu en inactivant le virus au formaldéhyde et était inoculé par voie intramusculaire. En 1957, Albert Sabin développa le vaccin polio oral en atténuant le virus par passages répétés sur des cellules en culture (Mackett and Williamson, 1995).

Un nouveau type de vaccin vit le jour avec l'éclosion des techniques de biologie moléculaire et du clonage de gènes dans des vecteurs recombinants. Ainsi, à l'aube du troisième millénaire, le vaccin contre l'hépatite B, préparé à partir de la protéine de surface S produite chez la levure, est aujourd'hui très largement utilisé. De nombreux autres vaccins recombinants dirigés contre des infections virales ou bactériennes sont actuellement en cours de développement et sont résumés dans le tableau 1. Un certain nombre de vaccins anti-parasitaires sont également à l'état de recherche ou en cours d'essais chez l'animal ou chez l'homme. Ces vaccins concernent aussi bien des parasitoses animales telles la coccidiose (Kazanji *et al.*, 1994) ou la schistosomiase bovine (Bushara *et al.*, 1993) que des parasitoses humaines telles le paludisme (Gonzalez *et al.*, 1994), la schistosomiase (Capron *et al.*, 1987b), la leishmaniose... Les connaissances

actuelles concernant la vaccination contre la schistosomiase seront abordées ultérieurement dans les chapitres 3 et 4.

Enfin, ces dernières années ont vu naître la vaccination génique (Ulmer *et al.*, 1993). Elle consiste à injecter les molécules d'ADN codant un antigène donné directement dans les tissus. Les cellules de l'hôte sont naturellement transfectées et la molécule d'ADN y est transcrive puis traduite en protéine, générant alors une réponse immunitaire pouvant conduire dans certains cas à la protection (Lowrie *et al.*, 1994). Cette nouvelle stratégie élimine les étapes de synthèse, de purification et de formulation de l'antigène.

La vaccination constitue actuellement l'arme la plus efficace pour prévenir des maladies infectieuses (Bloom, 1989). L'éradication de la variole a montré qu'une vaccination menée à bien pouvait constituer une défense absolue contre un agent infectieux. Ainsi, des vaccins dirigés contre la rougeole, la rubéole, l'hépatite B, la diphtérie, le tétanos etc... sont commercialisés et administrés à une large échelle dans les pays occidentaux (Tableau 1). Toutefois, les campagnes de vaccination sont souvent difficilement réalisables dans les pays en voie de développement (PVD). En 1974, seulement 5% des enfants des PVD étaient vaccinés. Au début des années 90, grâce aux efforts menés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et son "Expanded Programme for Immunization" (EPI), la proportion des enfants vaccinés est passée à 60%. Ce programme toujours en vigueur permet de prévenir la mort de 2 millions d'enfants chaque année (Bloom, 1989). Malheureusement, devant ces résultats très encourageants, force est de constater que les deux tiers de l'humanité restent exposés à des risques infectieux multiples, entraînant chaque année la mort de millions de personnes. Certaines maladies transmissibles très meurtrières, tel le Sida ou certaines infections parasitaires, continuent de s'étendre.

## **2-Les maladies transmissibles**

Les maladies transmissibles, qu'elles soient d'origine bactérienne, parasitaire ou virale, restent avec la malnutrition - à laquelle

<b>Cause de la mortalité</b>	<b>Nombre estimé de décès/an</b>
Infections respiratoires aiguës	6 900 000
Maladies diarrhéiques	5 000 000
Pneumonie	4 800 000
Tuberculose	3 000 000
Rougeole	1 500 000
Paludisme	1 000 000-2 000 000
Hépatite B	1 000 000-2 000 000
Tétanos	775 000
Coqueluche	500 000
Sida	200 000
Méningites bactériennes	200 000
Schistosomiase	200 000
Amibiases	40-110 000
Ankylostomiase	50-60 000
Rage	35 000
Typhoïde	25 000
Fièvre jaune	25 000
Maladie du sommeil	20 000

Tableau 2: les principales maladies infectieuses meurtrières en 1990. (D'après ASM News, 1990).

elles sont souvent associées - l'une des causes majeures de mortalité et de morbidité à l'échelle mondiale (Tableau 2).

De nombreuses maladies infectieuses peuvent actuellement être traitées par chimiothérapie. Cependant, dans de nombreux pays où les besoins thérapeutiques sont très élevés, les médicaments nécessaires ne sont pas disponibles de manière routinière. L'interruption brutale d'une médication entraîne souvent des phénomènes de résistance par exposition de l'agent infectieux à des concentrations subthérapeutiques en médicaments. Les thérapies sont de fait très longues et rendues difficiles à cause de l'émergence d'organismes résistants aux substances pharmaceutiques. Des modifications dans les pratiques sanitaires ont souvent été un facteur majeur dans la prévention de certaines maladies. Malheureusement, celles-ci peuvent être fortement limitées par des barrières culturelles, sociales ou économiques.

L'extraordinaire amélioration du niveau de santé collectif concerne surtout les pays industrialisés. Le problème de la lutte contre les maladies transmissibles concerne surtout les pays en voie de développement (PVD). A côté de problèmes nouveaux comme le Sida, l'enjeu des prochaines décennies concerne le contrôle vaccinal des maladies mortelles pour l'enfant. Cet enjeu justifie l'initiative d'un vaste programme international organisé par l'OMS (WHO, 1991). Sa réalisation comporte 3 objectifs:

Le premier concerne l'optimisation, à des fins d'utilisation dans les PVD, des vaccins actuels ayant démontré leur efficacité dans les pays industrialisés. Ce défi d'optimisation des vaccins vise à permettre, dans les pays où l'infrastructure est précaire, l'administration en dose unique d'une association de vaccins, ou mieux encore d'un vaccin multivalent.

Le second volet consiste à définir un vaccin favorisant la protection immunitaire des muqueuses, en particulier digestives et respiratoires, qui constituent les sites de pénétration de la majorité des agents infectieux.

Le dernier volet concerne la mise au point de vaccins nouveaux contre des affections bactériennes, comme les maladies diarrhéiques, des affections virales, comme les affections respiratoires aiguës et le Sida, et contre la totalité des maladies parasitaires. En dépit de leur incidence considérable sur la santé, aucun vaccin parasitaire efficace n'a pu à ce jour être élaboré.

C'est en particulier ce dernier volet qui sera abordé de manière plus approfondie dans ce mémoire, puisqu'il consiste dans l'élaboration et l'étude préliminaire d'une nouvelle stratégie vaccinale contre la schistosomiase, basée sur l'utilisation d'un BCG recombinant exprimant un antigène protecteur de l'helminthe.

### **3-Les grandes stratégies vaccinales**

Trois grandes catégories de vaccins sont actuellement utilisées ou en cours de développement:

- les vaccins inactivés
- les vaccins sous-unitaires
- les vaccins vivants

#### **3-1 Les vaccins inactivés**

Des bactéries ou des virus pathogènes généralement tués par la chaleur ou par des méthodes chimiques constituent la base des vaccins inactivés. Ils contiennent de nombreux antigènes et induisent souvent une réponse immunitaire chez l'ensemble des individus vaccinés. Cependant, malgré la rigueur de production, une variabilité des lots peut être observée (Bloom, 1989). De plus, le coût de production est majoré d'un surcoût de vérification de l'absence d'organismes viables dans les préparations. Certains vaccins de ce type, tel le vaccin anticoquelucheux constitué de *Bordetella pertussis* traitée au formol (Fulginiti, 1984), peuvent exprimer une toxicité ou une réactogénicité. D'autre part, les vaccins inactivés ne présentent pas toujours les antigènes dans une conformation qui assure une réponse immunitaire optimale (Cirillo *et al.*, 1995).

### **3-2 Les vaccins sous-unitaires**

L'utilisation des vaccins sous-unitaires repose sur la présentation au système immunitaire d'une partie seulement des composants d'un pathogène. Contrairement aux vaccins inactivés, les vaccins sous-unitaires sont chimiquement définis et leur fabrication est plus reproductible (Simpson, 1986). Les premiers vaccins sous-unitaires ont été purifiés au départ des agents pathogènes et détoxifiés si nécessaire (Cryz, 1991). Actuellement, grâce au génie génétique, les antigènes d'intérêt peuvent être produits chez des bactéries, des levures ou des cellules eucaryotes hétérologues. Les systèmes d'expression chez les eucaryotes sont particulièrement adaptés lorsqu'une modification post-traductionnelle est requise pour l'immunogénicité de la molécule (Michel *et al.*, 1984). Certains vaccins sous-unitaires peuvent également être de nature non protéique. Le vaccin dirigé contre la typhoïde est par exemple constitué d'un polysaccharide capsulaire de *Salmonella typhi* (Klugman *et al.*, 1987). Les vaccins sous-unitaires peuvent également être composés d'une ou de plusieurs molécules synthétisées chimiquement (Audibert *et al.*, 1981).

Comme pour les vaccins inactivés, plusieurs immunisations sont généralement nécessaires pour générer une réponse immune protectrice durable (Cirillo *et al.*, 1995).

Les vaccins sous-unitaires sont généralement associés à des adjuvants qui potentialisent les effets de l'antigène à induire une réponse immune plus forte et prolongée. L'utilisation d'adjuvants nécessite des quantités moindres d'antigène, diminuant ainsi les coûts de production du vaccin (Gupta and Siber, 1995). Pour la vaccination humaine, le choix de l'adjuvant reflète un compromis entre les propriétés adjuvantes et les effets secondaires. Les adjuvants les plus utilisés à l'heure actuelle chez l'homme sont l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium. Ces dernières années ont vu naître l'apparition et le développement de nouveaux types d'adjuvants tels que le muramyl dipeptide, le monophosphoryl lipide A, les liposomes (Buiting *et al.*, 1992) et les "Immuno Stimulating Complexes" (ISCOMs) (Kazanji *et al.*, 1994). Le contrôle du relargage de l'antigène permet de réduire le nombre de doses requises pour une vaccination optimale. Ce contrôle peut être réalisé à l'aide de microsphères constituées de polymères

biodégradables. Ces microsphères peuvent également être utilisées pour cibler des antigènes au niveau des surfaces mucosales (Gupta and Siber, 1995).

### **3-3 Les vaccins vivants atténusés**

Les vaccins vivants atténusés sont soit viraux, soit bactériens. L'atténuation d'un pathogène peut se faire de manière empirique par modification des conditions de culture ou par mutagenèse aléatoire. Dans ce cas, les mutations responsables de la perte de virulence ne sont généralement pas connues et peuvent poser le problème de la réversion vers un état de virulence (Faden, 1991) ou de réactogénicité (Walker, 1994). L'atténuation peut également se faire par génie génétique. Les mutations sont alors ciblées et choisies de façon à empêcher toute réversion vers un phénotype de virulence (Cirillo *et al.*, 1995). Ce type de vaccin présente l'avantage d'être produit à faible coût. Cependant, ces vaccins sont généralement assez sensibles à la chaleur et doivent donc être préservés au froid jusqu'à leur utilisation. Par ailleurs, ils peuvent quelque fois induire des infections chez des sujets normaux ou immunodéficients.

#### ***3-3-1 Les virus atténusés***

L'efficacité de protection du vaccin polio atténué est proche de 100%. L'OMS recommande l'administration orale de ce vaccin dès la naissance. Malheureusement, on relève l'apparition d'un cas de polio induit par le vaccin pour un million de personnes vaccinées (Faden, 1991). Dès lors, certains pays européens utilisent le vaccin polio inactivé qui semble apporter un taux de protection équivalent (Bottiger, 1981).

Un des vaccins vitaux atténusés les plus sûrs et les plus efficaces connus à ce jour est le 17D, dirigé contre la fièvre jaune. Une injection unique induit un taux d'anticorps suffisant dans 90 à 95% des cas et seulement de très rares complications sont recensées (Granström, 1991).

Le virus de la variole développé par Jenner en 1796 a permis d'éradiquer la variole de la surface de la terre. Suite à une vaste campagne mondiale de vaccination, l'OMS annonçait en 1980 la disparition complète de la maladie. Durant ces 10 dernières années, aucun cas de variole n'a été officiellement recensé de par le monde (Granström, 1991).

De nombreux autres vaccins viraux atténusés ont été développés tels que ceux contre la dengue (Granström, 1991), les affections à cytomégalovirus (Farrar *et al.*, 1986), adénovirus (Meiklejohn, 1983), etc.

### **3-3-2 *Les bactéries atténues***

Deux vaccins bactériens atténusés sont aujourd'hui enregistrés dans plusieurs pays, l'un étant dirigé contre la typhoïde, et l'autre contre la tuberculose.

#### **3-3-2-1 La salmonelle atténuee**

Le genre *Salmonella* compte de nombreux pathogènes intracellulaires pour l'homme et l'animal. Dans les PVD, la fièvre typhoïde causée par *Salmonella typhi* représente encore un important problème de santé pour les enfants et les jeunes adultes. Les risques de contagion existent également pour les voyageurs visitant ces régions. La protection obtenue à l'aide d'organismes vivants est générée par une réponse à la fois cellulaire et humorale (Germanier, 1972).

La mutagenèse chimique a permis d'isoler la souche atténuee *Salomonella typhi* Ty21a. Il s'agit d'un mutant incapable de convertir l'UDP-galactose en UDP-glucose (Germanier and Fürer, 1975). Cette souche est capable de coloniser l'intestin sans produire pour autant la maladie associée.

Bien que ce vaccin ait fait ses preuves en Egypte et au Chili pour protéger la population contre la fièvre typhoïde, il présente

deux inconvénients majeurs. D'une part, la mutagenèse chimique provoque généralement des mutations ponctuelles et les gènes mutés ne sont pas identifiés. Ainsi, le risque de réversion de la souche atténuée vers la virulence ne peut être écarté. Par ailleurs, trois immunisations orales de Ty21a sont généralement nécessaires pour conférer des taux de protection satisfaisants (Levine *et al.*, 1987).

Afin de contourner les éventuels risques de réversion générés par la mutagenèse chimique, des mutations ciblées ont été réalisées dans différents gènes, en particulier dans des gènes de biosynthèse des purines (*purA*) ou des acides aminés aromatiques (*aroA, C, D*) (Hoiseth and Stocker, 1981). Chez l'homme, une souche *purA* et *aroA* totalement avirulente persiste peu de temps dans l'organisme et est incapable de protéger l'individu à long terme. Cependant, de nouveaux mutants sont en cours de développement afin de pouvoir obtenir une souche atténuée mais capable de survivre suffisamment longtemps dans l'individu vacciné pour induire une immunité systémique ou mucosale suffisante (Chatfield *et al.*, 1992).

### 3-3-2-2 *Mycobacterium bovis* BCG

Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) est aujourd'hui le vaccin le plus administré à l'échelle planétaire. Selon l'OMS, approximativement 100 millions de nouveaux-nés et enfants ont reçu le BCG en 1992 (WHO, 1992). Il présente de nombreux avantages en tant que vaccin: il peut être administré dès la naissance; une seule inoculation engendre une réponse immune durable dans le temps; c'est un vaccin présentant relativement peu d'effets secondaires; il est relativement stable dans sa forme lyophilisée; il produit une cicatrice ce qui facilite sa surveillance épidémiologique; enfin, il est bon marché.

En plus de sa capacité à protéger contre la tuberculose, le BCG a également montré son caractère protecteur contre le lépre dans quatre essais cliniques réalisés en Asie, en Afrique et en Amérique Latine (Fine and Rodrigues, 1990). Cependant, en dépit de sa large utilisation et de ses nombreux avantages, le BCG reste actuellement un vaccin très controversé. Son efficacité protectrice varie fortement dans

différentes régions du globe et son impact contre la tuberculose reste encore peu clair (Verhoef, 1994).

Depuis le milieu des années 80, on assiste à une réémergence de la maladie dans les pays industrialisés et les PVD (Raviglione *et al.*, 1995). Le risque de tuberculose augmente particulièrement dans certaines populations, notamment chez les personnes atteintes de Sida (Drobniewski *et al.*, 1995). De plus, cette recrudescence est caractérisée par l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques (Heym et Cole, 1995). Devant l'urgence de la situation, on assiste à un véritable élan d'intérêt concernant l'étude de pathogénie du bacille tuberculeux et des mécanismes immunitaires impliqués dans la protection contre la tuberculose.

Depuis le début du siècle, il est toujours acquis qu'une vaccination efficace contre la tuberculose doit être effectuée avec des bactéries vivantes (Calmette et Guérin, 1911). C'est à cette époque que Albert Calmette et Camille Guérin développaient le BCG à l'Institut Pasteur de Lille. L'attention des deux savants s'était tournée vers une souche virulente de *Mycobacterium bovis*, l'agent étiologique de la tuberculose bovine. Ils observèrent qu'ils pouvaient empêcher l'agrégation bactérienne en inoculant les microorganismes dans un milieu de culture composé d'extraits de pommes de terre, de glycérine et de bile de boeuf. Après 39 passages successifs, ils observèrent un changement de la morphologie des colonies et constatèrent que le bacille avait perdu sa capacité d'induire la tuberculose chez l'animal. Ils procédèrent alors à différents tests pour évaluer la virulence résiduelle de la nouvelle souche atténuée. Durant les 13 années qui suivirent, Calmette et Guérin ne rapportèrent aucune réversion de virulence après infection de bovins, de cobayes, de souris, de macaques rhésus et de chimpanzés. Par contre, ils observèrent que l'administration du bacille atténué entraînait au bout de 30 jours une résistance à l'épreuve avec une souche de *M. bovis* virulente ou avec le bacille tuberculeux humain.

En 1921, le bacille atténué fut administré pour la première fois à un nouveau-né. Cet enfant était un sujet

à risque, puisque sa mère était morte de tuberculose et qu'il était destiné à vivre avec sa grand-mère, elle-même souffrante de la maladie. L'enfant grandit sans contracter la maladie. Il était prévenu contre la tuberculose (Calmette, 1927). En 1927, Calmette rapporta que sur 969 enfants exposés au bacille tuberculeux et vaccinés avec le BCG entre 1921 et 1927, seulement 3,9% moururent de la maladie alors que le taux de mortalité chez des enfants non vaccinés était de 32,6% (Calmette, 1927). En dépit de certaines controverses concernant ces évidences, la Ligue des Nations recommanda en 1928 l'utilisation étendue du BCG pour la prévention de la tuberculose (Greenwood, 1928).

## **4-Les vaccins vivants recombinants**

De nombreux obstacles freinent encore le développement de vaccins sous-unitaires et de vaccins vivants atténus efficaces et sans effets secondaires. Le coût élevé de production en quantité suffisante d'antigènes protecteurs constitue une des limites des vaccins sous-unitaires. La formulation de l'immunogène pour qu'il puisse être délivré d'une manière sûre et toujours promouvoir la réponse immune protectrice peut également poser problème. La plupart des systèmes basés sur de nouveaux véhicules vaccinaux permettent de minimiser ces problèmes. L'efficacité relative des vaccins fondés sur des molécules purifiées a amené certains chercheurs à proposer des stratégies semi-empiriques, utilisant entre autre des vaccins vivants recombinants comme vecteurs vaccinaux.

Les vaccins vivants possèdent la capacité d'induire de fortes réponses immunitaires cellulaires et humorales et sont souvent très efficaces. Le génie génétique offre la possibilité de modifier le patrimoine génétique de ces microorganismes pour en faire des vecteurs vaccinaux capables de produire un ou plusieurs antigènes hétérologues. Ces vecteurs vivants recombinants deviennent alors capables d'engendrer une immunité dirigée simultanément contre le ou les antigène(s) de plusieurs pathogènes. Ces vecteurs sont soit de type viral, soit de type bactérien.

#### **4-1 Vaccins viraux recombinants**

Les vaccins viraux présentent l'avantage de permettre l'expression d'antigènes eucaryotes correctement repliés et modifiés par la machinerie post-traductionnelle de la cellules infectée. Ils sont, par ailleurs, particulièrement adaptés pour développer des réponses cellulaires cytotoxiques.

##### ***4-1-1 Les poxvirus recombinants***

Le succès de l'éradication de la variole à l'aide du virus de la vaccine a suscité l'idée de manipuler génétiquement ce virus pour en faire un nouveau vecteur vaccinal. Aujourd'hui, plus d'une centaine de poxvirus recombinants ont été décrits. Ce type de vaccin est adapté pour la vaccination humaine et animale. Un virus recombinant exprimant la glycoprotéine G du virus de la rage a déjà montré son efficacité lors de campagnes de vaccination de renards en France et en Belgique (Brochier *et al.*, 1991).

Des souches fortement atténuées du virus de la vaccine (NYVAC) (Tartaglia *et al.*, 1992) ou d'un avipoxvirus (ALVAC) (Tartaglia, *et al.*, 1993) ont aussi été utilisées avec succès chez l'animal pour induire des réponses protectrices dirigées contre différents antigènes (Pincus *et al.*, 1995). Un certain nombre d'entre eux protègent l'animal contre l'épreuve avec le pathogène approprié (Pincus *et al.*, 1995). Une souche NYVAC recombinante exprimant la glycoprotéine G du virus rabique est d'ailleurs en phase I d'essais cliniques chez des volontaires humains (Pincus *et al.*, 1995).

##### ***4-1-2 Autres virus à ADN***

Les vaccins adénovirus sont utilisés avec succès pour vacciner les militaires américains contre certaines affections respiratoires (Meiklejohn, 1983). Les virus atténués sont administrés par voie orale ou nasale et n'entraînent pas de maladie ni d'effets secondaires majeurs. Dès lors, des adénovirus recombinants ont été développés pour

vacciner contre différents types d'infection (Randrianarison-Jewtoukoff and Perricaudet, 1995). Une immunité mucosale et une protection ont été obtenues après administration nasale à l'aide d'un adénovirus exprimant la glycoprotéine B du virus de l'herpès simplex (Gallichan *et al.*, 1993).

Des virus à ADN recombinants peuvent également être utilisés pour la vaccination vétérinaire. En effet, des mutants non transmissibles du virus pseudorabique du porc ont été modifiés génétiquement afin de protéger l'animal simultanément contre la maladie d'Aujeszky's et contre le choléra (van Zijl *et al.*, 1991)

#### **4-1-3 Les virus à ARN**

Le virus atténué de la polio est un des vaccins les plus puissants. La manipulation génétique de ce virus est rendue possible depuis que l'on sait que l'ADNc de l'ARN viral est infectieux et produit des particules virales après transfection cellulaire (Girard *et al.*, 1995). La capacité réduite du virus à accepter de l'information exogène et l'instabilité génétique des virus chimériques constituent cependant d'importantes limitations au développement de vaccins polio recombinants.

Le vaccin viral atténué contre la fièvre jaune est très efficace et n'entraîne que peu d'effets secondaires (Granström, 1991). Depuis le clonage de l'ADNc de la souche virale vaccinale 17D, il est devenu possible de développer des dérivés recombinants.

Le virus influenza est également utilisé pour la construction de vecteurs vaccinaux. Les manipulations génétiques du génome viral incluent notamment l'insertion d'épitopes dans les glycoprotéines du virus ou l'expression de polyprotéines (Garcia-Sastre and Palese, 1995). Des virus recombinants exprimant des épitopes B et T de divers pathogènes induisent chez les animaux des réponses humorales à la fois systémiques et locales et/ou des réponses T cytotoxiques spécifiques contre ces épitopes.

## 4-2 Les vaccins bactériens recombinants

Les vecteurs bactériens peuvent présenter au système immunitaire une large gamme d'antigènes, soit sous la forme sécrétée et associée à la paroi cellulaire, soit sous la forme cytoplasmique jusqu'au relargage au moment de la mort de la bactérie. De nombreuses espèces bactériennes sont actuellement en cours de développement pour évaluer leurs potentialités en tant que vecteurs vaccinaux vivants. Parmi elles, *Shigella flexneri* (Phalipon and Sansonetti, 1995), *Listeria monocytogenes* (Goossens *et al.*, 1995), *Vibrio cholerae* (Kaper *et al.*, 1989), *Yersinia enterocolitica* (Sory and Cornelis, 1990), *Streptococcus gordinii* (Medaglini *et al.*, 1995), et *Bordetella pertussis* (Renauld *et al.*, 1995), offrent des perspectives vaccinales intéressantes. Cependant, les deux candidats les plus étudiés actuellement sont *Salmonella* (Everest *et al.*, 1995) et le BCG (Gicquel, 1995).

### **4-2-1 Les salmonelles recombinantes**

Les souches de *Salmonella* sont fortement immunogènes par administration orale. Chez la souris, des mutants auxotropes de *Salmonella typhimurium* possédant une virulence réduite sont capables d'interagir avec les muqueuses, de persister et de se répliquer dans les plaques de Peyer qui présentent les antigènes aux sites inducteurs du système immunitaire sécrétoire. Les bactéries sont alors véhiculées par les macrophages jusqu'au foie, la rate et les ganglions lymphatiques régionaux. Ainsi, ces souches atténuées sont capables de stimuler à la fois une réponse immunitaire locale et systémique et constituent donc des vecteurs intéressants pour l'expression d'antigènes hétérologues (Everest *et al.*, 1995).

Dans ce but, de nombreuses souches recombinantes de salmonelles atténuées ont été développées pour induire une réponse immune contre des virus (Hopkins *et al.*, 1995), des parasites (Khan *et al.*, 1994a) ou des bactéries (Oyston *et al.*, 1995). Les différents travaux réalisés chez la souris indiquent que les souches atténuées recombinantes induisent à la fois une réponse cellulaire et/ou une réponse humorale contre les différents antigènes hétérologues (Flynn *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1994a). Un problème majeur souvent rencontré avec *Salmonella*

consiste à créer une souche atténuée capable de coloniser et de se multiplier dans l'organisme sans générer d'effets indésirables. Certaines souches de *S. typhimurium* sont trop atténuées pour survivre longtemps dans l'hôte et n'induisent pas de réponse protectrice efficace (O'Callaghan *et al.*, 1988).

Chez l'homme, un double-mutant de *Salmonella typhi* possédant des délétions dans les gènes *aroC* et *aroD* (souche CVD 908) a été développé et testé sur des volontaires comme vaccin oral contre la fièvre typhoïde (Tacket *et al.*, 1992). Devant les résultats encourageants obtenus, Gonzalez *et al.* (1994) ont construit une souche CVD 908 recombinante exprimant la protéine CS de *Plasmodium falciparum*. Testée chez l'homme, cette souche était capable d'induire une réponse humorale ou cellulaire CD8<sup>+</sup> contre l'antigène recombinant (Gonzalez *et al.*, 1994).

#### **4-2-2 Le BCG recombinant**

Le BCG est le vaccin bactérien vivant actuellement le plus utilisé au monde avec une incidence d'effets secondaires graves relativement faible. Ses propriétés intrinsèques ainsi que les connaissances acquises au cours de ces dernières décennies à travers la vaccination antituberculeuse font de lui un candidat vaccinal particulièrement intéressant. Cependant, du fait de la complexité de sa paroi et de sa faible vitesse de croissance, le BCG a pendant longtemps été réfractaire aux techniques de biologie moléculaire. Les premières manipulations génétiques de cet organisme datant de la fin des années 80, donnaient lieu à des résultats très encourageants (Jacobs *et al.*, 1991).

La  $\beta$ -galactosidase fut la première protéine recombinante exprimée chez le BCG (Stover *et al.*, 1991). Le gène codant la  $\beta$ -galactosidase a été cloné dans un plasmide navette autoréplicatif ou intégratif sous la dépendance des signaux d'expression du gène *hsp60* de BCG. Une réponse humorale spécifique élevée et durable a été observée après immunisation de souris avec ces BCG recombinants (Stover *et al.*, 1991). Parallèlement, la réponse cellulaire CD4<sup>+</sup> a été évaluée par dosage d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produit au cours de la restimulation *in vitro* avec la  $\beta$ -

galactosidase des cellules spléniques provenant de souris immunisées (Stover *et al.*, 1991). Une réponse T cytotoxique a également pu être détectée au cours de ces expériences (Stover *et al.*, 1991). L'expression de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur PAN de *M. paratuberculosis* induit également une réponse humorale et cellulaire dans les souris immunisées (Murray *et al.*, 1992). Depuis lors, les promoteurs des gènes *hsp60*, *hsp70*, PAN ou *PblaF\** ont permis d'exprimer chez le BCG le fragment C-terminal de la toxine tétanique (TetC) (Stover *et al.*, 1992), de différents antigènes du VIH (Aldovini and Young, 1991; Winter *et al.*, 1991) ou du VIS (Yasutomi *et al.*, 1993; Winter *et al.*, 1995), de la protéine CS de *Plasmodium falciparum* (Haeseleer *et al.*, 1993), de la gp63 de *Leishmania major* (Connell *et al.*, 1993; Abdelhak *et al.*, 1995), de l'antigène OspA de *Borrelia burgdorferi* (Stover *et al.*, 1993; Langermann *et al.*, 1994a), de l'antigène PspA de *Streptococcus pneumoniae* (Langermann *et al.*, 1994b).

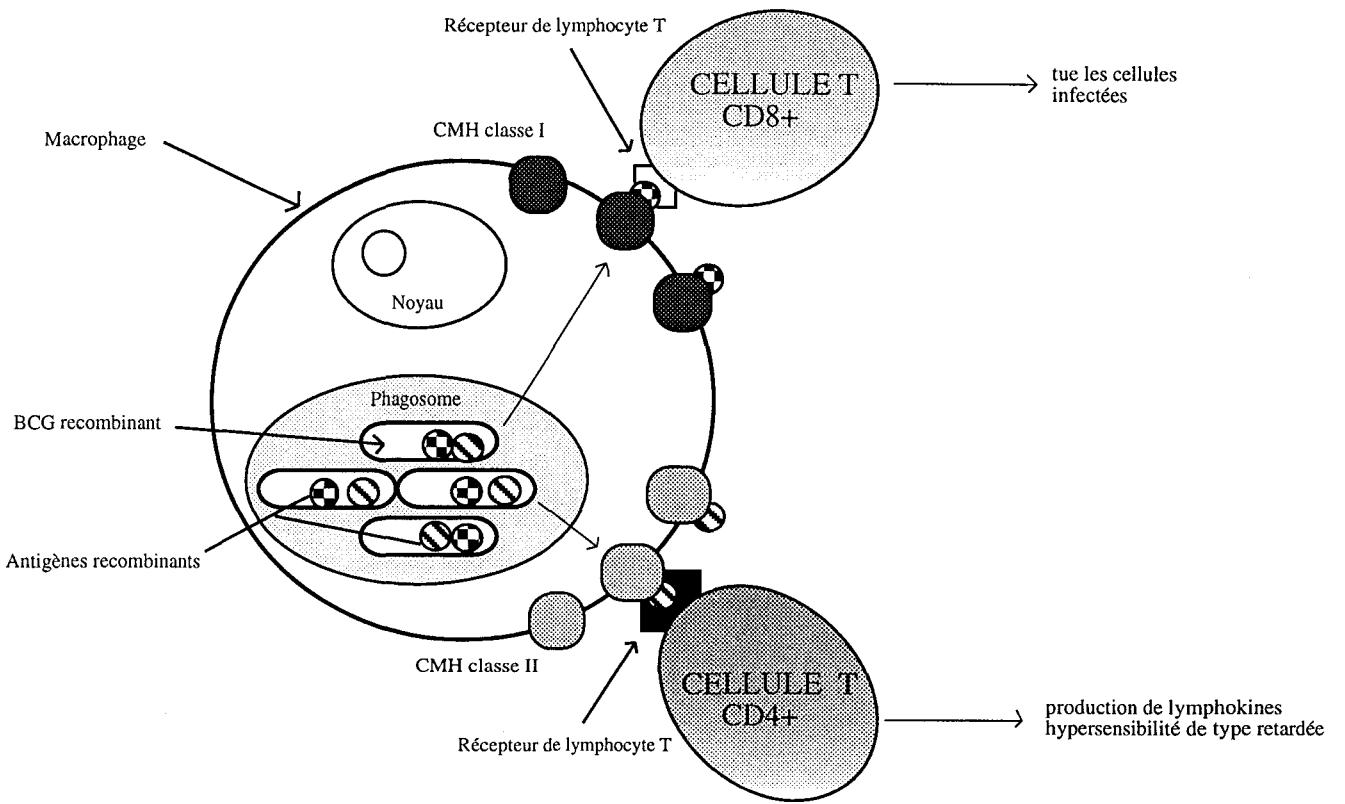
L'induction de réponses immunes induites par des BCG recombinants sécrétant des antigènes hétérologues à l'aide de signaux mycobactériens a également été évaluée pour OspA (Stover *et al.*, 1993), PspA (Langermann *et al.*, 1994b) et la boucle V3 du VIH (Kameoka *et al.*, 1994).

Plusieurs de ces études ont déjà montré l'efficacité protectrice du BCG recombinant chez des souris vaccinées avec les souches exprimant la gp63 de *L. major*, OspA de *B. burgdorferi*, PspA de *S. pneumoniae*.

De plus, le BCG représente un moyen efficace pour induire une réponse sécrétoire lorsqu'il est administré par voie nasale. La vaccination par voie nasale avec un BCG exprimant OspA s'accompagne à la fois d'une réponse protectrice systémique prolongée et d'une importante réponse mucosale spécifique (Langermann *et al.*, 1994a).

#### 4-3 Principe de la réponse immunitaire basée sur l'utilisation d'un vecteur vivant

L'un des mécanismes fondamentaux de la vaccination repose sur la reconnaissance des antigènes du vaccin par le système



**Figure 1:** le BCG comme vecteur vivant recombinant. Le BCG peut être utilisé comme vecteur vaccinal pour induire simultanément des réponses immunes contre toute une variété de maladies. Pour cela, les gènes codant pour des antigènes provenant de divers pathogènes (bactériens, parasitaires ou viraux) seraient clonés dans des vecteurs d'expression mycobactériens.

immunitaire, notamment par les lymphocytes T (Figure 1). Ce processus de reconnaissance des antigènes diffère selon que le lymphocyte T impliqué soit auxiliaire ( $CD4^+$ ) ou cytotoxique ( $CD8^+$ ). Dans le premier cas, les antigènes recombinants produits par le vecteur vivant subissent une dégradation partielle dans des compartiments spécialisés du macrophage. Les peptides ainsi produits (13-30 acides aminés) sont alors associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Puis le complexe peptide-CMH est transporté à la surface de la cellule et reconnu par les récepteurs des lymphocytes T auxiliaires spécifiques (Harding, 1995). L'activation de ces cellules aboutit finalement à la production de lymphokines capables de stimuler notamment des cellules B pour la production d'anticorps spécifiques contre l'antigène et au développement d'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH). Dans le cas de l'activation d'une cellule T cytotoxique, les peptides produits (8 à 10 acides aminés) sont transportés dans le réticulum endoplasmique, où ils s'associent aux molécules du CMH de classe I (Harding, 1995). Celles-ci migrent avec le peptide à la surface de la cellule infectée, où elles présentent le peptide antigénique aux récepteurs spécifiques des cellules cytotoxiques. L'activation de ces cellules aboutit à la destruction des cellules infectées.

# **Chapitre 2:**

## **Les mycobactéries**

### **1-Taxonomie et nomenclature des mycobactéries**

Le nom générique *Mycobacterium* a été donné par Lehmann et Neumann en 1896, incluant alors les bacilles responsables de la tuberculose et de la lèpre. Depuis, le genre n'a cessé d'augmenter et compte actuellement plus de 70 espèces différentes (Shinnick and Good, 1994). Le genre *Mycobacterium* appartient à la Famille des *Mycobacteriaceae*, à l'Ordre des *Actinomycetales* et la Classe des *Actinomycètes*.

Les membres du genre *Mycobacterium* sont aérobies ou microaérophiles, ayant la forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés. Les mycobactéries sont des Gram-positives, résistantes à la décoloration après un traitement acido-alcoolique, non motiles, ne formant ni capsule ni endospore, et possédant un contenu en Guanine + Cytosine compris entre 60 et 70 %. Elles sont généralement classées en deux catégories: les espèces à croissance rapide et les espèces à croissance lente. Les mycobactéries à croissance rapide forment des colonies visibles sur boîte en moins de 7 jours dans des conditions optimales de température et de nutrition. Les bactéries à croissance lente requièrent 7 jours ou davantage pour former des colonies visibles dans des conditions de culture comparables. Les optima de

température de croissance pour les différentes espèces de chacune des catégories se situent approximativement entre 28°C et 45°C.

### 1-1 Les mycobactéries à croissance lente

A l'intérieur de chacune des deux catégories, les mycobactéries sont rassemblées en "complexes". Les complexes les plus connus sont les complexes *M. tuberculosis*, *M. avium/intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. terrae*. Une dernière famille renferme des espèces nécessitant des conditions de croissances spéciales: on y trouve notamment *M. lepramurium*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis* et *M. haemophilum*.

Le complexe *M. tuberculosis* est composé de *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluant le BCG), *M. africanum* et *M. microti*. *M. tuberculosis* est l'espèce mycobactérienne à croissance lente la plus étudiée. Elle est responsable de la tuberculose, la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique. La distinction phénotypique entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum* reste difficile à faire. *M. microti* est une espèce très proche mais pathogène seulement pour l'animal (Shinnick and Good, 1994).

### 1-2 Les mycobactéries à croissance rapide

De la même façon, les mycobactéries à croissance rapide sont rassemblées en "complexes". On y trouve notamment le complexe *M. fortuitum* (*M. fortuitum*, *M. chelonae*), le complexe des espèces non photochromogéniques (*M. agri*, *M. chitae* et *M. smegmatis*), le complexe *M. parafortuitum* etc.

Les mycobactéries à croissance rapide, en particulier du complexe *M. fortuitum*, peuvent également causer des maladies chez l'homme, telles que des méningites, des endocardites, des maladies pulmonaires ou des abcès (Ingram *et al.*, 1993).

Certaines mycobactéries à croissance rapide sont également des constituants de la flore intestinale humaine (*M. flavesiens*), du sol (*M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. agri*), de l'herbe (*M. phlei*) (Wayne and Kubica, 1986). Les mycobactéries commensales à croissance rapide peuvent aussi s'avérer être de dangereux pathogènes nosocomiaux.

*M. smegmatis*, rarement associé à des pathologies humaines, constitue un organisme de tout premier ordre pour la mise au point d'outils moléculaires. Un mutant hautement transformable (Snapper et al., 1990) est particulièrement utile pour évaluer rapidement les constructions génétiques avant leur transfert chez le BCG ou toute autre mycobactérie à croissance lente (Jacobs and Bloom, 1994).

### 1-3 Les mycobactéries pathogènes

#### **1-3-1 Lèpre et tuberculose**

Parmi les mycobactéries pathogènes, *M. leprae* et *M. tuberculosis* occupent les premières places.

*M. leprae* ou bacille de Hansen est l'agent étiologique de la lèpre, une maladie très ancienne qui continue ses ravages sur des millions de personnes. Cette mycobactérie a été découverte en 1873 par Hansen et constitue la première bactérie associée à une maladie humaine. *M. leprae* est un parasite intracellulaire obligatoire qui ne peut être cultivé que dans des organismes vivants, par exemple dans les coussinets plantaires de souris ou dans le foie de tatou (Young and Cole, 1993). La lèpre peut être soignée par des antibiotiques dont les plus utilisées sont la rifampicine et la dapsone.

*M. tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose humaine. Les infections par *M. bovis*, agent de la tuberculose bovine, sont actuellement rares en France (0,5 à 1 % des cas). Les infections par *M. avium*, agent d'une tuberculose des oiseaux, sont très rares chez les sujets n'ayant pas de déficit immunitaire. Par contre, *M. africanum*, un

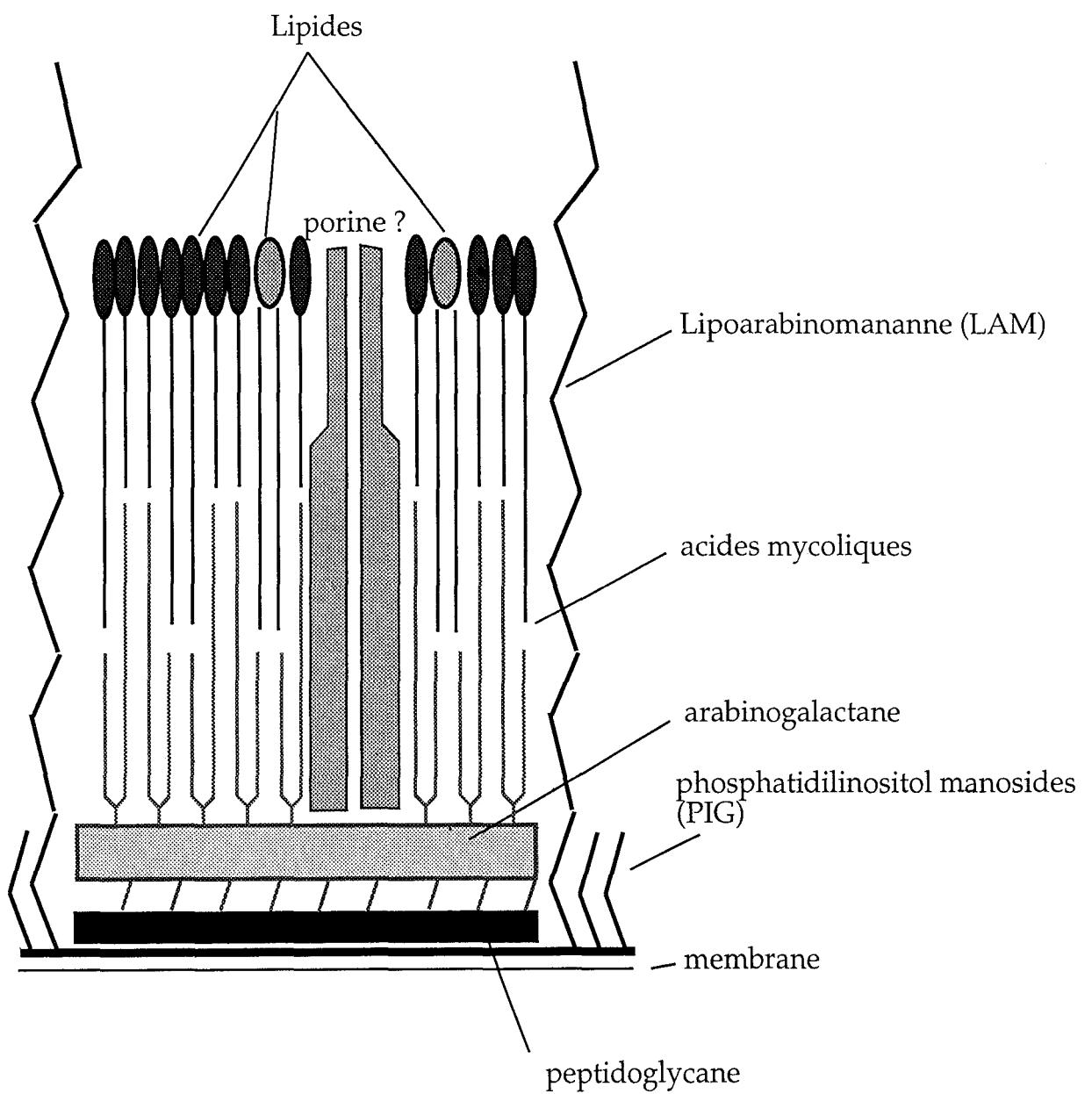
variant intermédiaire entre *M. tuberculosis* et *M. bovis*, est particulièrement fréquent en Afrique (Marchal, 1995).

La tuberculose est, elle aussi, attestée aux temps les plus anciens. Une étude très récente a permis d'identifier un fragment d'ADN spécifique de *M. tuberculosis* dans une momie péruvienne âgée de plus de mille ans (Salo *et al.*, 1994). Cette découverte rapporte donc l'existence de la tuberculose humaine dans le Nouveau Monde avant l'arrivée des Européens. En Europe, c'est au XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles que la maladie, appelée phtisie ou peste blanche, atteint son sommet. Il y a un demi-siècle, après la seconde guerre mondiale, l'utilisation du BCG et de médicaments efficaces diminua fortement l'incidence de la tuberculose dans nos régions. Au milieu des années 80, certains pays ont soudainement vu le nombre de nouveaux cas augmenter continuellement (Bloom and Murray, 1992). D'autre part, dans les PVD, la tuberculose a toujours été et reste aujourd'hui une cause majeure de décès.

### **1-3-2 Pathogénie de la tuberculose**

L'infection par le bacille tuberculeux commence le plus souvent par l'inhalation des bacilles présents en suspension dans l'air après avoir été émis par la toux ou l'éternuement d'un sujet contagieux (Marchal, 1993). Après avoir gagné le tractus respiratoire, les bacilles sont internalisés par les macrophages alvéolaires. Une rapide croissance intracellulaire a lieu et un recrutement de cellules inflammatoires débouche sur la formation de granulomes dans les poumons et dans les autres organes infectés. Les lésions pulmonaires causées par la réaction granulomateuse évoluent vers la cavitation et la propagation des bactéries. Ces réactions s'accompagnent souvent d'une fibrose importante, et les lésions sont décelables par radiographie pulmonaire (Marchal, 1993).

Initialement, les régions contenant les bactéries qui se multiplient possèdent une consistance épaisse (nécrose caséuse). Au fur et à mesure de la multiplication bacillaire et de l'entrée des phagocytes au niveau de ces zones, les régions nécrotiques deviennent de plus en plus



**Figure 2:** Modèle structural de la paroi mycobactérienne. Adapté d'après Jarlier and Nikaido (1994).

liquides. Ainsi, l'on comprend pourquoi des personnes avec des lésions "liquéfiées" sont beaucoup plus contagieuses que les personnes aux lésions nécrotiques. La consistance épaisse des nécroses caséuses empêche le mouvement et la dissémination des bactéries hors des lésions. Au contraire, les bactéries des lésions à consistance liquide s'échappent beaucoup plus facilement, et se disséminent à travers l'ensemble de l'organisme (Salyers and Whitt, 1994).

Certaines lésions anciennes peuvent toujours renfermer des bactéries vivantes. *M. tuberculosis* possède la capacité inhabituelle de survivre pendant plusieurs décennies dans de telles lésions. Plus tard, sous l'effet d'une immunodépression (cancer, substances immunosuppressives, Sida...), la bactérie s'échappera de ces lésions pour se multiplier à nouveau. Cette forme réactivée de la tuberculose est identique à la tuberculose primaire en termes de symptômes et d'infectiosité.

## **2-Structure de la paroi mycobactérienne**

A la différence des autres bactéries Gram-positives, la paroi des mycobactéries n'est pas seulement constituée de peptidoglycane mais contient également des glycolipides inhabituels (Brennan and Nikaido, 1995). Cette structure rend la mycobactérie réfractaire à la coloration de Gram. Une coloration caractéristique des mycobactéries est réalisée à l'aide du réactif de Ziehl-Neelsen.

La structure chimique du peptidoglycane des mycobactéries est très semblable à celle des autres genres bactériens. Le peptidoglycane est relié par liaison phosphodiester à des chaînes polysaccharidiques d'arabinogalactane dont les extrémités sont estérifiées par des acides gras de haut poids moléculaire (les acides mycoliques). Les tailles (60 à 90 atomes de carbone) et les structures des acides mycoliques sont propres aux mycobactéries (Brennan and Nikaido, 1995). Le squelette de cette paroi est donc constitué d'une structure de type "peptidoglycane-arabinogalactane-mycolate" (Figure 2). Associée à ce squelette, on trouve une gamme variée de lipides et de glycolipides, dont le Lipoarabinomannane (LAM) (Brennan and Nikaido, 1995). Ces lipides diffèrent considérablement selon les espèces

de mycobactéries. Les lipides représentent jusqu'à 10% du poids total de la mycobactérie. La complexité et la richesse en lipides de la paroi mycobactérienne protègent vraisemblablement la bactérie contre l'action bactéricide de certains composants du macrophage.

D'autre part, la paroi mycobactérienne stimule fortement le système immunitaire. La portion lipidique de la paroi augmente de manière importante la réponse humorale dirigée contre des antigènes. Elle constitue de ce fait un ingrédient actif de l'adjuvant complet de Freund.

La paroi mycobactérienne contient également des protéines. Certaines de ces protéines sont destinées à être sécrétées. D'autres sont impliquées dans la synthèse des polymères de la paroi. Enfin, des porines ont été décrites chez *M. chelonae* (Trias *et al.*, 1992). Chez les bactéries Gram-négatives, les porines forment un canal hydrophile à travers la membrane externe pour permettre le passage de solutés de petites tailles. Chez *M. chelonae*, elles sont présentes en assez faibles quantités, ce qui est en accord avec la faible perméabilité de la paroi vis-à-vis de molécules hydrophiles (Trias and Benz, 1993). Une protéine de 23 kDa homologue à la protéine OmpF d'*E. coli* a pu être mise en évidence dans la paroi de *M. tuberculosis* H37Ra (Hirschfield *et al.*, 1990).

### **3-Protéines et antigènes mycobactériens**

#### **3-1 La tuberculine**

Moins de 10 ans après la découverte de *M. tuberculosis*, Koch rapporta des essais de purification d'un composé relargué dans le milieu de culture (Koch, 1891). Ce produit est un concentré inactivé par la chaleur des constituants sécrétés d'une culture âgée de 8 semaines. Koch pensait initialement que ce produit était utilisable pour le traitement de la tuberculose (Koch, 1897). Cette idée a par la suite été abandonnée, mais Koch fit l'observation importante que ce produit était capable de générer une réaction caractéristique 24 à 48 heures après son injection par voie sous-cutanée chez des sujets atteints de tuberculose. Il suggéra alors que ce produit, qu'il baptisa tuberculine, puisse être utilisé dans le diagnostic d'infections tuberculeuses. Cette réaction cutanée est aujourd'hui appelée

réaction d'hypersensibilité de type retardée (DTH). En 1932, Seibert et Munday montraient que le principe actif de la tuberculine est présent dans un précipité de sulfate d'ammonium obtenu à partir de filtrats de culture (Seibert and Munday, 1932). Ce matériel a alors été appelé "tuberculin purified protein derivative" (PPD) et représente encore actuellement un outil diagnostique et épidémiologique extrêmement important. Même si les méthodes de fabrication diffèrent d'un producteur à l'autre, le PPD consiste toujours en un ensemble de protéines libérées dans le milieu de culture de *M. tuberculosis* maintenu en phase stationnaire depuis 2 à 3 mois. Ces protéines sont obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium ou à l'acide trichloracétique d'une culture inactivée à la chaleur (2 heures à 120 °C) et filtrée.

De nombreuses protéines mycobactériennes sont bien conservées dans le genre *Mycobacterium* mais également dans de nombreuses autres espèces bactériennes (Andersen and Brennan, 1994). Il n'est donc pas surprenant de constater que le PPD n'est pas un réactif totalement spécifique de *M. tuberculosis* mais peut aisément susciter une réaction croisée.

### 3-2 Protéines cytoplasmiques

#### *3-2-1 Enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés*

Ces dernières années ont vu naître un regain d'intérêt pour les voies métaboliques des mycobactéries. La volonté d'améliorer le vaccin BCG existant par génie génétique a conduit à rechercher des marqueurs de sélection autres que ceux conférant la résistances à des antibiotiques. L'inactivation de gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés aromatiques chez *Salmonella* a donné la possibilité d'obtenir une souche vaccinale atténueée (Hoiseth and Stocker, 1981). Le clonage des gènes *aroA* et *lysA* de *M. tuberculosis* impliqués dans la biosynthèse des acides aminés a été décrit (Garbe *et al.*, 1990; Andersen and Hansen, 1993). Une approche analogue à celle utilisée chez *Salmonella* pourrait donc être envisagée pour développer une souche de *M. tuberculosis* atténueée. Les voies métaboliques peuvent également être des cibles

intéressantes pour de nouvelles substances pharmacologiques. Enfin, les protéines du cytosol pourraient être antigéniques au même titre que d'autres protéines.

### **3-2-2 Les protéines de stress**

Les protéines de stress ou de choc thermique (Hsp) étaient parmi des premières protéines identifiées chez les mycobactéries (Young *et al.*, 1988). Elles représentent à l'heure actuelle les protéines mycobactériennes les mieux caractérisées. Présentes aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, elles remplissent de multiples fonctions. Elles assistent le microorganisme à son adaptation aux changements environnementaux. Elles sont synthétisées en quantités importantes dans les cellules non stressées, mais leur niveau d'expression est considérablement augmenté lorsque la cellule est exposée à des températures élevées ou à des facteurs de stress tels que les radicaux oxydants (Lee and Horwitz, 1995). Certains membres de cette famille de protéines agissent comme molécules "chaperones", en participant au repliement et à l'assemblage des structures protéiques ainsi qu'à la translocation membranaire.

Trois membres de la famille de protéines de stress ont été intensément étudiés: Hsp70/DnaK, Hsp60/GroEL et GroES. Le gène codant la protéine de 71-kDa homologue à DnaK a été isolé chez *M. tuberculosis* par différents groupes (Shinnick *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1988). Ensuite, il a été montré que DnaK de *M. bovis* possède des activités ATPasiques et d'autophosphorylation susceptibles d'être modulées par la fixation aux protéines et peptides (Peake *et al.*, 1991). La protéine de 65 kDa homologue à GroEL a également été identifiée chez *M. tuberculosis* (Young *et al.*, 1988) et chez le BCG (Thole *et al.*, 1987). Chez *E. coli*, le gène groEL est lié au gène groES dans un même opéron. Une protéine homologue à GroES a également été identifiée chez *M. tuberculosis*, mais son gène se trouve séparé du gène codant GroEL (Baird *et al.*, 1989). Il a été suggéré que GroES joue un rôle dans la translocation de protéines au travers de la membrane cellulaire (Andersen and Brennan, 1994). Ceci expliquerait la raison pour

laquelle GroES se retrouve dans les premiers stades du filtrat de culture (Andersen *et al.*, 1992).

Les protéines codées par les gènes *hsp* sont capables d'interagir avec le système immunitaire (Polla, 1988; Murray and Young, 1992). Les épitopes B et T de la protéine de 65-kDa de *M. tuberculosis* ont d'ailleurs été identifiés (Kale *et al.*, 1990; Munk *et al.*, 1990). Les membres de la famille Hsp sont remarquablement bien conservés avec plus de 50 % d'identité de séquence entre les protéines bactériennes et leurs homologues eucaryotes. L'immunité dirigée contre la protéine Hsp65 des mycobactéries est associée, en autre, à de l'arthrite auto-immune chez le rat et l'homme (Cohen and Young, 1991). Ainsi, l'intérêt vaccinal de ces antigènes semble limité par la mise en évidence de réactions auto-immunes.

### **3-3 Protéines exportées**

Des protéines synthétisées dans le cytoplasme peuvent être destinées à être exportées soit en association avec la membrane cytoplasmique ou la paroi cellulaire, soit sécrétées dans le milieu environnant. L'étape critique dans ce processus est la translocation à travers la membrane plasmique. La plupart des protéines sécrétées sont synthétisées sous forme d'un précurseur et processées en protéines matures durant la phase de translocation (Pugsley, 1993). Le précurseur est généralement synthétisé avec une séquence N-terminale de 20 à 40 acides aminés appelée peptide signal et requise pour le transport à travers la membrane. Elle est ensuite éliminée. Le peptide signal possède classiquement 2 ou 3 acides aminés chargés positivement, suivis d'une séquence non polaire. Le clivage du peptide signal se fait au niveau d'une séquence caractéristique reconnue par la peptidase du signal.

Les mycobactéries sécrètent un certain nombre de protéines dans le milieu environnant (Abou-Zeid *et al.*, 1988; Andersen *et al.*, 1991). Ces protéines génèrent une forte réponse immune cellulaire chez les souris infectées par *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1991). Par ailleurs, chez la souris, la protection contre *M. tuberculosis* est induite par l'administration BCG vivant et non par le BCG inactivé (Orme, 1988). Ces

résultats suggèrent que les protéines sécrétées par le BCG se répliquant activement dans l'organisme infecté jouent un rôle important dans la protection. Les lymphocytes T dirigés contre ces protéines pourraient être responsables de la reconnaissance initiale des macrophages infectés, menant à un contrôle rapide et précoce de l'infection (Boesen *et al.*, 1995). Chez le cobaye, une protéine riche en prolines présente dans le filtrat de culture, possède la faculté d'induire une réponse DTH après sensibilisation de l'animal avec du BCG vivant mais non avec du BCG inactivé (Romain, *et al.*, 1993a). Par ailleurs, un complexe antigénique de 45/47 kDa sécrété dans le milieu de culture de BCG ou de *M. tuberculosis* génère une réponse humorale après immunisation de cobayes avec des bactéries vivantes (Romain *et al.*, 1993b; Laqueyrrerie *et al.*, 1995). Ces résultats indiquent que certaines protéines produites par les bactéries qui se multiplient dans l'hôte, constituent des cibles immunodominantes du système immunitaire. Une préparation de filtrats de culture mycobactérienne, renfermant essentiellement des protéines sécrétées, montre au moins 33 protéines bien distinctes après migration électrophorétique (Andersen *et al.*, 1991). Cependant, seules les fonctions de quelques-unes d'entre elles sont connues.

### *3-3-1 Protéines associées à l'enveloppe mycobactérienne*

Les lipoprotéines sont généralement associées à la surface cellulaire chez les bactéries Gram-négatives (Pugsley, 1993) mais aussi chez les bactéries Gram-positives. La partie lipidique de ces protéines reste vraisemblablement associée à la surface cellulaire tandis que la partie protéique est exposée à l'extérieur. Deux lipoprotéines respectivement de 19-kDa et 38-kDa ont été isolées et caractérisées en détail chez *M. tuberculosis* (Young and Garbe, 1991). Toutes deux sont très immunogènes. Récemment, il a été montré que l'expression de la protéine de 38-kDa de *M. tuberculosis* était stimulée par une carence en phosphate (Andersen *et al.*, 1990; Espitia *et al.*, 1992). La surproduction de cette protéine chez *E. coli* et sa purification ont permis de caractériser sa capacité de fixation du phosphate (Singh *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1994). La lipoprotéine de 38-kDa se retrouve également chez le BCG, bien que présente en plus faible quantité.

### **3-3-2 Protéines sécrétées**

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme capable de paralyser les mécanismes de défense de l'hôte en inactivant les radicaux oxydants toxiques générés par les macrophages. Le gène *sod* a été isolé chez *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1991). La SOD est un exemple de protéines exportées dans le milieu environnant par un mécanisme indépendant de la présence d'un peptide signal. Ce mécanisme n'a cependant pas encore été élucidé. D'une manière intéressante, il a été montré qu'une mutation dans le gène *sod* était corrélée à la résistance à l'isoniazide (Zhang *et al.*, 1991).

Parmi les protéines majeures présentes dans un filtrat de culture de *M. tuberculosis* ou de BCG, on trouve des protéines de 30 à 32 kDa (Wiker and Harboe, 1992). Ce complexe de protéines, désigné complexe 85, consiste en trois protéines distinctes, dénommées 85A (32-kDa), 85B (31-kDa) et 85C (31,5-kDa) (Wiker *et al.*, 1986; De Bruyn *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 1991). Ce complexe est codé par trois gènes homologues mais structuralement distincts (Content *et al.*, 1991). Ils ont été isolés et séquencés (Matsuo *et al.*, 1988; Borremans *et al.*, 1989; De Wit *et al.*, 1990; Abou-Zeid *et al.*, 1991; Content *et al.*, 1991). Tous les membres du complexe 85 existent dans un grand nombre d'espèces mycobactériennes.

Ratliff *et al.* (1987) ont montré que les mycobactéries étaient capables de fixer la fibronectine. Cette propriété a été attribuée plus tard aux protéines du complexe 85 (Abou-Zeid *et al.*, 1988). Bien que les protéines du complexe 85 soient parmi les protéines majeures de sécrétion, une fraction de ces protéines reste attachée à la surface bactérienne (Rambukkana *et al.*, 1991). Cette fraction pourrait jouer un rôle important dans l'adhérence de la bactérie aux cellules cibles.

Une autre caractéristique intéressante du complexe 85 est sa capacité d'induire une réponse de type DTH chez le cobaye (Haslov *et al.*, 1990). De plus, le composant 85A induit une lymphoprolifération cellulaire et la production d'IFN-γ chez des patients atteints de tuberculose ou chez les individus sains mais positifs au test cutané (Huygen *et al.* 1988).

## **4-Mécanismes de persistance des mycobactéries dans la cellule hôte**

### **4-1 Les phagocytes professionnels et leur défense antimicrobienne**

Chez les mammifères, la phagocytose est principalement réalisée par les phagocytes "professionnels" constitués de cellules polymorphonucléaires (PMNs), de monocytes et de macrophages. Les PMNs et les monocytes dérivent de cellules souches produites dans la moelle osseuse, se déplacent dans le système circulatoire sanguin pendant une période n'excédant pas 1 jour, puis traversent les cellules endothéliales pour se rendre dans les tissus, en réponse à des facteurs chimiotactiques. Ces cellules s'accumulent ensuite au niveau du site d'infection ou d'inflammation.

Les PMNs terminent alors leur différenciation et survivent dans les tissus durant un ou deux jours seulement (Rabinovitch, 1995).

Les monocytes, quant à eux, atteignent le compartiment extravasculaire, se différencient généralement en macrophages, et peuvent survivre pendant plusieurs semaines ou mois, voire même quelques années. Ces macrophages constituent un important système de défense contre des microorganismes pathogènes (Kuhl and Rosen, 1995). Ils sécrètent une variété importante de molécules telles que les radicaux oxydants et les radicaux azotés. Ils limitent également la disponibilité du fer intracellulaire, acidifient le phagosome renfermant le microorganisme, favorisent la fusion du phagosome avec le lysosome. Ils produisent aussi des défensines. La plupart de ces mécanismes de défense est induite par une activation appropriée qui dans le cas des macrophages murins est optimale en présence d'IFN- $\gamma$  (Flesch and Kaufmann, 1987). Paradoxalement, ils représentent aussi un habitat de choix pour de nombreux parasites intracellulaires tels que les mycobactéries.

#### **4-1-1 Les composés oxydants**

Les composés oxydants sont des agents toxiques pour de nombreuses bactéries intracellulaires. Leur contribution dans la résistance à la tuberculose reste cependant controversée. Chan *et al.*, (1991) ont montré que ces composés ne sont pas bactéricides pour *M. tuberculosis*. Grâce à certains composés de sa paroi, tel le LAM, le bacille tuberculeux pourrait échapper à l'action des radicaux oxydants (Chan *et al.*, 1991).

Localisé à la surface des mycobactéries, le LAM se trouve directement confronté aux attaques antimicrobiennes du macrophage. Il est capable de piéger les radicaux oxydants et d'inhiber la protéine kinase C (Chan *et al.*, 1991), une enzyme qui joue un rôle fondamental dans l'activation de la flambée oxydative des cellules phagocytaires (Gavioli *et al.*, 1987). De plus, il semblerait que le LAM soit aussi capable d'inhiber l'activation transcriptionnelle de gènes induits par l'IFN- $\gamma$  (Chan *et al.*, 1991), et donc de bloquer l'expression de facteur(s) encore non identifié(s) et induit(s) par cette cytokine. Ces facteurs pourraient intervenir dans la flambée oxydative puisque l'IFN- $\gamma$  est l'effecteur majeur de l'activation des macrophages et possède la capacité d'augmenter la production de radicaux oxydants dans ces cellules. Les macrophages péritonéaux murins traités avec le LAM ne répondent plus à l'activation par l'IFN- $\gamma$  (Sibley *et al.*, 1988).

D'autres composés de la paroi mycobactérienne dont les sulfatides sont susceptibles d'interférer avec les mécanismes dépendant de radicaux oxydants du macrophage. Ils possèdent la capacité d'inhiber la production de radicaux oxydants *in vitro* dans des cultures de macrophages (Brozna *et al.*, 1991).

Un autre mécanisme utilisé par *M. tuberculosis* pour échapper à la toxicité des radicaux oxydants réside dans son choix de sites récepteurs au niveau macrophage. En effet, le bacille parasite le macrophage via les récepteurs CR1 et CR3 du complément. L'interaction de la bactérie avec ces molécules de la famille des intégrines n'induit pas la réponse oxydative (Schlesinger *et al.*, 1990). Cependant, l'entrée dans le macrophage peut également se faire via des récepteurs au mannose

(Schlesinger *et al.*, 1993), ou des récepteurs à la fibronectine et la vitronectine (Abou-Zeid *et al.*, 1988). Les mycobactéries pathogènes comme les non-pathogènes sécrètent des protéines de fixation de la fibronectine appartenant au complexe 85.

#### **4-1-2 Les radicaux azotés**

Le monoxyde d'azote (NO) et ses dérivés sont générés par le macrophage à partir de la L-arginine via l'action de la forme inducible de la NO synthase (iNOS). Des travaux récents ont montré une corrélation entre l'effet antimicrobien des macrophages murins activés par des cytokines et l'activation de la voie cytotoxique dépendante de la L-arginine (Chan *et al.*, 1992). La transcription de l'iNOS des macrophages murins est induite entre autre, par les combinaisons synergiques d'IFN- $\gamma$  et de lipopolysaccharide (LPS) ou d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Des études de la région promotrice du gène codant l'iNOS indiquent que l'IFN- $\gamma$  seul est incapable d'activer la transcription du gène (Xie *et al.*, 1993). L'effet synergique de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  dans l'induction des défenses antimicrobiennes du macrophage via la production de radicaux azotés souligne l'importance de ces deux cytokines dans la défense contre *M. tuberculosis*. Très récemment, il a été montré qu'une inhibition de l'iNOS augmentait profondément la charge bactérienne, les dommages pathologiques tissulaires et la mortalité de souris infectées par *M. tuberculosis*, confirmant l'importance des composés azotés dans la résistance contre la tuberculose (Chan *et al.*, 1995). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la résistance de différentes souches mycobactériennes aux radicaux azotés et la virulence de ces souches chez le cobaye (O'Brien *et al.*, 1994). Cependant, l'existence d'un tel mécanisme de résistance chez les macrophages humains reste encore à établir.

Il semblerait que la voie de biosynthèse du NO participe également à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la ferritine et du récepteur de la transferrine des macrophages (Drapier *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1993). Il est fascinant de constater qu'une même voie de biosynthèse produisant des substances antimycobactériennes, intervienne également dans la régulation du métabolisme du fer, dont la disponibilité est essentielle pour une croissance optimale de la bactérie.

#### **4-2 L'inhibition de la fusion phago-lysosomiale**

La pénétration d'une bactérie dans les phagosomes est généralement suivie de la fusion des phagosomes avec les lysosomes entraînant la dégradation du microorganisme. Les hydrolases et autres enzymes digestives du lysosome fonctionnent de manière optimale à pH acide ( $\text{pH} < 5$ ) qui est maintenu grâce à une pompe à protons ATP-dépendante.

Les travaux réalisés par Goren *et al.* (1976) suggèrent que les souches virulentes de *M. tuberculosis* peuvent inhiber la fusion phagolysosomiale selon un mécanisme faisant intervenir des sulfatides de la surface de la bactérie.

D'autre part, *M. tuberculosis* possède la capacité de produire de l'ammoniac en grandes quantités. Cette base s'accumule dans le filtrat de culture de *M. tuberculosis* jusqu'à atteindre une concentration de 20 mM. Elle pourrait être responsable de l'inhibition de la fusion lysosomiale (Gordon *et al.*, 1980). En effet, le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) affecte le mouvement des lysosomes et alcalinise le compartiment intralysosomal (D'Arcy Hart *et al.*, 1987). Ainsi, en produisant d'importantes quantités d'ammoniac, le bacille tuberculeux peut potentiellement échapper à l'environnement toxique de la vacuole lysosomiale en (i) inhibant la fusion phagosome-lysosome et (ii) en diminuant l'activité des enzymes intralysosomiales via l'alcalinisation du milieu lysosomal.

Il semblerait donc que *M. tuberculosis* et *M. avium* résident dans des vacuoles qui ne soient pas acidifiées. Sturgill-Koszycki *et al.* (1994) ont montré que l'absence d'acidification dans les phagosomes renfermant *M. avium* est due à l'exclusion de la pompe à proton ATPase-dépendante. Toutefois, les membranes parasitophores du système endocytaire contiennent un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes, le LAMP-1 ("Lysosomal Membrane Protein"), suggérant une fusion sélective avec certains compartiments cellulaires (dont les vésicules golgiennes qui renferment le LAMP-1 et pas de pompes à protons). Alternativement, les phagosomes renfermant les mycobactéries pourraient

fusionner avec des vésicules contenant les deux marqueurs et exclure sélectivement la pompe à proton.

#### **4-3 Mécanismes d'échappement du phagosome**

Certaines mycobactéries virulentes pourraient, tout comme d'autres pathogènes intracellulaires tels que *Listeria* (Bielecki *et al.*, 1990) et *Shigella* (Sansonetti *et al.*, 1986), s'échapper de la vacuole phagocytaire vers le cytoplasme. La translocation de *M. tuberculosis* des vacuoles phagocytaires vers le compartiment cytoplasmique a été décrite par McDonough *et al.* (1993). Des activités hémolytiques capables de lyser les membranes vacuolaires pourraient être responsables de ce passage car une activité hémolytique du bacille tuberculeux a été mise en évidence (King *et al.*, 1993; Leao *et al.*, 1995). Par ailleurs, une infection avec *M. tuberculosis* induit une réponse T cytotoxique restreinte par les molécules de classe I du CMH, une réponse généralement induite par les microorganismes présents dans le cytoplasme. Cependant, ce phénomène d'échappement de la bactérie vers le cytoplasme reste très controversé. D'autre part, aucune activité hémolytique comparable n'a pu être mise en évidence chez le BCG (King *et al.*, 1993), bien que celui-ci soit également capable d'induire une réponse CTL (Winter *et al.*, 1995).

#### **4-4 Mécanismes d'adaptation et de croissance intramacrophagiennes**

Au même titre que certains composants de la paroi mycobactérienne, la régulation de l'expression de certains gènes pourrait faciliter l'adaptation de la bactérie à l'environnement intramacrophagique. L'induction des protéines du choc thermique Hsp60 et Hsp70 pourrait faciliter le repliement correct d'autres protéines mycobactériennes, tandis que la superoxyde dismutase pourrait limiter l'effet toxique du stress oxydant. Les changements de l'expression génétique mycobactérienne dans le compartiment phagocytaire ne se limitent probablement pas aux seuls gènes impliqués dans le stress bactérien. Lee and Horwitz (1995) ont montré que la croissance intracellulaire de *M. tuberculosis* s'accompagne de la surexpression d'au moins 16 protéines bactériennes et de la diminution de

l'expression d'au moins 28 protéines. Parmi les 16 protéines surproduites, 6 sont totalement absentes durant la croissance extracellulaire de la mycobactérie dans des conditions habituelles de culture.

Les mycobactéries virulentes se distinguent également par leur vitesse de croissance à l'intérieur de l'hôte (North and Izzo, 1993). Chez des souris immunocompétentes, la croissance initiale de *M. tuberculosis* est contrôlée dans tous les organes à l'exception des poumons, où l'infection s'installe progressivement. D'autre part, la croissance de la souche atténuée H37Ra et du BCG est contrôlée dans tous les organes, y compris les poumons. Chez des souris immunodéficientes, le temps de génération de la souche virulente H37Rv est de 17 heures, soit sensiblement plus court que celui de H37Ra (99 heures) (North and Izzo, 1993). Les souches virulentes de *M. tuberculosis* se multiplient donc plus rapidement dans la souris et aboutissent à la mort de l'animal, alors que les mutants avirulents causent une infection contrôlable par l'animal.

#### 4-5 Bases génétiques de la survie dans les macrophages

La persistance des mycobactéries à l'intérieur de l'hôte est le résultat d'interactions complexes entre de multiples composés mycobactériens et la cellule hôte. Il est donc peu probable que la survie de la bactérie soit liée à l'action d'un seul gène. Le développement récent d'outils moléculaires adaptés aux mycobactéries a déjà permis une première approche génétique des mécanismes de la survie mycobactérienne (Shinnick *et al.*, 1995).

##### 4-5-1 Gènes sélectivement exprimés dans les macrophages

Plum and Clark-Curtiss (1994) ont examiné les différences entre l'expression de gènes de *M. avium* dans les macrophages humains et celle *in vitro* dans le milieu de culture. La construction d'une banque soustractive d'ADNc a permis d'identifier un gène spécifiquement

induit dans le macrophage. Ce gène code une protéine de 27 kDa dont la fonction reste encore inconnue.

Les gènes spécifiquement induits dans l'hôte sont particulièrement attrayants dans la mesure où ils représentent sans doute des gènes-clés de la virulence et donc de la pathogénie mycobactérienne. L'identification de ces gènes devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de survie de la bactérie et de ses relations avec son hôte. Les produits de ces gènes pourraient également constituer des cibles potentiellement intéressantes pour la conception de nouvelles perspectives thérapeutiques et vaccinales.

#### **4-5-2 Différences génétiques entre souches virulentes et avirulentes**

D'autres approches permettant de définir les gènes de virulence sont basées sur les différences génétiques entre souches virulentes et avirulentes. Les projets de séquençage des génomes de *M. tuberculosis* et *M. leprae* apporteront des aides précieuses à ce type d'études. Les différences structurales et fonctionnelles des LAM entre les souches de *M. tuberculosis* virulentes et avirulentes sont vraisemblablement accompagnées de différences dans les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des LAM.

En criblant une banque génomique d'une souche virulente de *M. tuberculosis* pour la recherche de clones restituant la virulence d'une souche avirulente, Pascopella *et al.* (1994) ont identifié un fragment d'ADN de 25 kb qui augmente le taux de croissance d'une souche avirulente *in vivo*.

Des expériences de complémentation *in vivo* chez *M. bovis* ont récemment été réalisées dans le modèle cobaye (Collins *et al.*, 1995). Un fragment d'ADN de 2,7 kb, codant un facteur  $\sigma$ , est capable de conférer un phénotype de virulence à une souche de *M. bovis* avirulente. Le

gène, désigné *rpoV*, diffère du gène de la souche avirulente par une mutation ponctuelle dans une région interagissant avec les promoteurs.

## **5-Mycobacterium bovis BCG**

### **5-1 Le BCG de nos jours**

Le BCG est aujourd'hui le seul vaccin utilisé contre la tuberculose ou la lèpre. L'OMS et certaines autorités nationales assurent aujourd'hui la surveillance et le contrôle de qualité des vaccins BCG au moyen de tests réguliers réalisés *in vitro* et d'essais cliniques (WHO, 1966; Milstien and Gibson, 1989). Trois souches parentales (Glaxo-1077, Tokyo-172 et Pasteur-1173P2) comptent pour plus de 90% des vaccins BCG utilisés actuellement dans le monde. Ces souches dérivent toutes de la culture originale de Calmette et Guérin mais sont cultivées depuis lors dans des conditions de culture très différentes dans divers laboratoires et centres de production. Elles présentent maintenant des caractéristiques variables de taux de croissance, de morphologie, d'expression de certains antigènes et de viabilité (Osborn, 1983; Milstien and Gibson, 1989).

La masse semi-sèche est récupérée après culture du BCG pendant une période de 6 à 9 jours et filtration. Les suspensions vaccinales sont alors lyophilisées et resuspendues dans une solution saline ou d'eau distillée avant utilisation. Afin d'éviter tout changement génétique éventuel dans les différentes souches, l'OMS recommande depuis 1966 que les lots vaccinaux proviennent de cultures n'ayant pas subi plus de 12 passages depuis le lot original (WHO, 1966).

### **5-2 Efficacité du BCG**

Les auteurs d'une récente méta-analyse, basée sur l'exploitation d'un grand nombre de données publiées dans la littérature, concluent que la vaccination avec le BCG réduit de manière significative les risques d'une tuberculose active, l'effet protecteur moyen étant de 50% (Colditz *et al.*, 1994). Cependant, l'efficacité du BCG contre la tuberculose reste à l'heure actuelle très controversée (Verhoef, 1994). Le taux de protection varie selon les études de 0% à 80% (Chaparas, 1982; Colditz *et al.*,

1994). La même polémique existe actuellement concernant le rôle protecteur du BCG contre la lèpre. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ces variations.

### *5-2-1 Différences entre les souches vaccinales utilisées*

Depuis plusieurs décennies, de nombreux gouvernements ont demandé à l'OMS de leur fournir la souche originale de BCG. Le maintien en culture successives à l'aide de protocoles différents a entraîné une variabilité génétique de la souche de départ se traduisant par des propriétés variables de virulence résiduelle (Osborn, 1983).

### *5-2-2 Différences dans la virulence des souches de *M. tuberculosis**

Peu de choses concernant la variabilité de la virulence chez *M. tuberculosis* sont connues. Des analyses par RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") ou d'empreintes génétiques ("fingerprinting") ont cependant clairement démontré l'existence de variations génétiques entre différentes souches de *M. tuberculosis*. Des méthodes standardisées d'empreintes génétiques exploitent la variabilité du nombre et de la position génomique de certains éléments d'insertion chez *M. tuberculosis* (van Embden *et al.*, 1993). Ces techniques permettent notamment d'identifier des souches spécifiques possédant des propriétés uniques d'infectivité, de virulence ou de résistance à certaines substances pharmacologiques. Il n'est cependant pas connu pourquoi le BCG protège davantage contre certaines souches de *M. tuberculosis* plutôt que d'autres.

### *5-2-3 Différences de réponses immunitaires développées contre les diverses formes de la tuberculose*

Une analyse récente a montré que la vaccination par le BCG protège contre la méningite tuberculeuse et les formes disséminées de la maladie (tuberculose miliaire) à raison de 75 à 86%

(Rodrigues *et al.*, 1993). Par contre, des résultats plus disparates concernent la forme pulmonaire de la maladie, conséquence d'un second contact avec l'agent infectieux ou d'une réactivation de l'infection primaire. Ainsi, le BCG semblerait être plus efficace contre la dissémination bactérienne hématogène plutôt que contre la forme pulmonaire plus localisée (Fok *et al.*, 1976; Lagranderie *et al.*, 1993a). Une explication possible serait que différents mécanismes immunologiques agissent contre les différentes formes de la maladie.

#### *5-2-4 Incidence de facteurs environnementaux*

Un certain nombre de facteurs environnementaux peuvent également influencer l'efficacité de protection du BCG. La malnutrition, particulièrement présente dans les PVD, pourrait constituer un facteur d'influence considérable. Il a été démontré que des cobayes astreints à un régime carencé en protéines et vaccinés avec le BCG devenaient incapables de contrôler une infection avec *M. tuberculosis*. Par contre, lorsque ces animaux étaient resoumis à un régime alimentaire normal, ils redevenaient protégés. Ces expériences soulignent la nature réversible d'une insuffisance nutritionnelle pour contrôler l'infection du bacille tuberculeux (McMurray *et al.*, 1986).

#### *5-2-5 Déterminants génétiques contrôlant la résistance ou la susceptibilité à l'infection mycobactérienne*

La susceptibilité à la tuberculose de même que la réponse à la vaccination par le BCG sont en partie déterminées génétiquement. Des études réalisées chez la souris ont révélé la présence d'un locus génétique désigné *bcg* qui contrôlerait la résistance ou la susceptibilité aux mycobactéries. Ce même gène pourrait aussi être impliqué dans la résistance naturelle des souris à l'infection par *Salmonella typhimurium* ou *Leishmania donovani*, deux autres pathogènes se multipliant dans les macrophages (Shurr *et al.*, 1991). La forme résistante est

codée par l'allèle dominant par rapport à la forme susceptible. Le produit de ce gène semble être impliqué dans l'activité bactéricide des macrophages. En effet, les macrophages de souches *bcg*-résistantes sont de meilleurs producteurs d'ions superoxydes et de peroxydes que les macrophages de souches possédant l'allèle *bcg*-sensible. D'autre part, les macrophages résistants possèderaient plus de récepteurs d'IFN- $\gamma$  que les macrophages sensibles et seraient donc plus facilement activables. Les ADNc murin et humain du gène *bcg* ont été clonés et séquencés récemment (Vidal *et al.*, 1993; Kishi, 1994). Ils codent des protéines de 484 et 483 acides aminés respectivement, présentant une similitude de séquence primaire de 89 %. Le produit du gène *bcg* est appelé NRAMP ("Natural Resistance Associated Macrophage Protein"). Il présente des homologies avec un transporteur de nitrate (Vidal *et al.*, 1993). L'analyse des ADNc de sept souches murines *bcg<sup>r</sup>* et de six souches *bcg<sup>s</sup>* indique clairement que le phénotype de susceptibilité est le résultat d'une transition de G en A en position 783 avec une substitution non conservatrice de Gly-105 en Asp à l'intérieur d'un domaine transmembranaire de la protéine. Puisque les macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  sont capables de produire des radicaux azotés (Chan *et al.*, 1992), la fonction du transporteur de nitrate pourrait également inclure le transport de nitrite stable et non toxique dans l'endosome ou le phagolysosome. A l'intérieur de ces compartiments acides, les nitrites subiraient alors des oxydations, générant des intermédiaires plus réactifs, tel que le NO, et toxiques pour les mycobactéries.

#### *5-2-6 Infections par les mycobactéries environnementales*

Les personnes adultes sont généralement moins affectées par les méningites tuberculeuses que les personnes jeunes (Rodrigues *et al.*, 1993), peut-être grâce à l'immunité qu'ils développent progressivement face aux mycobactéries atypiques. Les mycobactéries atypiques sont non pathogènes pour l'individu immunocompétent et sont présentes dans l'environnement. L'infection de cobayes par des mycobactéries atypiques engendre une certaine immunité contre *M. tuberculosis* (Palmer and Long, 1966). Par ailleurs, suite à une vaccination

Essai clinique	Souche de BCG	% de protection	Exposition atypique
Haïti	Montréal	80	?
Indiens du Canada	Montréal	80	faible
Medical Research Council, Royaume Unis	Danoise	77	(faible)
Indiens d'Amérique	Philipps	75	(faible)
Chicago, Etats-Unis	Tice	75	faible
Afrique du Sud	Glaxo	37	?
Porto Rico	Birkhaug	31	(élevée)
Madanapalle, Inde	Madras	31	élevée
Géorgie, Etats-Unis	Tice	0	élevée
Géorgie et Alabama, Etats-Unis	Tice	14	élevée
Chingleput, Inde	Danoise et Paris	0	élevée

Tableau 3: Evaluation de l'effet protecteur du BCG contre la tuberculose dans différents essais cliniques majeurs. D'après Roche *et al.* (1995). Les parenthèses indiquent l'exposition présumée mais non rapportée à des mycobactéries atypiques.

par le BCG, des cobayes préinfectés par des mycobactéries atypiques présentent un taux de protection similaire à celui des animaux vaccinés face à *M. tuberculosis* (Palmer and Long, 1966). Ainsi, l'effet antituberculeux du BCG ne s'additionne qu'en partie à l'effet antituberculeux acquis suite à l'infection par des mycobactéries atypiques. En Inde, presque 100 % de la population est porteuse de mycobactéries atypiques (Palmer and Long, 1966). Dès lors, dans l'hypothèse selon laquelle la présence de mycobactéries atypiques procure aux habitants d'Inde une immunité comparable à une vaccination par le BCG, on peut s'attendre à ce que la vaccination par le BCG n'offre aucune protection supplémentaire face à la tuberculose. Le tableau 3 indique que l'efficacité du BCG est fortement diminuée dans des communautés particulièrement exposées à des mycobactéries atypiques.

Toutefois, il semblerait que l'immunité conférée contre les mycobactéries environnementales puisse ne pas être aussi durable que celle développée par la vaccination par le BCG (Kaufmann and Young, 1992). Ce point soulignerait l'importance d'une vaccination par le BCG dès la naissance dans le but d'installer une immunité durable chez l'individu "naïf".

## **6-Mécanismes de la pathogénie et de la protection**

L'infection par *M. tuberculosis* ou la vaccination par le BCG induit généralement une réaction d'hypersensibilité vis-à-vis d'antigènes mycobactériens solubles. Elle peut être mise en évidence à l'aide du test cutané à la tuberculine. Malheureusement, la sensibilité à la tuberculine ne corrèle pas avec les taux de protection induits par la vaccination avec le BCG (Comstock, 1988). Par ailleurs, il y a une dissociation des cellules et mécanismes responsables de l'hypersensibilité de ceux responsables de l'immunité protectrice chez la souris (Orme and Collins, 1984).

L'hypersensibilité à la tuberculine reflète la production, en particulier par des cellules CD4<sup>+</sup>, d'IFN-γ, d'interleukine-2 (IL-2), de facteur stimulant la colonisation des granulocytes et des macrophages (GM-CSF), et de lymphotoxine (TNF-β). Au niveau de ces sites, les macrophages

produisent également des ARNm du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 et de l'IL-12. Chez les souris, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  produits par les lymphocytes Th1 et par les cellules NK ("Natural Killer") sont à leur tour nécessaires pour activer le macrophage à produire des composés azotés destinés à tuer *M. tuberculosis* (Chan *et al.*, 1992). Des souris transgéniques dont le gène codant l'IFN- $\gamma$  a été déléte, sont incapables de produire du NO et ne résistent pas à l'infection par *M. tuberculosis* (Flynn *et al.*, 1993).

On peut imaginer que certains individus infectés par *M. tuberculosis* ou le BCG développent une réponse prédominante de type Th2, caractérisée par la production des cytokines IL-4 et IL-10. Ces cytokines peuvent supprimer l'expansion des cellules CD4 $^{+}$  et la transcription d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2, bloquant ainsi l'activation du macrophage. L'inefficacité du BCG à protéger certains individus vaccinés pourrait donc être liée à l'induction inappropriée d'une réponse de type Th2.

Des expériences récentes réalisées sur des souris dont le gène codant la  $\beta$ 2-microglobuline ou celui codant le CD8 a été déléte montrent que la résistance à *M. tuberculosis* nécessite des cellules T CD8 $^{+}$  restreintes par les molécules de classe I fonctionnelles (Flynn *et al.*, 1992). Les molécules de CMH de classe I sont généralement requises pour la présentation d'antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Or, des macrophages infectés par des mycobactéries peuvent être lysées par des cellules T restreintes par les molécules de classe I (Kaufmann, 1993), suggérant que les CTL pourraient jouer un rôle essentiel dans l'immunité contre *M. tuberculosis*. Par ailleurs, l'expansion des cellules CD8 $^{+}$  est dépendante d'IL-2 produite par les cellules CD4 $^{+}$ , car des souris dont le gène CD4 a été déléte meurent rapidement après épreuve avec *M. tuberculosis*. Ces résultats suggèrent que ni les cellules CD4 $^{+}$ , ni les cellules CD8 $^{+}$  sont suffisantes pour protéger contre l'infection par *M. tuberculosis* et que les deux populations cellulaires sont requises.

Dans ce contexte il est intéressant de noter la différence du rôle que joue la  $\beta$ 2-microglobuline dans la résistance contre *M. tuberculosis* par rapport à la résistance contre le BCG. Alors que 75% des souris  $\beta$ 2-microglobuline $^{-}$  ou CD8 $^{-}$  étaient mortes 24 jours après infection par *M. tuberculosis*, aucune souris infectée par le BCG ne mourût, même 30

semaines après l'infection (Flynn *et al.* 1992). Ces résultats suggèrent que la présence de cellules CD4<sup>+</sup>, la production de lymphokines et l'activation des macrophages peuvent être suffisantes pour conférer la résistance au BCG mais pas la résistance à *M. tuberculosis*.

Des évidences récentes ont montré que l'infection par *M. tuberculosis* génère la production d'IL-12, une cytokine-clé de la réponse Th1 et impliquée dans l'induction d'IFN-γ. De plus, l'administration exogène d'IL-12 chez la souris augmente significativement la résistance à l'infection par *M. tuberculosis*, tandis que l'administration d'anticorps anti-IL-12 diminue cette résistance (Cooper *et al.*, 1995). D'autre part, des examens histologiques de tissus provenant d'animaux infectés et traités à l'IL-12 ont révélé une accumulation de monocytes. Par contre, la neutralisation de l'IL-12 s'accompagne d'une réduction de l'intégrité du granulome et d'une diminution de la capacité de l'animal à contrôler la croissance bactérienne. Les granulomes jouent, en effet, un rôle important pour limiter l'expansion des mycobactéries dans l'organisme (Kindler *et al.*, 1989).

# **Chapitre 3:**

## **La bilharziose et le schistosome**

### **1-Notions générales**

La bilharziose (du nom de Théodor Bilharz) ou schistosomiase, est une maladie parasitaire débilitante causée par un trématode, touchant de nombreuses espèces animales, y compris l'homme. A cause de la gravité des lésions rencontrées et de sa morbidité très importante, elle représente un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays situés en zone tropicale et subtropicale. Elle constitue la deuxième endémie parasitaire au monde, après le paludisme, affectant 200 millions de sujets, 500 millions d'individus étant exposés au risque d'infection. La bilharziose est responsable de 300 000 à 500 000 morts annuellement.

La lutte contre l'extension de la bilharziose est soutenue par des programmes internationaux destinés à la prévention de la maladie, la surveillance épidémiologique, son traitement, l'information des populations et la recherche d'un vaccin efficace (Picot, 1993). L'effort de recherche se concentre actuellement sur les mécanismes responsables de l'acquisition de l'immunité à la maladie, afin de sélectionner des antigènes du parasite capables d'induire une immunoprotection efficace.

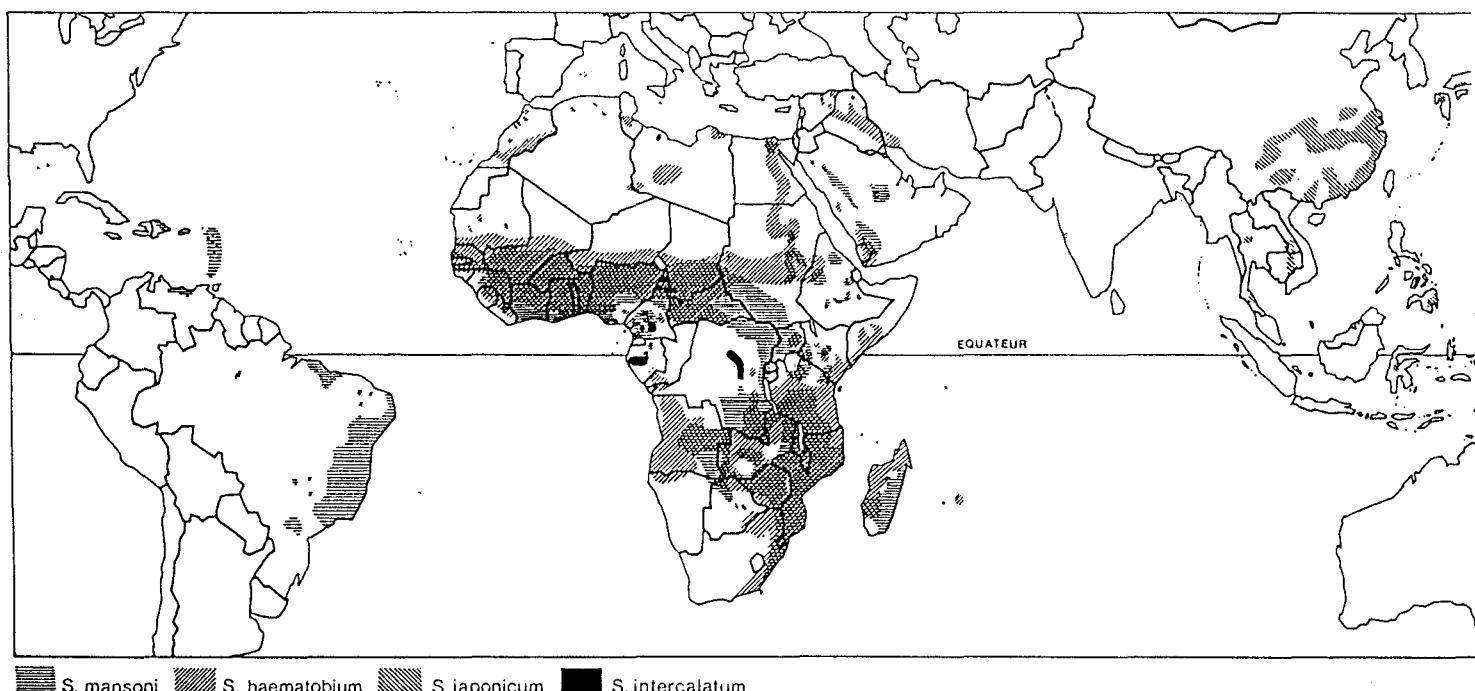


Figure 3: Répartition géographique des quatre bilharzioses.  
D'après Gentilini *et al.* (1982)

### **1-1 La répartition géographique**

Les régions tropicales et subtropicales représentent les principaux foyers de la bilharziose dans le monde. Cette parasitose est endémique dans 76 pays. Les continents africain, sud-américain et asiatique en sont les plus touchés (Figure 3) (Larivière, 1993). Les aires de répartition des schistosomes ne cessent de s'accroître à cause des programmes d'assainissement et d'aménagement des cours d'eau et du flux migratoire intense des populations. Le genre *Schistosoma* rassemble 18 espèces (Short, 1983). Cinq espèces de schistosomes sont adaptées à l'homme et constituent une menace grave pour la santé publique.

*Schistosoma haematobium*, agent de la schistosomiase vésicale, est endémique dans 54 pays d'Afrique et de Méditerranée orientale. On estime à 180 millions le nombre de personnes exposées et à 90 millions celui des personnes infestées (Larivière, 1993).

Les autres schistosomes sont les agents de bilharziose intestinale, entraînant des complications hépatospléniques plus ou moins fréquentes et graves selon les espèces.

*Schistosoma mansoni* sévit dans 53 pays situés en Afrique, en Méditerranée orientale, en Amérique du Sud et dans les Caraïbes (Larivière, 1993).

*Schistosoma japonicum* est strictement un parasite d'Asie orientale. Il est endémique en Chine, aux Philippines, au Japon et en Indonésie. Sa présence à Taïwan ne fait courir aucun risque à l'homme car la souche locale est strictement zoonotique. (Larivière, 1993).

*Schistosoma mekongi*, strictement asiatique, a été identifié au Cambodge et au Laos (Larivière, 1993).

*Schistosoma intercalatum*, à localisation rectale chez l'homme, est un parasite strictement africain présent au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun (Larivière, 1993).

*S. mansoni*, *S. intercalatum* et *S. haematobium* coexistent dans huit pays de l'Afrique centrale et occidentale.

### **1-2 Le parasite**

Les schistosomes sont des plathelminthes trématodes digènes (à deux hôtes) qui se localisent dans l'appareil circulatoire de l'hôte

mammifère définitif. Les schistosomes se présentent comme des vers filiformes (de taille inférieure à 2 cm), accrochés par leurs ventouses à l'endothélium veineux. Ils se localisent selon l'espèce à un niveau précis de l'appareil veineux, généralement dans le système mésentérique ou urogénital. Ils sont hématophages et peuvent vivre plusieurs années. Leur métabolisme utilise de nombreux produits de l'hôte, tels que le glucose, le cholestérol et les acides gras, mais aussi des facteurs de croissance. Le couple se constitue très curieusement. Seules les femelles qui s'accouplent atteignent leur maturité sexuelle, les autres restent petites et immatures. Le choix du partenaire semble revenir à la femelle, très sensible aux phéromones produits par les mâles. Le couple est en général formé pour la vie. Le mâle héberge en permanence la femelle dans un canal gynécophage, où elle est retenue captive. Le canal gynécophage est tapissé de petites épines enfoncées dans de fins replis tégumentaires et reliés à des récepteurs sensoriels. Ces épines peuvent faire saillie et dissuader la partenaire de toute aventure extraconjugale (Larivière, 1993).

Les espèces peuvent être distinguées en fonction de critères:

- morphologiques et biochimiques
- parasitologiques: localisation géographique, hôtes intermédiaires et définitifs...
- pathogéniques: implantation tissulaire, chronobiologie...

La classification peut se baser aussi sur le spectre d'infectivité. On distingue:

*Les espèces anthropophiles: S. mansoni et S. intercalatum et S. haematobium .*

*Les espèces anthropo-zoophiles: S. japonicum et S. mekongi.*

*Les espèces zoophiles: S. rodhani et S. sinensium (rongeurs et carnivores), S. incognitum (suidés) et S. curassoni, S. bovis, S. mattheei, S. leiperi, S. edwardiense, S. hippopotami, S. margrebowie, S. indicum, S. spindale et S. nasale (porcins et ruminants).*

La plupart des espèces respectent une stricte spécificité d'hôte, à l'exception de *S. japonicum* et *S. mekongi* qui parasitent à la fois l'homme

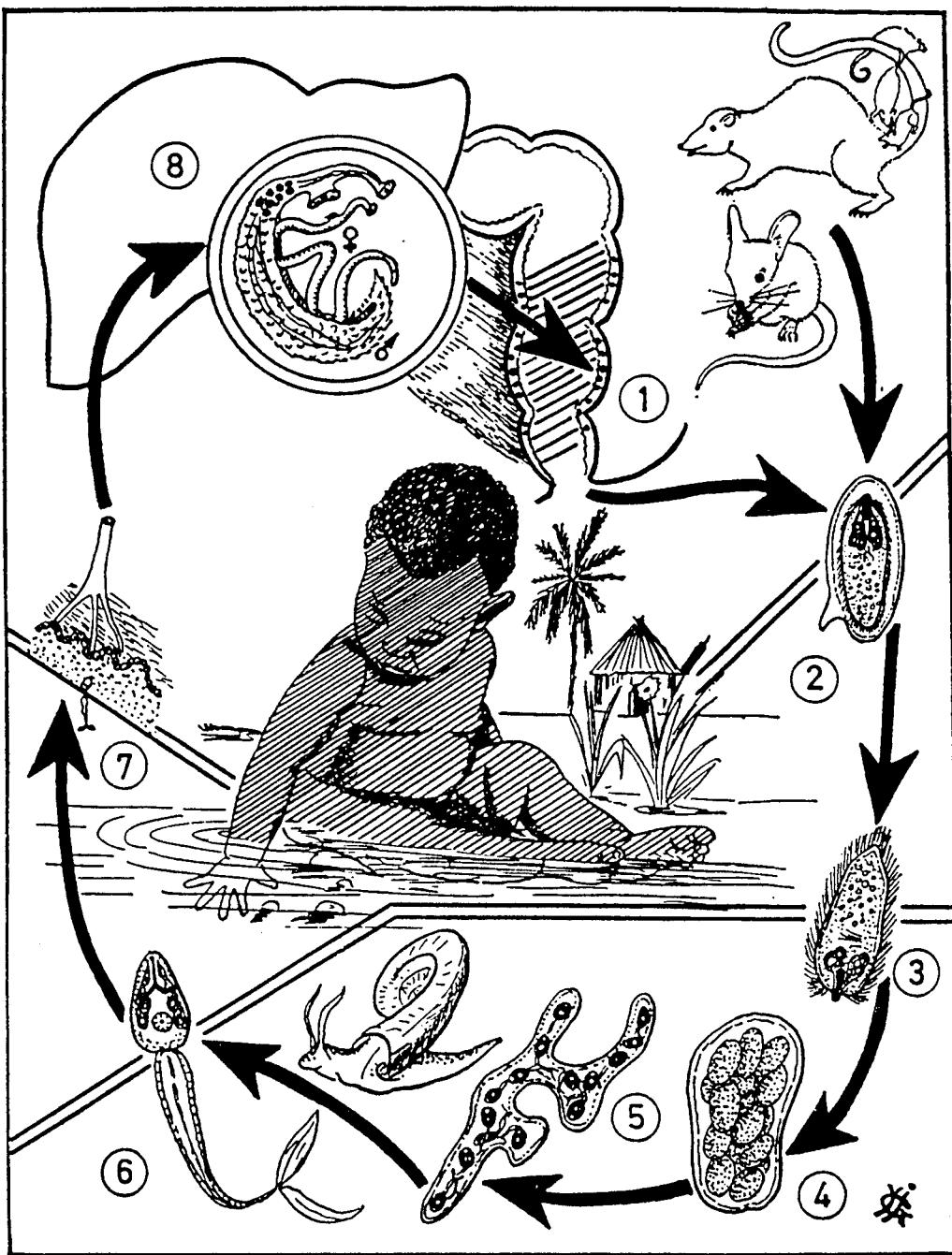


Figure 4: Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*.  
D'après Golvan et al. (1978)

et le bétail, ce qui représente un obstacle supplémentaire pour l'éradication de ces deux espèces.

### **1-3 Le cycle évolutif des schistosomes**

Le cycle de vie du schistosome se déroule entre un hôte mammifère définitif et un hôte invertébré intermédiaire, un mollusque aquatique. (Figure 4). Pour les trois principales espèces infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*), le mollusque appartient aux espèces *Biomphalaria*, *Bulinus* ou *Oncomelania*).

#### ***1-3-1 Le miracidium***

Les oeufs des schistosomes sont rejettés dans les excreta de l'hôte et ne peuvent éclore que si certaines conditions du milieu sont réunies (pH neutre, lumière, salinité modérée, température voisine de 30°C). L'éclosion libère une forme larvaire libre, le miracidium, doté de cils vibratiles qui lui permettent de se déplacer à la recherche de son hôte intermédiaire spécifique (Larivière, 1993). Cette larve est guidée par divers stimuli d'ordre sensoriel et chimique lui assurant la reconnaissance de l'hôte à infecter.

#### ***1-3-2 Le sporocyste***

Le miracidium infecte le mollusque et se transforme en sporocyste primaire. Il rejoint alors l'hépatopancréas de l'hôte intermédiaire où il peut rester pendant des mois. En 3 semaines à 2 mois, il se reproduit par multiplication asexuée et polyembryonie, passant des stades de sporocyste primaires et secondaires à celui des cercaires qui, parvenues à maturité, constituent les formes infestantes du parasite. Un seul miracidium peut aboutir à une production de 100000 cercaires (Larivière, 1993).

#### ***1-3-3 La cercaire***

L'émission de cette forme libre et infestante a lieu à des moments précis de la journée, qui coïncident généralement avec

les heures de contact des populations humaines et animales avec l'eau. Appelée aussi furcocercaire, cette larve est pourvue d'un appendice caudal fourchu qui lui confère une grande motilité. La durée de vie des cercaires varie de 8 à 12 heures. Durant cette période, la larve doit impérativement trouver son hôte définitif avant l'épuisement total de sa réserve de glycogène (Lawson and Wilson, 1980).

#### **1-3-4 Le schistosomule et le ver adulte**

Dès qu'ils rencontrent leur hôte définitif, les furcocercaires adhèrent à la peau de celui-ci grâce à leurs deux ventouses. La larve fixée sécrète des enzymes protéolytiques et grâce à un mouvement intense de la queue, elle peut traverser les couches supérieures de la peau (Landsperger *et al.*, 1982). La queue est alors éliminée. Une fois la barrière cutanée franchie, la ceraire devient un schistosomule qui subit des modifications physiologiques et biochimiques qui lui permettent de s'accommoder à son nouvel environnement (Stirewalt *et al.*, 1974).

Après un séjour cutané de quelques jours, le schistosomule migre vers les poumons par la voie lymphatique et sanguine. Il passe ensuite au niveau du cœur et du poumon pour rejoindre la veine porte-hépatique (Knopf *et al.*, 1986). Parvenu au foie, le jeune parasite va se différencier en schistosome puis subir une maturation sexuelle. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. Après accouplement dans le foie, les vers appariés se déplacent à contre-courant grâce aux ventouses et gagnent les lieux de ponte. Les schistosomes adultes vivent alors accouplés dans les capillaires d'organes creux de l'hôte définitif, en général le long du tube digestif (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. bovis*), mais aussi autour du système urogénital (*S. haematobium*).

Le nombre d'oeufs excrétés quotidiennement varie suivant les espèces de schistosome. Pour *S. japonicum*, plusieurs milliers d'oeufs sont pondus chaque jour. La destinée des oeufs est double. Ils peuvent être éliminés dans les excréta par passage au travers des

muqueuses et assurent ainsi la continuité du cycle. Ils peuvent également rester bloqués dans les tissus et provoquer des manifestations pathologiques.

#### **1-4 La pathologie**

La pathologie est essentiellement liée à la ponte d'oeufs par le ver adulte. Les oeufs sont à l'origine d'une réaction inflammatoire importante lorsqu'ils restent séquestrés dans les tissus, aboutissant à la formation de granulomes (Bourée, 1993). Les granulomes qui entourent les oeufs sont constitués en majorité d'éosinophiles, de fibroblastes et de lymphocytes. Ils évoluent vers une fibrose qui devient progressivement irréversible et qui peut générer une hypertension portale responsable de l'hépatomégalie. Les organes atteints présentent alors des anomalies importantes qui se répercutent sur l'état de santé général et peuvent être à l'origine de complications graves. Les vers adultes provoquent en plus une altération des parois veineuses entraînant en particulier une fibrose périportale appelée fibrose de Symmers (Bourée, 1993).

D'autres symptômes tels que l'inflammation cutanée, la fièvre, l'apparition de tumeurs et de complications cardiaques ou cérébrales sont liés à la pénétration des cercaires et à l'égarement des oeufs dans d'autres organes. La dégradation de l'état général s'accentue encore davantage par la sécrétion de toxines par les vers adultes.

Cependant, bien que la maladie s'installe de façon aiguë au cours des premières infestations, les enfants étant les plus touchés, elle atteint ensuite un état chronique où les symptômes régressent. Le nombre d'oeufs excrétés et l'intensité des lésions diminuent au cours du temps (Larivière, 1993).

#### **1-5 Le diagnostic**

Le diagnostic de la bilharziose intestinale à *S. mansoni* repose sur plusieurs éléments. L'hémogramme montre une hyperéosinophilie. Au bout de 60 jours, lorsque les vers adultes sont installés dans leur site

définitif, on retrouve les oeufs caractéristiques dans les selles et les urines. La rectoscopie montre une muqueuse enflammée, et les biopsies des muqueuses rectales permettent de retrouver toutes les espèces soit par examen parasitologique soit par examen anatomopathologique. (Bourée, 1993).

Le sérodiagnostic par immunofluorescence ou par ELISA est possible dans les mois qui suivent l'infestation. La recherche d'anticorps spécifiques du parasite sélectionnés à des stades définis du développement permet d'évaluer l'état d'infestation ou sa durée. La mise en évidence d'anticorps circulants, bien que plus précise, nécessite la production d'outils diagnostiques plus élaborés.

La réaction d'hypersensibilité peut aussi être appliquée pour mettre en évidence une infestation.

Hormis la spécificité du test par rapport à d'autres parasites, les limites du diagnostic immunologique résident surtout en son applicabilité. La recherche des oeufs représente actuellement l'élément principal de diagnostic sur le terrain. Elle est le seul moyen applicable à grande échelle pour suivre l'efficacité d'un traitement dans les PVD.

#### 1-6 Le traitement

Il existe plusieurs molécules actives contre le schistosome qui pourraient enrayer totalement l'infestation (Coulaud et Charmot, 1993). Le traitement actuel des bilharzioses fait essentiellement appel au praziquantel (PZQ) ou à l'oxamniquine. Cependant, ces médicaments présentent de nombreux inconvénients liés aux effets secondaires tels que les nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées et céphalées. La prescription du PZQ, bien que reconnu non tératogène, est à éviter chez la femme enceinte. Par ailleurs, le coût élevé de ces molécules en restreint l'usage. De plus, l'existence de schistosomes résistants aux médicaments a été rapportée (Cioli *et al.*, 1993).

Le PZQ est actif sur toutes les espèces de schistosomes. Aux doses habituelles, les taux de guérison d'une bilharziose à *S. mansoni*, jugés d'après l'arrêt définitif de l'excrétion des oeufs dans les selles et les urines, est d'environ 90 %. Si les lésions viscérales ne sont pas trop anciennes, et en raison de son action anti-inflammatoire non spécifique, on peut espérer une régression partielle des polypes vésicaux, des lésions génitales et même, mais plus exceptionnellement, des hépato-splénomégalias. Par contre, l'hypertension pulmonaire et les lésions neurologiques sont peu modifiées (Coulaud et Charmot, 1993). Le PZQ tue rapidement les vers adultes par action directe sur la cuticule puis sur la musculature. Il agit aussi, à un moindre degré, sur les schistosomules et les oeufs en transit dans les tissus. Son mécanisme d'action encore mal connu semble faire intervenir un brusque influx de calcium à travers le tégument du schistosome entraînant des perturbations musculaires et des altérations tégumentaires qui aboutissent à sa perméabilisation (Harnett, 1988). Par ailleurs, Fallon *et al.* (1994) ont montré que le traitement combiné de PZQ et d'anticorps anti-phosphatase alcaline de *S. mansoni* augmente de manière significative la lyse des vers femelles *in vitro*. Ceci suggère que le médicament expose cet enzyme à la surface du parasite, le rendant plus accessible au système immunitaire. Enfin, McTigue *et al.* (1995) ont constaté qu'aux doses thérapeutiques habituelles, le PZQ est capable de se lier à la glutathion S-transférase de 26 kDa de *S. japonicum* et d'inhiber son activité enzymatique. Cette observation suggère que le PZQ fragilise le parasite en inhibant cet important enzyme de détoxification (McTigue *et al.*, 1995).

Peu efficace contre les formes hépato-spléniques sévères de la maladie, l'emploi curatif du PZQ se heurte à plusieurs inconvénients (Zwingenberger *et al.*, 1990). Il ne prévient pas les réinfections qui peuvent réapparaître très rapidement en zone d'endémie. Il diminue l'immunité acquise à la réinfection (Moloney *et al.*, 1987).

Plus récemment, de nouveaux efforts ont été basés sur l'éradication des hôtes intermédiaires en utilisant par exemple des molluscicides. En effet, l'évolution endémique est fortement liée à l'augmentation du nombre de niches écologiques favorisant la multiplication des mollusques d'eau douce lors des programmes

d'assainissement et de créations de réserves d'eau (Diaw *et al.*, 1990). Malheureusement, ces efforts d'éradication des mollusques ne semblent pas très efficaces. Pour ces raisons, la lutte contre la bilharziose est surtout concentrée vers une prophylaxie médicale basée sur l'élaboration d'un vaccin, à défaut d'une chimiothérapie efficace.

## **2-La réponse immune contre *Schistosoma mansoni***

De nombreux mécanismes sont mis en place par l'hôte afin d'éliminer le parasite qui à son tour développe des stratégies de défense. Ces réactions rendent compte de la complexité des relations hôte-parasite qui se sont établies au cours de millénaires d'adaptations et de sélections réciproques.

### **2-1 Les composantes de la réponse immune**

Le parasite excrète et sécrète des antigènes qui stimulent le système immunitaire de l'hôte. L'immunité à la réinfection fait intervenir diverses populations cellulaires du système immunitaire, des anticorps et des facteurs du complément. Capron *et al.* (1983) ont clairement montré que cette immunité est thymo-dépendante: des rats athymiques sont sensibles à l'infection par *S. mansoni*.

#### **2-1-1 Mécanismes effecteurs non spécifiques**

Les stades cercaire et schistosomule peuvent activer le complément (Sher, 1976) qui est alors capable de lyser les larves précoces même en absence d'anticorps spécifiques.

Les cellules tueuses NK participent également aux mécanismes non-spécifiques de l'immunité (Abe *et al.*, 1983). Des macrophages normaux de rat activés par des IgG agrégés non spécifiques (Ottesen *et al.*, 1977) ou par certaines lymphokines comme le "Macrophage

Inhibitory Factor" (Bout *et al.*, 1981) peuvent provoquer la mort des larves en présence de complément.

Les réactions inflammatoires déclenchées par la pénétration du parasite jouent un rôle dans l'immunité protectrice chez la souris. Bout *et al.* (1986) ont montré que des plaquettes incubées avec une protéine inflammatoire produite au cours de l'infection, la "C-Reactive Protein" (CRP), sont capables de lyser les schistosomules *in vitro* en absence d'anticorps. *In vivo*, le transfert de plaquettes activées par la CRP conduit à une protection contre l'infection.

Enfin, malgré l'absence de spécificité antigénique, l'utilisation d'immunostimulants tels que le BCG conduit à une protection chez la souris (Bout *et al.*, 1977).

### **2-1-2 Mécanismes effecteurs spécifiques**

Chez le rat, l'immunité à la réinfection est principalement basée sur la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC: "Antibody Dependant Cell Cytotoxicity"). Il s'agit d'une coopération entre des cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes et des anticorps anaphylactiques (IgE et IgG2a chez le rat) spécifiques qui génère un processus larvicide. Les macrophages (Capron *et al.*, 1975), les éosinophiles (Capron *et al.*, 1981) et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1983) sont capables d'assurer cette fonction en présence d'IgE. Les mécanismes d'ADCC nécessitent l'expression de récepteurs cellulaires Fc pour les anticorps, la présence d'isotypes particuliers sous forme agrégée et parfois de signaux accessoires. L'interaction des anticorps avec la cible parasitaire d'une part et la cellule effectrice d'autre part, conduit à l'activation de la cellule qui devient alors capable de léser le parasite. Cependant, la cytotoxicité peut être inhibée par des anticorps "bloquants" de même spécificité idiotypique mais de spécificité isotypique différente. Ces anticorps (IgG2c chez le rat, IgM au cours de l'infestation humaine) n'activent pas les cellules (Capron *et al.*, 1987b).

Les lymphocytes T produisent également des lymphokines qui activent directement des populations cellulaires impliquées dans des mécanismes de cytotoxicité indépendants d'anticorps.

Toutefois, le schistosomule acquiert rapidement des antigènes de l'hôte et un tégument, ce qui le rend insensible aux attaques de l'hôte et permet son développement avec peu d'entraves jusqu'au stade de vers adulte. Le phénomène de mimétisme moléculaire se fait par acquisition de façon passive ou par synthèse de structures antigéniques analogues à celles de l'hôte (Capron, 1995). Dans ce contexte Duvaux-Miret *et al.* (1992) ont montré que les schistosomes produisent à tous les stades de leur développement des quantités significatives de  $\beta$ -endorphine, d'adrénocorticotropine (ACTH) et de l'hormone de stimulation des mélanocytes ( $\alpha$ -MSH). La libération active de ces trois neuropeptides par les schistosomes conduit à une immunosuppression des immunocytes de l'hôte intermédiaire ainsi que des monocytes de l'hôte définitif.

La formation de granulomes autour des oeufs retenus dans les tissus provient d'une stimulation des lymphocytes par des antigènes excrétés-sécrétés. Par l'intermédiaire des interleukines et des anticorps, ces lymphocytes recrutent des cellules inflammatoires qui libèrent des médiateurs toxiques et provoquent une fibrose péri-ovulaire (Phillips and Lammie, 1986).

## 2-2 Régulation de la réponse immune vis-à-vis de S. mansoni

Durant l'infection par le schistosome, les mécanismes d'ADCC sont essentiels au développement de l'immunité protectrice chez le rat (Capron *et al.*, 1987a) et chez l'homme (Hagan *et al.*, 1991). La polarisation de la réponse immunitaire de type Th2, caractérisée par une production élevée d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10, s'exprime chez l'hôte infecté par une hyperéosinophilie et l'augmentation importante de la production d'IgE et d'IgA et de certains isotypes d'IgG. Par ailleurs, l'immunité cellulaire est importante, notamment au niveau de la formation des granulomes. Elle fait intervenir les cellules Th1 par le biais d'IFN- $\gamma$  et de l'activation des

macrophages (Capron, 1992). La souris développe une réponse Th1, suite à l'injection de parasites irradiés, tandis que l'infection naturelle oriente une réponse vers le type Th2. Les deux composantes peuvent même coexister selon le protocole d'immunisation (Grzych *et al.*, 1991). La formation du granulome est généralement caractérisée par une réponse DTH médiée par les lymphocytes Th1. Cependant, une étude a montré la présence d'ARNm de l'IL-2 et surtout d'IL-4 dans des foies granulomateux (Henderson *et al.*, 1991). L'IL-10, produite par les cellules Th2 pourrait jouer une rôle immunomodulateur en inhibant la synthèse d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 par les cellules Th1. Ces résultats indiquent que l'expression de l'immunité protectrice et des réactions pathologiques est régulée par un réseau complexe de populations cellulaires et de lymphokines.

### **3-Stratégies vaccinales contre les bilharzioses**

La complexité des mécanismes de l'immunité chez l'homme et l'animal de laboratoire, amplifiée par une série de subterfuges mis en place par le parasite, tels le mimétisme moléculaire (Capron, 1995) freinent malheureusement le développement d'un vaccin anti-bilharzien.

Un vaccin même partiellement efficace qui réduirait la morbidité des populations, limiterait les formes aiguës de la maladie, et contrôlerait sa transmission, serait déjà extrêmement utile (Butterworth, 1992). Le vaccin idéal devrait être composé d'antigène(s) protecteur(s) incapables de générer des anticorps bloquants, et capables de réduire le niveau de fécondité parasitaire et de réinfection.

#### **3-1 Larves atténées**

L'atténuation des larves par des agents chimiques, des rayons X ou  $\gamma$  afin d'empêcher la maturation complète du ver, aboutit à un vaccin vivant protecteur (Taylor and Bickle, 1986). Cependant, les doses ne doivent pas altérer la migration des larves, condition nécessaire pour le déclenchement d'une réponse immune. Malgré son efficacité, ce vaccin

atténué reste inutilisable pour des raisons de sécurité et d'éthiques évidentes (Bergquist, 1995). Toutefois, il constitue un puissant modèle d'étude des mécanismes de résistance.

### **3-2 Vaccins non vivants**

#### ***3-2-1 Extraits parasitaires***

Les préparations d'antigènes solubles correspondent à un stade particulier de développement du parasite. On distingue l'antigène d'adulte SWAP ("Soluble Worm Antigen Preparation") et l'antigène d'oeuf SEA ("Soluble Egg Antigen"). Les résultats d'immunisation avec le SWAP sont variables suivant le mode d'injection ou le type d'adjuvant utilisé. L'une des voies d'administration les plus efficaces chez la souris est la voie intradermique en présence de BCG. Cette immunisation a conduit à une réduction de 50 % de la charge en ver (James and Sher, 1990).

#### ***3-2-2 Utilisation combinée d'oeufs et d'IL-12***

Récemment, Wynn *et al.* (1995) ont montré que l'administration simultanée d'oeufs de schistosome et d'IL-12 inhibe partiellement la formation du granulome et la fibrose tissulaire induite lors de l'infection par *S. mansoni* chez la souris. Ce vaccin anti-parasitaire n'empêche pas l'infection par *S. mansoni* mais semblerait prévenir la pathologie provoquée par les oeufs.

#### ***3-2-3 Antigènes purifiés***

Le transfert passif d'anticorps issus de modèles expérimentaux ou de malades infectés devenus résistants à la réinfection a grandement facilité l'identification de plusieurs déterminants antigéniques de nature protéique ou glycoprotéique. Par ailleurs, l'utilisation de sondes monoclonales a permis l'identification de plusieurs antigènes protecteurs. Deux méthodes permettent d'évaluer la qualité d'une sonde monoclonale:

la capacité d'induire une cytotoxicité *in vitro* vis-à-vis des larves infestantes ou de conférer une protection contre l'infection par transfert passif. Grâce à cette stratégie, plusieurs antigènes protecteurs de schistosome ont été identifiés.

Deux antigènes de 53 et 155 kDa, purifiés à partir du ver adulte par chromatographie d'affinité à l'aide d'un anticorps monoclonal, protègent la souris et le macaque à raison de 21 % et 41 % respectivement contre l'infection d'épreuve (Smith and Clegg, 1985).

Une glycoprotéine de 38 kDa, présente à la surface du schistosomule et partageant des épitopes communs avec l'hôte intermédiaire (*Biomphalaria glabrata*) et l'hémocyanine (KLH: "Keyhole Limpet Hemocyanin") a également été caractérisée (Dissous *et al.*, 1986). L'immunisation par la KLH induit une protection de 50 à 75 % dans divers modèles expérimentaux (Grzych *et al.*, 1987). Un anticorps monoclonal IgG2a dirigé contre un déterminant glucidique de la 38 kDa est doué d'un pouvoir cytotoxique *in vitro* et induit une protection par transfert passif (Grzych *et al.*, 1982). Par ailleurs, la production d'anticorps anti-idiotypiques mimant stériquement l'épitope glycanique de la 38 kDa, a permis d'obtenir un effet protecteur chez la souris (Grzych *et al.*, 1985).

Une protéine de 97 kDa isolée du ver adulte par chromatographie d'immunoaffinité et identifiée comme étant une paramyosine confère une protection de 30 % chez la souris lorsqu'elle est injectée en présence de BCG (Pearce *et al.*, 1988).

Une glycoprotéine de 68 kDa, purifiée à partir du ver adulte, protège la souris infestée à raison de 30 à 66 % (King *et al.*, 1988).

D'autres protéines potentiellement vaccinantes induisent des degrés de protection significatifs dans différents modèles animaux (Bergquist, 1995). Une protéine musculaire de 62 kDa désignée IrV-5 ("Irradiation-associated vaccine antigen") protège le rat à 95 %. La triose phosphate isomérase (TPI), présente à tous les stades du développement parasitaire, est une enzyme de 28 kDa qui induit chez la souris des taux de

Antigène	P.M. (Kda)	Stade Parasitaire	Fonction	% de Protection		
				Souris	Rat	Autre
Glutathion S-transférase (Sm28GST)	28	schistosomule ver adulte	enzyme	30-60	40-60	40 (Babouin)
Paramyosine (Sm97)	97	schistosomule ver adulte	proteine musculaire	30		
Irradiated-associated vaccine antigen (IrV-5)	62	tous les stades	proteine musculaire	50-70	95	25 (Babouin)
Triose-phosphate isomérase (TPI)	28	tous les stades	enzyme	30-60		
Sm23	23	tous les stades	antigène membranaire	40-50		
Fatty acid binding protein (FABP)-14	14	schistosomule	antigène membranaire	65		90-100 (Lapin)

Tableau 4: Principaux candidats vaccinaux contre la schistosomiase. D'après Bergquist (1995).

protection variant de 30 à 60 %. La Sm23 est un antigène membranaire de 23 kDa protégeant la souris à raison de 40 à 50 %. La "Fatty acid binding protein" (FABP-14 ou Sm14) est un antigène membranaire présent au stade schistosomule et protégeant la souris et le lapin à raison de 65 % et de 90-100 %, respectivement.

Enfin, un antigène de *S. mansoni* de 28 kDa (Balloul *et al.*, 1985), ayant une activité glutathion S-transférase (Sm28GST) semble très prometteur (Taylor *et al.*, 1988). L'effet protecteur de la Sm28GST a été montré dans plusieurs modèles expérimentaux (Balloul *et al.*, 1985, 1987a et 1987b; Boulanger *et al.*, 1991; Grezel *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993; Pancré *et al.*, 1994; Boulanger *et al.*, 1995). Les principales molécules vaccinales contre la schistosomiase sont reprises dans le tableau 4.

# Chapitre 4: La Sm28GST

## 1-Identification et fonction de la Sm28GST

A l'aide d'anticorps provenant d'animaux immunisés avec le parasite, une quinzaine d'antigènes ont été identifiés dans des extraits bruts ou des excréta parasitaires. L'un de ces antigènes, découvert dans les produits d'excrétion du parasite adulte, semblait particulièrement intéressant car on le trouvait également à la surface des larves. Cet antigène d'un poids moléculaire de 28 kDa (P28) (Balloul *et al.*, 1985) était également présent dans le tégument et dans d'autres parties du ver adulte. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la P28 ont ensuite permis de la purifier par immunoprécipitation.

L'ADN codant la P28 a été cloné et séquencé après criblage d'une banque d'expression (Balloul *et al.*, 1987b). La comparaison de la séquence protéique de la P28 de 211 acides aminés a montré des homologies avec la famille des glutathion S-transférases (GSTs), enzymes répandues dans tout le règne animal et végétal et essentielles au métabolisme cellulaire (Taylor *et al.*, 1988). L'ADN complet de la P28, alors baptisée Sm28GST, fut sous-cloné et exprimé chez *E. coli* (Balloul *et al.*, 1987b), *Saccharomyces cerevisiae* (Loison *et al.*, 1989) ainsi que chez le virus de la vaccine (résultat non publié). L'ADN génomique codant la Sm28GST a été cloné et séquencé.

Le gène complet possède une taille d'environ 5,5 kb et renferme 4 exons (McNair, *et al.*, 1993).

Chez les helminthes, les GSTs paraissent occuper une fonction importante de protection contre les composés réactifs générés par les radicaux libres. Ceci est d'autant plus important que les helminthes possèdent un nombre limité d'enzymes de réparation et semblent dépourvus de cytochromes P-450 (Precious and Barrett, 1989). Ces derniers jouent en effet un rôle essentiel dans les processus d'oxydo-réduction constitutifs de la phase primaire de détoxification chez les mammifères (Coon and Vaz, 1988).

La libération des radicaux oxydants représente un puissant mécanisme effecteur contre les agents pathogènes intra- et extracellulaires (Hughes, 1988). Ces composés oxygénés, à action délétère, ont de multiples origines. Ils dérivent du métabolisme cellulaire ou d'une réponse de l'hôte par l'intermédiaire de phagocytes activés (Joseph *et al.*, 1980). Certaines cellules du système immunitaire telles que les plaquettes, les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages peuvent générer des radicaux libres lorsqu'elles sont activées par le complément ou les anticorps.

Toutefois, les parasites ne sont pas systématiquement tués par ces composés oxydants. En effet, ils possèdent des systèmes d'élimination et de détoxification capables d'inactiver ces composés. Les mécanismes de défense du parasite comprennent plusieurs types d'enzymes détoxifiantes comme la catalase, la cytochrome c peroxydase, la superoxyde dismutase (Cordero Da Silva *et al.*, 1992) et les enzymes dépendantes du glutathion dont font partie les glutathion peroxydases (Roche *et al.*, 1994) et les GSTs (Brophy and Barrett, 1990).

Les GSTs sont des enzymes ubiquistes qui catalysent l'attaque nucléophile du glutathion (GSH:  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) d'une large gamme de composés hydrophobes. Ceux-ci peuvent être des substrats exogènes ou endogènes résultant du métabolisme oxydatif. La conjugaison du GSH diminue la réactivité et augmente le caractère hydrophile de ces molécules toxiques, favorisant ainsi leur solubilisation et leur élimination sous forme

inactivée (Boyland and Chasseaud, 1969). Il semble que chez les helminthes, les GSTs puissent également constituer de puissants agents de résistance contre des médicaments. Chez *S. mansoni*, les GSTs catalysent une réaction d'O-déméthylation d'un métabolite du métrifonate, une substance anti-helminthique (O'Leary and Tracy, 1991).

A côté du rôle essentiel de ces enzymes dans la protection des tissus face aux dommages oxydatifs, les GSTs peuvent parfois participer à la synthèse de molécules physiologiquement actives telles que les prostaglandines, les leucotriènes C4, et jouer un rôle dans le transport et le stockage intracellulaire de molécules lipophiles (Ketterer *et al.*, 1988).

La mise en évidence du rôle primordial des GSTs dans la physiologie et dans les mécanismes de défense du schistosome face aux effecteurs du système immunitaire, suggère que leur inactivation pourrait augmenter la vulnérabilité du schistosome.

## **2-La famille des GSTs chez les schistosomes**

### **2-1 Les différentes formes de GST chez le schistosome**

Essentiellement retrouvées dans le cytosol, les GSTs des helminthes montrent des ressemblances biochimiques et séquentielles avec les GSTs de mammifères.

Les schistosomes possèdent deux familles de GSTs, dont les poids moléculaires sont de 26 et 28 kDa (Balloul *et al.*, 1987a; Trottein *et al.*, 1990 et 1992). *S. mansoni* possède trois formes variantes de GST28 appelées SmGST-1, SmGST-2 et SmGST-3 (Pierce *et al.*, 1994). Les isoenzymes natives sont des dimères. SmGST-1 et SmGST-3 se présentent sous forme homodimérique alors que SmGST-2 est un hétérodimère composé d'une sous-unité SmGST-1 et d'une sous-unité SmGST-3.

La comparaison des séquences peptidiques des GSTs de 28 kDa de *S. mansoni*, *S. bovis*, *S. haematobium* et *S. japonicum* montre que Sb28GST et Sh28GST sont identiques à 97 % et que Sh28GST et Sm28GST

sont identiques à 90 %, tandis que Sb28GST et Sm28GST présentent un degré de conservation de 92 %. Les niveaux d'identités de Sj28GST avec Sb28GST, Sm28GST et Sh28GST sont moins marqués: 78 %, 77 % et 76 %, respectivement (Trottein *et al.*, 1992). Par contre, la similitude de séquence entre les deux formes de 28 kDa et de 26kDa de *S. mansoni* n'est pas très significative (Trottein *et al.*, 1990).

Les GSTs de mammifères sont divisées en trois classes ( $\alpha$ ,  $\mu$  et  $\pi$ ) en fonction de leur structure et de leur activité enzymatique. La Sm26GST est associée aux GSTs de classe  $\mu$ . La Sm28GST possède des similitudes de structure limitées avec les GSTs de classe  $\alpha$  et  $\mu$  mais présente une activité enzymatique caractéristique des GSTs de classe  $\pi$  (Taylor *et al.*, 1988). Ces similitudes de structure sont aussi présentes chez la Sj28GST. Cependant malgré cette conservation de structure entre les GSTs des schistosomes et celles des mammifères, aucune réaction immunologique croisée n'a été observée entre ces protéines parasites et les GSTs correspondantes chez le rat et chez l'homme (Taylor *et al.*, 1988).

## 2-2 Sites d'expression de la Sm28GST

A tous les stades du développement, les helminthes contiennent une activité GST. Il semble que dans ce phylum, les GSTs sont cytosoliques plutôt que microsomaux. Chez *S. mansoni*, la Sm28GST est présentée à la surface des cellules protonéphridiales (Balloul *et al.*, 1987a). Des expériences d'immunocytochimie ont montré que la Sm26GST et la Sm28GST sont localisées dans le tégument et/ou dans les tissus subtégumentaux (Taylor *et al.*, 1988; Trottein *et al.*, 1990). Une étude récente a montré la présence d'ARNm spécifiques de la Sm28GST au niveau des miracidiums, des cercaires et des vers adultes. Des expériences d'immuno-marquage ont montré la présence de la protéine dans les oeufs au niveau du granulome hépatique et dans le stade larvaire miracidium. Cependant, les oeufs immatures contenus dans l'ootype et localisés au niveau du tractus génital des femelles ne semblent pas contenir la Sm28GST (Porchet *et al.*, 1994).

Chez les schistosomes, l'activité des GSTs peut augmenter au cours du développement et d'une façon différentielle, en fonction du sexe. Elle est trois fois plus élevée chez le mâle que chez la femelle (O'Leary and Tracy, 1991).

### **3-Pouvoir protecteur de la Sm28GST et son effet sur la ponte**

L'immunisation avec la molécule native purifiée à partir du parasite a conduit à des degrés de protection hautement significatifs allant de 45 % chez la souris à 70 % chez le rat (Balloul *et al.*, 1987a). La protection obtenue avec la protéine recombinante purifiée à partir de *E. coli* reproduit les niveaux de protection initialement observés chez les rongeurs (Balloul *et al.*, 1987b). L'immunisation avec la protéine recombinante a également permis l'obtention d'une protection significative chez le babouin pouvant atteindre 80 %. Toutefois, d'importantes variations individuelles sont notées et une moyenne de 40 % de réduction de la charge parasitaire est enregistrée chez ce modèle primate (Balloul *et al.*, 1987c; Boulanger *et al.*, 1991).

L'immunisation avec la Sm28GST recombinante contribue également à une diminution significative du volume du granulome, à la réduction de la fécondité des vers femelles et de la viabilité des oeufs chez les rongeurs et les primates (Boulanger *et al.* 1991; Xu *et al.*, 1991 et 1993). Des travaux réalisés avec la Sb28GST de *S. bovis* (Trottein *et al.*, 1992) montrent que l'excrétion des oeufs et leur densité tissulaire sont réduites, malgré l'absence d'une diminution effective de la charge parasitaire chez le veau (Bushara *et al.*, 1993). Par contre, des chèvres immunisées avec la Sb28GST recombinante et infestées expérimentalement par *S. bovis* montrent une réduction significative de la charge parasitaire sans réduction de la fécondité des vers femelles (Boulanger *et al.*, 1994). Ces résultats semblent donc indiquer des différences importantes de l'effet de la vaccination avec Sb28GST en fonction de l'espèce animale. Le singe *patas* immunisé avec la Sm28GST recombinante, puis infesté expérimentalement avec les cercaires de *S. haematobium* développe une diminution marquée de la fécondité des vers et de la viabilité des oeufs, suggérant une capacité de protection croisée

(Boulanger *et al.*, 1995). Ces résultats soulignent les potentialités vaccinales de la Sm28GST pour contrôler la pathologie induite par les oeufs et la transmission des schistosomes en Afrique.

Des études *in vitro* ont suggéré que l'activité neutralisante d'anticorps IgA sériques est responsable de l'effet anti-fécondité. En effet, des anticorps humains IgA spécifiques inhibent la ponte et la viabilité des oeufs *in vitro*, alors que le peptide de synthèse correspondant à la région C-terminale de la Sm28GST bloque cet effet inhibiteur (Grezel, 1992). De plus, Grzych *et al.* (1993) associent le taux d'IgA spécifiques de la Sm28GST et la capacité de neutraliser l'activité enzymatique à l'acquisition de l'immunité protectrice chez une population résidant en zone d'endémie. D'autre part, des expériences de transfert passif chez la souris d'un anticorps monoclonal d'isotype IgA, spécifique de la Sm28GST, inhibe la ponte des vers femelles (Grezel, 1992).

#### **4-Utilisation d'anticorps monoclonaux**

Le transfert passif de deux anticorps monoclonaux anti-Sm28GST, S13 (bloquant l'activité enzymatique) et H12 (ne bloquant pas l'activité), d'isotype IgM, protège significativement le rat Fischer contre l'infection (Xu *et al.*, 1991). Chez la souris BALB/c, une diminution de la fécondité des vers femelles et de la viabilité des oeufs est observée lorsque S13 est transféré. Par contre, aucun effet concernant la production ou l'éclosion des oeufs n'est observé chez les souris traitées avec H12. Des vers incubés *in vitro* en présence de S13 produisent significativement moins d'oeufs que ceux incubés avec H12 (Xu *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent l'existence de deux mécanismes effecteurs différents induits lors de l'immunisation avec la Sm28GST. L'effet sur la charge parasitaire semble être indépendante de l'activité GST, tandis que l'effet sur la fécondité des vers femelles et la viabilité des oeufs semble être étroitement lié à l'inactivation du site enzymatique.

## **5-La réponse T**

Bien que la réponse humorale joue un rôle important dans l'immunité contre la fécondité, l'immunité cellulaire dirigée contre la Sm28GST semble également être capitale. Elle pourrait être impliquée dans la protection contre les dommages hépatiques. Ceci a été déterminé en mesurant le contenu en collagène présent dans le foie de souris infectées. Dans ce modèle, les souris immunisées avec une seule dose de Sm28GST recombinante développent des réponses CD4<sup>+</sup> Th1 et CD8<sup>+</sup> spécifiques. De plus, les effets protecteurs peuvent être complètement abolis par l'administration d'anticorps anti IFN-γ, suggérant le rôle fondamental de cette cytokine dans l'expression de l'immunité protectrice obtenue après immunisation avec la Sm28GST recombinante (Pancré *et al.*, 1994).

## **6-Identification des épitopes majeurs**

La réponse dirigée contre la Sm28GST génère chez le babouin et le rat une forte production d'IgE qui peut induire une cytotoxicité *in vitro* contre le schistosomule via les plaquettes ou les éosinophiles (Boulanger, *et al.*, 1991; Grezel *et al.*, 1993). Dans le modèle murin, l'immunité protectrice implique des mécanismes de cytotoxicité cellulaire indépendants d'anticorps, dans lesquels interviennent la production d'IFN-γ (Wolowczuk *et al.*, 1989), de TNF-α (Damonneville *et al.*, 1990) et d'IL-6 (Pancré *et al.*, 1990). Un vaccin idéal contre la schistosomiase doit être hautement immunogène et induire à la fois des réponses immunes B et T. Pour cette raison, l'intérêt vaccinal de la Sm28GST a justifié la nécessité d'étudier et de caractériser les épitopes protecteurs de la protéine.

### **6-1 Chez le rat**

Le transfert de lymphocytes T spécifiques de la Sm28GST, issus de rats immunisés avec la protéine native, induit chez le rat receveur infesté par *S. mansoni* l'apparition d'anticorps anti-Sm28GST. L'augmentation de ces taux d'anticorps semble être corrélée avec le taux de protection observé (45 à 85 %). Ces résultats montrent que la Sm28GST possède des épitopes capables d'activer les cellules Th, qui confèrent une

immunité protectrice via la production d'anticorps cytotoxiques (Auriault *et al.*, 1987).

Une analyse d'hydrophobicité, d'accessibilité et de mobilité de la séquence protéique a permis de prédire trois régions épitopiques particulières: 24-43, 115-131, 140-153. Les peptides correspondants ont été synthétisés et ont permis d'identifier des épitopes B et T majeurs dans ces régions chez le rat infecté. Les peptides 24-43 et 115-131 contiennent des épitopes pour les IgG2a mais pas pour les IgE (Auriault *et al.*, 1988) et induisent une importante prolifération des lymphocytes dans les rats immunisés avec la Sm28GST (Wolowczuk *et al.*, 1990). Les anticorps dirigés contre le peptide 24-43 sont cytotoxiques pour le schistosomule *in vitro*. Le peptide 140-153 contient également une cible pour les lymphocytes T spécifiques de la Sm28GST (Auriault *et al.*, 1988). Par ailleurs, le transfert passif d'une lignée cellulaire Th spécifique du peptide 24-43 chez le rat immunisé par la Sm28GST, augmente la production d'IgE sans affecter le taux d'IgG. Il se pourrait donc que l'épitope présent dans peptide 24-43 intervienne dans la sélection de populations lymphocytaires T impliquées dans la régulation de la synthèse d'IgE par le biais de la production d'IL-4 et d'IL-5 (Auriault *et al.*, 1988).

### 6-2 Chez la souris

Des lymphocytes provenant de souris immunisées avec du SWAP, des extraits de schistosomules ou du SEA répondent à une restimulation par le peptide 24-43 ou le peptide 115-131. De plus, des lymphocytes de souris infestées expérimentalement par *S. mansoni* prolifèrent en présence des peptides 24-43 et 115-131 (Wolowczuk *et al.*, 1990).

### 6-3 Chez l'homme

La Sm28GST ainsi que les peptides 24-43, 115-131 et 140-153 ont été testés pour évaluer la réponse humorale chez des enfants kenyans précédemment classés comme susceptibles ou résistants à la réinfection après chimiothérapie. La protéine entière ainsi que les peptides 24-43 et 140-

153 peuvent être utilisés pour détecter des IgG, des IgE et des IgA spécifiques. Une importante réponse de type IgG4 est observée chez les individus susceptibles par rapport aux individus résistants. Ce résultat suggère que l'isotype IgG4 pourrait être corrélé à l'absence d'immunité chez les patients susceptibles. Une importante réponse IgG3 est observée contre le peptide 140-153 mais ne permet pas de discriminer entre les populations susceptibles et résistantes. Au contraire, une augmentation significative des IgA spécifiques du peptide 140-153 est détectée dans le sérum des patients résistants (Auriault *et al.*, 1990).

Les lymphocytes d'enfants infestés vivant en zones d'endémie peuvent être restimulés par la Sm28GST chez 75 % d'entre eux. La reconnaissance des peptides est variable en fréquence et en intensité, le meilleur étant le peptide situé en position C-terminale de la protéine, dans la région 190-211.

La région 115-131 semble contenir des épitopes T et B dans différents modèles expérimentaux. L'immunisation par un octamère ou "octopus", comprenant 8 copies répétées du peptide 115-131 branchées sur un cœur de polylysine, est immunogène chez le rat, la souris et le babouin. Des sérums anti-octopus provenant de rats immunisés induisent une cytotoxicité anti-larvaire. Des rats immunisés avec "l'octopus" sont partiellement protégés. Parallèlement, une augmentation du taux d'IgG et d'IgE spécifiques a été observée. Ces résultats confirment le rôle important de cet épitope dans la protection (Wolowczuk *et al.*, 1991).

Sur la base de ces informations, il apparaît que l'immunisation avec la Sm28GST génère plusieurs mécanismes effecteurs indépendants et complémentaires:

-un effet sur la réduction de la charge parasitaire lié à l'isotype IgE et qui ne semble pas dépendre de l'activité enzymatique de la protéine

-un effet sur la fécondité des vers femelles et sur la viabilité des œufs qui semble faire intervenir le site enzymatique de l'enzyme et l'isotype IgA

-une réponse T intervenant dans la réduction des dommages hépatiques.

Deuxième partie:

**CADRE ET OBJECTIFS DE LA  
RECHERCHE**

La vaccination constitue à l'heure actuelle une des méthodes les plus rentables pour prévenir les maladies infectieuses. Malgré l'effort mené par l'OMS pour étendre son programme de vaccination, plus de 20 millions de personnes meurent chaque année de maladies infectieuses. La principale difficulté consiste à pouvoir protéger un nombre suffisant d'individus, essentiellement dans les PVD particulièrement exposés aux maladies infectieuses et parasitaires. Certaines d'entre elles, telle que la bilharziose, continuent même à s'étendre.

La pathogénie de la bilharziose est essentiellement liée à la fécondité des vers femelles. La formation du granulome autour des oeufs, en particulier dans le foie, conduit au développement de lésions fibreuses souvent irréversibles. Bien que des médicaments actifs comme le PZQ aient prouvé leur efficacité en réduisant les formes sévères de la maladie, ils n'ont que peu d'effets sur les manifestations hépato-spléniques installées et affectent peu le potentiel de transmission de l'infection. Des études épidémiologiques ont montré qu'une réduction significative bien que partielle, de l'ordre de 60 %, de la charge parasitaire diminuerait de manière considérable les manifestations pathologiques tout en affectant, à terme, le potentiel de transmission (Butterworth, 1992). Ainsi, il apparaît qu'une stratégie vaccinale conduisant à l'induction de mécanismes effecteurs capables de réduire simultanément la charge parasitaire et la fécondité des vers femelles, affecterait profondément les manifestations pathologiques en même temps que la transmission du parasite.

A ce titre, la Sm28GST constitue un candidat vaccinal très prometteur pour lutter contre la bilharziose. En effet, l'immunisation avec la Sm28GST recombinante, en présence de certains adjuvants, conduit à une réduction partielle mais significative des vers adultes ainsi qu'à une réduction marquée de la fécondité parasitaire et de la viabilité des oeufs. L'antigène peut également être délivré sous la forme de vaccins synthétiques (liposomes, ISCOMs, microsphères). Par ailleurs, un certain nombre de vecteurs bactériens vivants exprimant la Sm28GST complète ou certains de ses peptides qui en dérivent, sont également en cours d'expérimentation:

- une souche de *Bordetella pertussis* recombinante où la Sm28GST est fusionnée à l'hémagglutinine filamentuse (FHA). Cette souche présente un intérêt particulier par sa capacité à induire une réponse IgA après son administration intranasale chez la souris (Renauld *et al.*, 1995).

- une souche de *Salmonella typhimurium* exprimant la Sm28GST sous contrôle du promoteur *nirB*. Cette souche exprime très peu la Sm28GST et est très faiblement immunogène. Par contre, lorsque la Sm28GST est fusionnée au fragment C de la toxine téstanique (TetC), le niveau d'expression de la protéine de fusion est très significativement accru. De plus, une réponse protectrice contre le téstanos et la schistosomiase est obtenue chez des souris immunisées par une seule injection avec cette souche recombinante (Khan *et al.*, 1994a). La protection est caractérisée par une réduction de la charge parasitaire mais pas par une diminution de la fécondité larvaire. Il a été montré que ces anticorps anti-Sm28GST sont incapables d'inhiber l'activité enzymatique, l'inhibition étant corrélée à l'effet anti-fécondité (G. Riveau, communication personnelle).

Notre démarche consiste à utiliser le BCG comme vecteur vivant recombinant dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la bilharziose.

Le BCG présente un intérêt tout particulier car il répond à de multiples critères importants pour constituer un vaccin "idéal" adapté notamment aux PVD (Bloom, 1989). Le BCG est largement utilisé depuis 1948 et a été administré à plus de 3 milliards de personnes pour lutter contre

la tuberculose (Colditz *et al.*, 1994), avec une faible fréquence d'effets secondaires graves. D'autre part, la paroi mycobactérienne agit comme adjuvant puissant en augmentant la réponse immunitaire dirigée contre divers antigènes. Par ailleurs, ne semblant pas être affectée par la présence d'anticorps maternels, l'administration du BCG peut se faire dès la naissance. Le BCG survit longtemps dans l'individu vacciné et dès lors, une seule injection suffit souvent pour générer une immunité cellulaire durable pour plusieurs années (Bloom, 1989). Enfin, il est relativement thermostable (ne nécessite pas de chaîne de froid), et peu coûteux à produire.

L'utilisation du BCG reste, pour l'instant, toujours limitée à la vaccination contre la tuberculose. Il suscite toutefois un intérêt particulier comme véhicule vaccinal multivalent, et ceci depuis qu'il est possible d'introduire de l'ADN dans le BCG. L'expression de divers gènes bactériens, viraux ou parasitaires a déjà été montrée. Dans un certain nombre cas, une réponse immunitaire spécifique dirigée contre l'antigène d'intérêt a été obtenue chez des animaux immunisés. Un BCG recombinant exprimant l'antigène OspA de *Borrelia burgdorferi* et induisant une immunité protectrice chez la souris contre la maladie de Lyme (Stover *et al.*, 1993) est même en cours d'expérimentation chez l'homme.

En dépit de leur importance en tant que pathogènes bactériens, très peu d'informations sont actuellement disponibles concernant la génétique mycobactérienne. Ce manque de progrès est principalement lié (i) à la croissance très lente des mycobactéries (le temps de génération du BCG étant d'environ 24 heures), (ii) à l'hydrophobicité des mycobactéries qui ont tendance à former des agrégats, (iii) à la richesse en lipides de la paroi rendant le BCG réfractaire aux techniques classiques de lyse, (iv) à la faible efficacité de transformation, (v) au faible niveau de recombinaison homologue ou d'échange allélique, et (vi) au spectre limité de marqueurs de résistance et de vecteurs de clonage adéquats. D'autre part, l'expression génique dans le BCG nécessite l'utilisation des signaux homologues, dont les consensus ne sont pas connus.

Ainsi, confronté à la lente multiplication du bacille, un sujet de recherche destiné à développer un BCG recombinant dans le cadre d'une

stratégie vaccinale doit être abordé simultanément par de multiples approches. A ce titre, plusieurs objectifs majeurs ont été menés de front.

L'expression de gènes codant des protéines d'intérêt vaccinal nécessite de disposer de signaux d'expression fonctionnels chez le BCG. Notre premier objectif a donc été d'évaluer différents signaux d'expression géniques, puis d'élaborer des vecteurs d'expression d'antigènes hétérologues chez le BCG. Le système d'expression d'antigènes hétérologues doit être suffisamment efficace pour générer une réponse immunitaire protectrice. Notre choix s'est porté tout d'abord sur les signaux d'expression du gène 85A de *M. tuberculosis* puis sur ceux du gène *hsp60* de BCG pour l'expression de la Sm28GST. Les deux souches recombinantes de BCG ont été administrées à des souris et la réponse immunitaire dirigée contre la Sm28GST a été évaluée.

L'élaboration et le maintien d'une souche recombinante passe par la sélection de caractères génétiques exogènes à l'aide de marqueurs phénotypiques. L'utilisation de marqueurs de résistance aux antibiotiques étant incompatible avec les exigences vaccinales, nous nous sommes donnés comme but la mise au point d'un système de sélection ne faisant pas appel aux antibiotiques chez les mycobactéries.

Un autre objectif a consisté à mettre en oeuvre un système utilisant un marqueur fluorescent (la "Green Fluorescent Protein") afin de faciliter l'identification de nouveaux promoteurs mycobactériens plus efficaces pour l'expression d'antigènes hétérologues chez le BCG.

Au laboratoire, la pression de sélection permet le maintien de l'information plasmidique au sein de la bactérie recombinante. *In vivo*, en condition non sélective, l'information exogène doit être stabilisée dans le chromosome bactérien. Nous nous sommes donc fixés comme dernier objectif la mise au point d'un système de stabilisation de cette information par recombinaison homologue.

Troisième partie:

**DEVELOPPEMENT DE VECTEURS  
D'EXPRESSION CHEZ LE BCG**

## **1-Construction d'un BCG recombinant sécrétant la Sm28GST**

La mise au point d'un vecteur vivant exprimant des antigènes vaccinaux nécessite de disposer de signaux d'expression géniques fonctionnels. Malheureusement, il existe des barrières génétiques limitant l'expression de gènes étrangers dans certains genres bactériens. Cette situation est accentuée chez les mycobactéries où les signaux provenant d'autres genres bactériens ne fonctionnent que rarement. L'utilisation de séquences promotrices homologues permet cependant d'exprimer des gènes hétérologues.

Nous avons donc utilisé dans un premier temps les signaux d'expression de l'antigène 85A de *M. tuberculosis*. Cet antigène fait parti du complexe antigénique 85 (composé des protéines 85A, B et C) et représente un complexe protéique majeur chez les mycobactéries à croissance lente. Les gènes codant ces protéines ont déjà été clonés pour un certain nombre d'espèces mycobactériennes, dont *M. tuberculosis*, BCG, *M. leprae*.

Par ailleurs, le BCG survit à l'intérieur du phagosome macrophagique parfois durant plusieurs années. Les antigènes cytoplasmiques de la bactérie sont généralement présentés au système immunitaire au moment de la lyse bactérienne. Par contre, le devenir des protéines sécrétées par la mycobactérie reste encore mal connu. Stover *et al.* (1993) ont étudié la relation entre la localisation cellulaire de l'antigène OspA de *Borrelia burgdorferi* chez le BCG et le taux d'anticorps anti-OspA induits chez la souris immunisée avec le BCG recombinant. L'antigène OspA était soit produit dans le cytoplasme, soit sécrété, soit exporté à la

surface du BCG sous forme lipoprotéique. Le plus haut titre en anticorps était généré lorsque OspA était exportée sous forme lipoprotéique. L'exportation et/ou la présence du groupement lipidique associé à OspA sont probablement à l'origine de la forte réponse immune observée. La sécrétion induisait une réponse humorale d'intensité intermédiaire entre les formes exportée et cytoplasmique. Ainsi, la sécrétion pouvait donc constituer une voie de présentation particulièrement favorable pour développer une réponse immunitaire spécifique dirigée contre la Sm28GST. La volonté d'obtenir la sécrétion de la Sm28GST par le BCG a justifié l'utilisation des signaux de sécrétion de l'antigène 85A.

#### *1-1 Analyse de la région promotrice du gène codant l'antigène 85A de M. tuberculosis*

Afin d'apporter des éléments nouveaux relatifs à la structure et la fonction des promoteurs mycobactériens, nous avons analysé la région promotrice contrôlant l'expression de l'antigène 85A de *M. tuberculosis* dans des systèmes mycobactériens (BCG et *M. smegmatis*). Dans ce but, nous avons construit un vecteur d'expression/sécrétion dans lequel un gène rapporteur d'exportation a été placé sous le contrôle des séquences du promoteur et du peptide signal de l'antigène 85A. Une cartographie fine du promoteur a été obtenue par des délétions progressives de la région promotrice. Par ailleurs, la localisation précise du nucléotide d'initiation de la transcription a été identifiée par la technique d'extension d'amorce.

#### *1-2 Construction et immunogénicité d'une souche de BCG exprimant et sécrétant la Sm28GST sous contrôle des signaux de l'antigène 85A*

Pour obtenir une souche de BCG capable d'exprimer et de sécréter la Sm28GST, nous avons placé le gène codant l'antigène sous le contrôle des signaux précédemment identifiés de l'antigène 85A. L'analyse par immunoempreinte indique que le BCG recombinant exprime et sécrète la Sm28GST. La réponse immunitaire cellulaire et humorale spécifique induite par ce BCG recombinant a ensuite été évaluée dans le modèle

murin. Une réponse cellulaire spécifique mais de faible intensité a pu être détectée.

L'ensemble des résultats obtenus est documenté dans la publication intitulée: "Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region".

## Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A Antigen Promoter Region

LAURENT KREMER,<sup>1,2</sup> ALAIN BAULARD,<sup>1</sup> JÉRÔME ESTAQUIER,<sup>2</sup> JEAN CONTENT,<sup>3</sup>  
ANDRÉ CAPRON,<sup>2</sup> AND CAMILLE LOCHT<sup>1\*</sup>

Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM CJF9109,<sup>1</sup> and Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM 167-CNRS 624,<sup>2</sup> Institut Pasteur, F-59019 Lille Cedex, France, and Department of Virology, Institut Pasteur du Brabant, B-1180 Brussels, Belgium<sup>3</sup>

Received 24 June 1994/Accepted 21 November 1994

A mycobacterial expression-secretion vector was constructed in which the *Escherichia coli* alkaline phosphatase (*phoA*) reporter gene was placed under the control of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A promoter and secretion signal sequences. In recombinant *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG, PhoA activity could readily be detected on the mycobacterial cell surface and in the culture supernatant, indicating that the 85A signals can drive heterologous expression and secretion in both species. In contrast to the mycobacteria, the 85A promoter did not function in *E. coli*. We mapped the promoter region by progressive deletions using BAL 31 exonuclease and by primer extension analysis. Insertion and deletion mutations within the promoter region indicated that, unlike most *E. coli* promoters but similar to *Streptomyces* promoters, the position of the putative -35 region was not critical for efficient promoter activity. In addition, we investigated the ability of the identified signals to drive the production and secretion in BCG of recombinant *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase (Sm28GST), a protective antigen against schistosomiasis. BALB/c mice immunized with the recombinant BCG by a single dose exhibited a weak but specific T-cell response to Sm28GST.

The genus *Mycobacterium* is one of the most important bacterial genera. It includes several commensal microorganisms and pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, the causative agents of two of the major infectious diseases affecting human populations worldwide. Until quite recently, mycobacteria have been relatively refractory to molecular biological approaches, because of the difficulty of introducing foreign DNA into these cells and the lack of suitable mycobacterial cloning vectors. However, since the development of efficient electroporation into mycobacteria (39) and the isolation of autonomously replicating plasmids derived from the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL5000 (21), this genus has become increasingly the focus of molecular investigations. In addition, the use of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG has recently shown promise as a bacterial live vaccine carrier (11, 41, 42).

Despite their importance as microbial pathogens and heterologous expression systems, little is known about the structures of mycobacterial gene promoters and their activities. Usually, mycobacterial promoters function very poorly in heterologous hosts such as *Escherichia coli* (10, 38), and vice versa, relatively few heterologous promoters have been shown to be functional in mycobacteria, suggesting that the mycobacterial promoters are only distantly related to the promoters of other microorganisms. The most extensively studied and used promoter is that controlling the mycobacterial heat shock protein genes (42, 46). Sequence comparison of this promoter region with other bacterial promoters revealed some similarities with consensus promoter sequences ( $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{32}$  promoters). However, mycobacterial promoters controlling the expression of heat

shock proteins are among the rare ones that have been shown to be active in *E. coli* (46) and may therefore not necessarily be representative of mycobacterial promoter structures. More recently, other mycobacterial promoters isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* and *M. fortuitum* were also found to contain well-conserved -10 and -35 regions (28, 47). Again, these promoters were active in *E. coli*. Other promoters have been used but have not been extensively studied.

To gain insight into the structure and function of a specific mycobacterial promoter, we analyzed the promoter region controlling the expression of the *M. tuberculosis* 85A antigen in *M. bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. The 85A antigen is part of a secreted antigenic complex and represents one of the major secreted proteins from slowly growing mycobacteria (50). The structural genes of these antigens have been cloned and sequenced from several mycobacterial species (5, 9, 12, 24, 34). Whereas the coding regions of these genes share a high degree of sequence similarity, the noncoding sequences display more divergence. In this study, we used the *E. coli* *phoA* gene as a reporter gene and found that the *M. tuberculosis* 85A promoter was active in BCG and in *M. smegmatis* but inactive in *E. coli*. Progressive deletion experiments and primer extension analysis identified the region essential for efficient promoter activity. In addition, the 85A antigen promoter and its signal peptide were successfully used for the production and secretion of the heterologous antigen Sm28GST from *Schistosoma mansoni* in BCG.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** All cloning steps were performed in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, Calif.). *E. coli* CC118 (*PhoA*<sup>-</sup>) was kindly provided by C. Manoil (23). Expression studies were done in *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2) and in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (40), an efficient plasmid transformation mutant of *M. smegmatis* mc<sup>6</sup> (generously provided by T. Kieser). Cultures of *M. bovis* BCG or *M. smegmatis* (150 ml) were grown to mid-log phase in Sauton medium (36) and were then centrifuged at 4,500 × g for 15 min. The

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM CJF9109, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 20.87.77.28. Fax: (33) 20.87.79.06.

pellets were resuspended in 150 ml of 10% glycerol. Cells were centrifuged again, washed three times with 75 ml of 10% glycerol, and resuspended in 5 ml of 10% glycerol. Competent mycobacteria were then aliquoted and frozen at -80°C until further use. For transformation, the DNA sample was mixed with 50 µl of cell suspension and pulsed with a Celllect electroporator (Eurogentec, Liège, Belgium) at 2,500 V, 412 Ω, and 40 µF. The cells were then recovered in 1 ml of Sauton medium and plated onto Middlebrook 7H10 medium supplemented with ADC enrichment (Difeo, Detroit, Mich.) containing 0.01% cycloheximide and either 20 µg of kanamycin or 15 µg of streptomycin per ml. The plates were incubated at 37°C, and colonies were isolated after 3 to 4 days (*M. smegmatis*) or 15 to 20 days (BCG).

**Plasmids and DNA manipulation.** The pUC18 and pUC19 vectors and pBluescript SK+/- vector were purchased from New England Biolabs (Beverly, Mass.) and Stratagene, respectively. pH45Ω (31) and pUC4K (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) were used to isolate the streptomycin and kanamycin resistance genes, respectively. pT7T3-19UphoA1-2-3 (19) containing the *phoA*-coding sequence was a gift from F. Rüker, pRR3 (33) derived from *M. fortuitum* pAL5000 (21) was kindly provided by B. Gicquel, and pT7-4 and pGP1-2 (44) came from S. Tabor. The clone BS-BY-5A was obtained by inserting a 800-bp *Hind*III fragment from the previously described BY-5 (5) into Blue Scribe M13+ (Stratagene). Restriction analysis of plasmids from mycobacteria was performed after electroporation in *E. coli* as described by Baulard et al. (3).

Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, polynucleotide kinase, Klenow fragment, BAL 31, and other DNA-modifying enzymes were purchased from Boehringer GmbH (Mannheim, Germany), Pharmacia LKB, New England Biolabs, or Eurogentec. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase was purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, Md.). All DNA manipulations were performed under standard conditions as described by Sambrook et al. (35).

**Vector construction using the 85A promoter and signal peptide.** To fuse the 85A promoter and signal peptide-coding sequence to the *E. coli* *phoA* reporter gene, a 544-bp fragment corresponding to the 85A promoter region followed by the sequence encoding the 85A signal peptide was amplified by PCR from plasmid BS-BY-5A, using the reverse primer (Boehringer) and a 32-mer primer (5' CGCGGATCCGCCCGGGTCGCCGTGCCACC3'). This oligonucleotide, containing a *Bam*HI site at its 5' end, was synthesized by Transcène (Strasbourg, France). The PCR product was then digested with *Hind*III-*Bam*HI and cloned into *Hind*III-*Bam*HI-digested pUC18 to generate a plasmid designated pEC001. In parallel, pH45Ω was digested with *Sma*I to isolate the streptomycin resistance gene (2.1 kb), which was subsequently ligated into an *Eco*RV-linearized pT7T3-19UphoA1-2-3 (pEL1). The purified 4.4-kb *Sma*I fragment of pEL1 containing the *phoA* coding sequence and the streptomycin resistance gene was cloned into pEC001 previously digested with *Bam*HI and blunt ended with Klenow fragment. The resulting plasmid (pEL2) was digested with *Sac*I and *Xba*I, and the 4-kb insert (containing the 85A promoter and signal peptide-coding sequence and the *phoA* and the streptomycin resistance genes) was isolated, filled with Klenow fragment, and ligated into the unique *Sac*I site of pRR3, a mycobacterium-*E. coli* shuttle vector. *M. smegmatis* and BCG were transformed with this final construct (pEND1; Fig. 1) and were selected for streptomycin resistance.

To construct the vector for expression of the Sm28GST gene, the Sm28GST-coding sequence was amplified from clone TG10 (30a) by PCR, using synthetic oligonucleotides with the following sequences: 5' TAAGATCTCCATGGCTG GCGAGCAT3' and 5' TAAGATCTCGAGCTTCTGTTG3' (Fig. 2). The 780-bp fragment was then digested with *Bgl*II, blunt ended with Klenow fragment, and cloned into *Sma*I-linearized pEC002, generating pEC008. To construct pEC002, a 545-bp fragment corresponding to the 85A promoter and secretion signal was amplified by PCR from plasmid BS-BY-5A by using the reverse primer and a 33-mer oligonucleotide (5' CGCGGATCCGCCCGCG GTCGCCGTGCCACC3'). This oligonucleotide contains a *Bam*HI site at its 5' end and was synthesized by Transcène. The PCR product was then digested with *Hind*III-*Bam*HI and cloned into *Hind*III-*Bam*HI-restricted pUC19. The 1,300-bp *Hind*III-*Eco*RI insert of pEC008 was then cloned into *Hind*III-*Eco*RI-digested pBluescript SK+/-, thereby yielding pEC009. The 1,300-bp *Sal*I kanamycin resistance gene was then excised from pUC4K and introduced into the compatible *Xba*I restriction site of pEC009, thereby giving rise to pEC010. To construct pEN00X4, the 2,700-bp *Asp* 718 insert isolated from pEC010 was filled in with Klenow fragment at both ends and ligated into the *Pst*I-digested pRR3ΔKan shuttle vector previously treated with T4 DNA polymerase to remove the protruding ends. pRR3ΔKan consists of pRR3 which was deleted of its kanamycin resistance gene by *Pst*I restriction. pEN00X4 was then introduced into BCG, and recombinants were selected for kanamycin resistance.

To construct the *phoA* gene expression vector under the control of the T7  $\phi$ 10 promoter (44), the DNA fragment containing the *phoA* gene fused to the 85A signal peptide-coding region and the streptomycin resistance gene was isolated from pEL2 after digestion with *Pst*I and *Xba*I and cloned into pT7-4 digested with *Pst*I and *Xba*I. The resulting plasmid, named pT7-418, was selected by its ability to confer resistance to streptomycin and was then transformed into *E. coli* CC118 containing pGP1-2. The recombinant *E. coli* cells were then grown for several hours at 30°C in LB supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and kanamycin (25 µg/ml) until the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) reached 0.4. Expression of the T7 RNA polymerase gene was achieved by raising the temperature to 42°C for 30 min. The temperature was then reduced to 37°C, and

growth was continued for an additional 90 min under constant shaking before the cells were assayed for PhoA activity.

**Preparation of RNA.** Sodium azide (10 mM, final concentration) was added to a 150-ml *M. bovis* BCG culture grown to mid-log phase. The cells were then harvested by centrifugation (4,000 × g for 20 min at 4°C), resuspended in TE (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA) containing 1.3 mg of lysozyme (Sigma, St. Louis, Mo.) per ml, and incubated for 1.5 h at 37°C under constant shaking. The bacterial cell walls were disrupted at 60°C for 2 h by adding 3% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 500 µg of proteinase K (Boehringer) per ml. After centrifugation at 8,000 × g for 10 min at 4°C, the supernatant was recovered, and total cellular RNA was extracted with an equal volume of phenol-chloroform (1:1; pH 8.0), centrifuged at 8,000 × g for 20 min at room temperature, and extracted again with 1 volume of phenol-chloroform (1:1; pH 4.5). Following centrifugation at 8,000 × g for 10 min at room temperature, the aqueous phase was mixed with 1 volume of ether, centrifuged, and precipitated with 2.5 volumes of ethanol-0.3 M sodium acetate-0.1% SDS. The RNA was pelleted (8,000 × g for 45 min at 4°C), washed with 75% ethanol, dried, redissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water, and stored at -80°C until further use.

**Nucleotide sequence determination.** Nucleotide sequences were determined from double-stranded DNA by the dideoxyribonucleotide chain termination method, using [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dCTP (1,000 Ci/mmol; Amersham France, Les Ulis, France) and the DNA T7 sequencing kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturers' instructions.

**Primer extension.** Ten micrograms of total RNA was subjected to primer extension using a 30-mer oligonucleotide (5' TCCCATTCTGCTCCCTCATC CTCATCTC3'). The 5' hydroxyl end of the primer (500 ng) was radiolabeled for 45 min at 37°C with 15 µCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (4,500 Ci/mmol; Amersham France), using 10 U of polynucleotide kinase in a total volume of 20 µl. Unincorporated nucleotides were removed by gel filtration on Sephadex G-25 (Pharmacia LKB). Annealing to RNA was done in 5× reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl [pH 8.0], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM dithiothreitol) by heating at 80°C and cooling to 59°C. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U) was added, and the reaction mixture was incubated at 45°C for 30 min. After incubation, 200 additional U of enzyme was added, and the reaction continued for 1 h at 37°C. Following phenol-chloroform extraction, the cDNA-RNA hybrids were precipitated with ethanol and sodium acetate in the presence of 25 µg of carrier tRNA (Sigma). After being washed with 75% ethanol, the pellet was resuspended in 10 µl of stop solution (90% [vol/vol] formamide-bromophenol blue-xylene cyanol in 90 mM Tris-borate [pH 8.0]-2 mM EDTA). The primer extension products as well as the sequencing reactions were denatured at 80°C for 5 min and separated by electrophoresis on a 6% polyacrylamide-8 M urea sequencing gel.

**Immunoblotting of recombinant proteins.** Ten-milliliter aliquots of cultures were harvested at mid-log phase. The cells were centrifuged and resuspended in 1.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS: 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH 7.5], 0.15 M NaCl) and disrupted for 10 min with a Bransonic Sonifier 450 at half-maximal constant output. The resulting BCG or *M. smegmatis* crude extracts were then separated on an SDS-12% polyacrylamide gel as described by Laemmli (22). After electrophoresis, proteins were transferred onto a Hybond-C Extra membrane (Amersham France). The membrane was then saturated with 5% dry milk in PBS-0.1% Tween 20. Anti-Sm28GST 190-211 peptide rat polyclonal antibodies used to detect the Sm28GST antigen were kindly provided by G. Renaud and N. Mielcarek (Institut Pasteur de Lille, Lille, France). These antibodies were generated by intradermal injection of 50 µg of 190-211 peptide with incomplete Freund adjuvant in Fischer rats. Animals were then boosted with 50 µg of peptide 3 weeks later and reboosted 6 weeks later, and antisera were recovered 10 days after the second boost. Purified *E. coli* alkaline phosphatase (PhoA) and monoclonal antibody (code number ME6200) against the *E. coli* PhoA were purchased from Sigma and Caltag Laboratories (San Francisco, Calif.), respectively. Goat anti-rat alkaline phosphatase-conjugated antibodies and goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibodies were purchased from Immunotech (Marseille, France) and Promega (Madison, Wis.), respectively.

**Alkaline phosphatase assay.** Mycobacteria were harvested by centrifugation and washed in PBS. The final cell pellet was resuspended in 1 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8.0). Nine hundred microliters of 1 M Tris-HCl (pH 8.0) and 100 µl of 20 mM *p*-nitrophenylphosphate (Sigma) were added to 100 µl of the cell pellet or culture supernatant. Enzymatic reactions were performed in triplicate in the dark at 37°C. Reactions were stopped with 100 µl of 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and the OD<sub>420</sub> was measured. The PhoA activities were measured as described by Manoil and Beckwith (23). The recombinant mycobacteria were also analyzed by immunoblotting with anti-Aph antibodies, kindly provided by E. Collatz, to ensure that they all contained similar amounts of Aph and that therefore the pEND series of plasmids had similar copy numbers in the different strains.

**BCG infection in mice.** Eight-week-old C3H/HeJ (H-2<sup>k</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), and BALB/c (H-2<sup>d</sup>) female mice (Iffa Credo, l'Arbresle, France) were used for BCG infection. Mice were inoculated subcutaneously or intravenously with 10<sup>7</sup> BCG which had been grown for 2 weeks in Sauton medium and measured by OD<sub>600</sub>. They were immunized either with untransformed BCG or with recombinant BCG expressing Sm28GST antigen.

**Antigen preparation.** Sm28GST antigen was purified by affinity chromatography on a glutathione-agarose column as described previously (49). Sm28GST-derived peptides (24-43, 65-86, 87-111, 115-131, 158-175, and 190-211), kindly

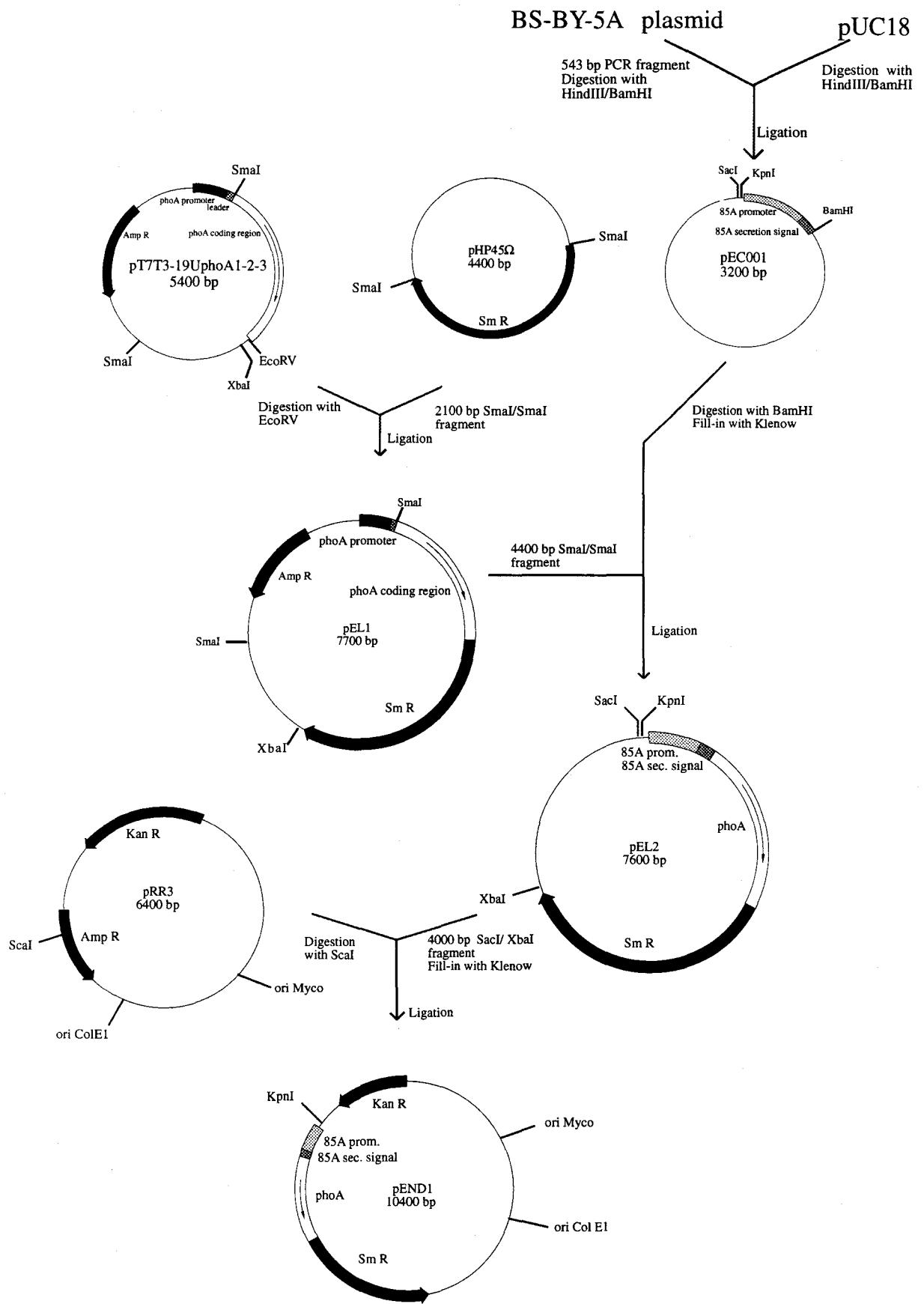


FIG. 1. Generation of pEND1. The *phoA* gene encoded by pT7T3-19UphoA1-2-3 was fused to the *M. tuberculosis* 85A promoter (prom.) and signal peptide-coding sequence amplified by PCR from BS-BY-5A. Open boxes indicate the mature PhoA coding region, stippled boxes designate the 85A promoter region, and dotted boxes show the 85A signal peptide-coding sequence. Black arrows show the position and transcriptional direction of the Amp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, and Kan<sup>r</sup> genes as indicated. sec., secretion.

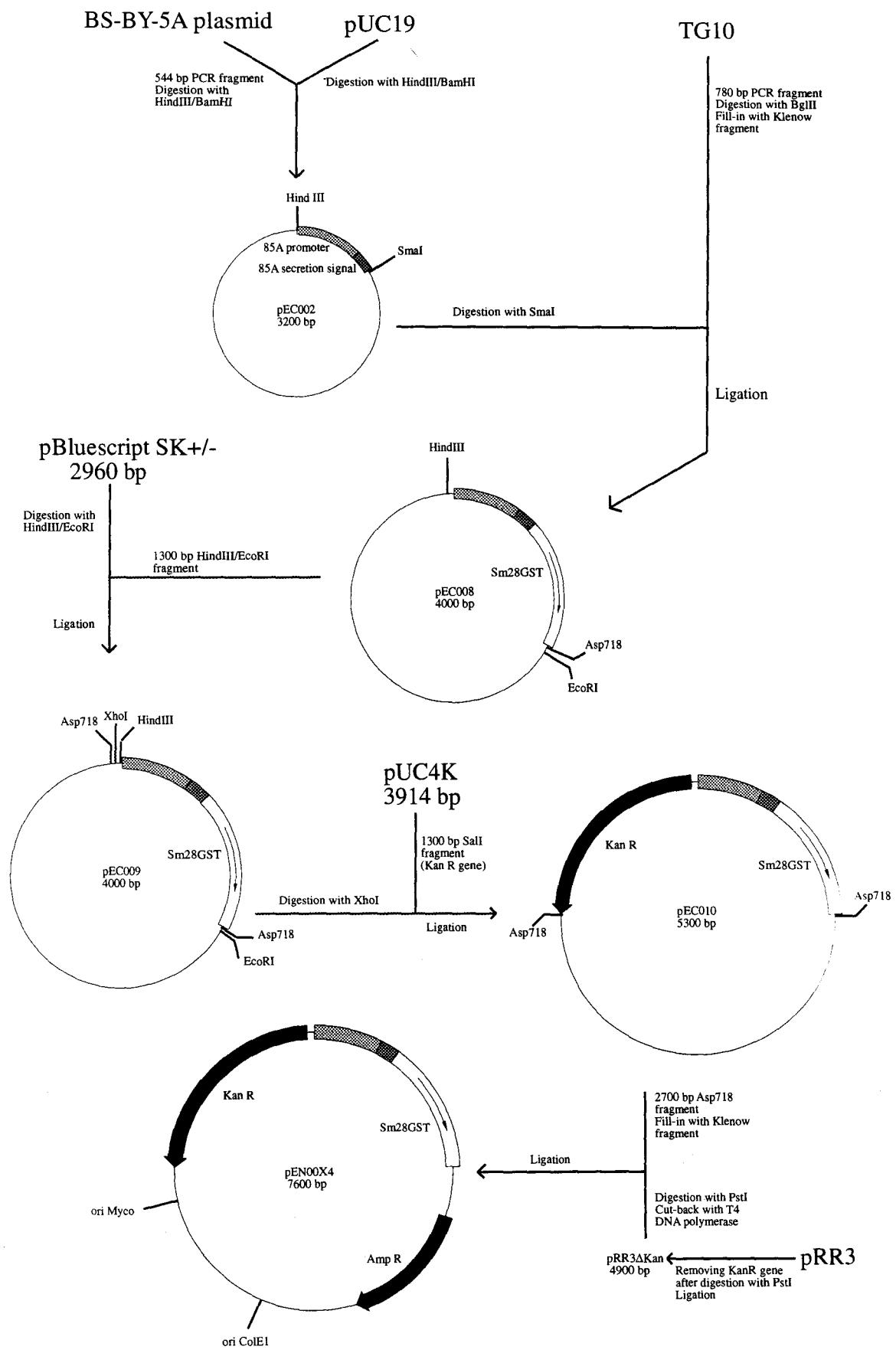


FIG. 2. Generation of pEN00X4. The coding sequence of the Sm28GST antigen was amplified by PCR and spliced in frame to the *M. tuberculosis* 85A promoter and signal peptide-coding sequence. The symbols are the same as for Fig. 1 except that the open box indicates the Sm28GST-coding sequence instead of the PhoA-coding sequence.

provided by André Tartar (Institut Pasteur de Lille), were synthesized by solid-phase synthesis according to the Merrifield method (27). Soluble worm adult proteins (SWAP) were prepared from adult worms washed in PBS, passed rapidly from -196 to 37°C, disrupted by sonication for 30 s, and then centrifuged at 10,000 × g for 20 min. The supernatant was collected and frozen. Soluble egg antigen (SEA) was prepared by the method of Boros and Warren (4). SWAP and SEA are crude extracts of *S. mansoni* containing Sm28GST antigen.

**Lymphoproliferation assay.** Three weeks after immunization, spleen and lymph node cells were isolated and resuspended in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) containing 20 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Boehringer) and supplemented with 2 mM L-glutamine, 5 × 10<sup>-5</sup> M β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany), and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). Cells were cultured at a concentration of 2.5 × 10<sup>5</sup> cells per well in 96-well flat-bottom culture plates in the presence of Sm28GST antigen (20 µg/ml), Sm28GST-derived peptides (20 µg/ml), SWAP (20 µg/ml), SEA (20 µg/ml), or purified protein derivative (0.5 U per well; Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France). As positive T-cell proliferation controls, concanavalin A and staphylococcal enterotoxin B were added at concentrations of 5 and 1 µg/ml, respectively. The assays were performed in triplicate. Cultures were incubated at 37°C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator for 4 days and then pulse-labeled with 18.5 kBq of [<sup>3</sup>H]thymidine (25 Ci/mmol; Amersham France) in order to measure T-cell proliferation. The cells were harvested 12 to 16 h later onto fiber filter strips, using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway), and the radioactivity incorporated into DNA was determined by liquid scintillation counting (LKB, Turku, Finland). Results are expressed as mean counts per minute minus the background (medium alone). Significant proliferation was defined by the Student *t* test.

## RESULTS

**Expression and secretion of alkaline phosphatase in BCG and *M. smegmatis*.** The *M. tuberculosis* 85A antigen, one of the major secreted and cell surface-associated proteins, has been proposed to be involved in mycobacterial adherence (1). Therefore, this antigen could be an important virulence factor, and the study of its expression signals should shed some light on mycobacterial promoter structures and possibly gene regulation. We used the *M. tuberculosis* 85A promoter and export signal to study the expression and secretion of heterologous proteins in mycobacteria. For this purpose, we constructed a shuttle vector in which the alkaline phosphatase gene (*phoA*) of *E. coli* was cloned downstream of the 85A promoter and secretion signal (Fig. 1).

PhoA of *E. coli* hydrolyzes organic phosphate esters as an active homodimer only when it is secreted at least through cytoplasmic membrane (48). We expected that the *phoA* gene product would be exported through the mycobacterial membrane because of its fusion to the 85A signal peptide. Accordingly, expression and secretion studies were performed by measuring PhoA activity directly on intact recombinant cells and in the culture supernatants. After 4 h of reaction, a yellow color was readily detected in the mycobacterial cell suspensions and in the culture supernatants of recombinant BCG and *M. smegmatis*, indicating that the 85A signals can drive *phoA* expression and PhoA secretion in both mycobacterial species.

The PhoA activities were significantly higher in recombinant BCG than in untransformed cells used as controls (Fig. 3). Recombinant BCG expressed typically 35 U of PhoA activity, whereas nonrecombinant BCG expressed approximately 10-fold less activity. Similar results were obtained for *M. smegmatis* (data not shown). The same levels of PhoA activity were obtained when the mycobacteria carrying pEND1 were disrupted by sonication prior to the measurement of PhoA activity (data not shown). This result suggests that the PhoA produced in these mycobacteria is exported through the mycobacterial membrane. PhoA was also detected by immunoblotting using a monoclonal antibody specific for *E. coli* PhoA (Fig. 4). A single immunoreactive band comigrating exactly with the purified *E. coli* PhoA was detected. The uncleaved signal peptide would have added at least 30 amino acids, thereby increasing the molecular mass by approximately 2.7

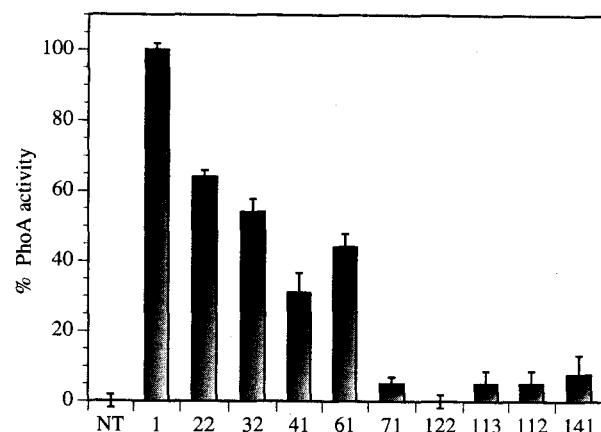


FIG. 3. Relative PhoA activities of recombinant BCG carrying various deletions in the 85A promoter region. Activities were measured on intact cells and are expressed as percentage of PhoA activity in BCG containing the nondeleted promoter version. The mycobacteria were transformed with pEND1 or its derivatives; untransformed (NT) mycobacteria were included as a control. Each number refers to the plasmid number of the pEND series.

kDa. This difference would have been detected by the immunoblot performed under the conditions described for Fig. 4. We therefore conclude that the signal peptide was completely removed in the mycobacterial cells, which confirms that most of the PhoA had crossed the cell membrane. Whereas PhoA was readily detectable in crude extracts of recombinant cells, its concentration in unconcentrated culture supernatants was too low to be detected by immunoblotting, although enzyme activity could be detected in the culture supernatants. These results show that both mycobacterial species constitute permissible hosts for *E. coli* *phoA* gene expression and PhoA secretion but that the release of PhoA into the culture supernatant is rather inefficient.

To determine whether PhoA might be useful for blue/white screening in mycobacteria (for example, to isolate new strong promoters in BCG or to isolate mutants deficient in the production of exported proteins by *phoA*-containing transposons), we cultured untransformed and recombinant BCG on Middlebrook 7H10 medium containing the PhoA substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP). However, the difference in colony staining in pEND1-containing mycobacteria versus untransformed mycobacteria was not significant. It thus appeared that the background activity caused by an endogenous mycobacterial alkaline phosphatase is too strong to permit the use of this system for rapid screening on indicator plates.

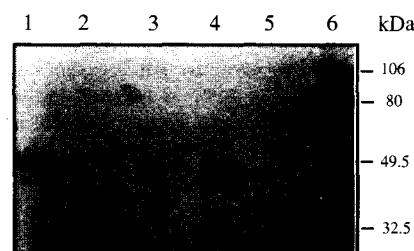


FIG. 4. Western blot analysis of PhoA in crude extracts of recombinant BCG clones. Lanes: 1, purified mature *E. coli* PhoA (100 ng per lane); 2, extract of untransformed BCG; 3, extract of BCG(pEND1); 4, extract of BCG(pEND61); 5, extract of BCG(pEND71); 6, molecular mass marker (sizes are shown at the right). The equivalent of 0.2 OD<sub>600</sub> unit of the mycobacterial culture was loaded in lanes 2 through 5.

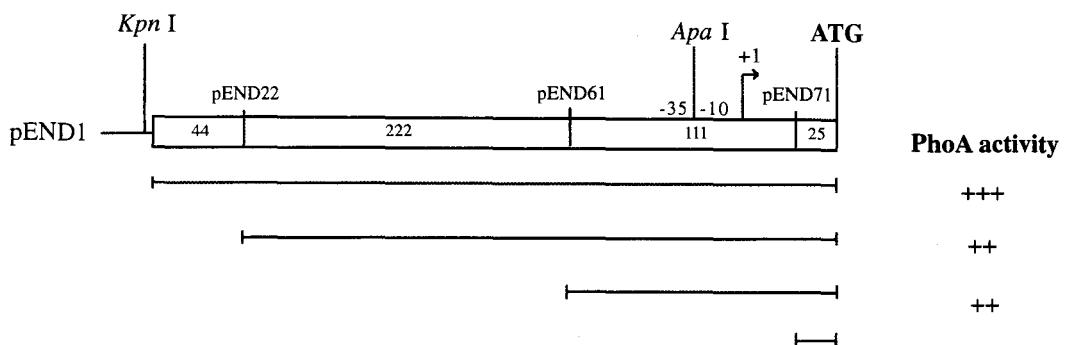


FIG. 5. Schematic representation of the principal deletion mutants. The unique *Kpn*I and *Apa*I sites of pEND1, as well as the ATG initiation codon proposed by Borremans et al. (5), are shown. The transcriptional start site is indicated by the arrow and +1. The numbers refer to the numbers of nucleotides deleted by the BAL 31 nuclease in the various pEND1 derivatives. The levels of PhoA activity of the various clones are indicated at the right as high (+++), medium (++) and low (−).

**Deletion analysis of the 85A promoter region.** The *phoA* expression system was then used to study the structure of the *M. tuberculosis* 85A promoter. For this purpose, pEND1 was linearized at its unique *Kpn*I site located a few nucleotides upstream of the 85A promoter region (Fig. 1). BAL 31 nuclease was then used for progressive deletions of its 5' end. The plasmids digested by BAL 31 were directly ligated, transformed into *E. coli* XL1-Blue, and analyzed by restriction enzyme digestion. A single kanamycin-sensitive and nine different kanamycin-resistant pEND1 derivatives of different sizes were then used to transform BCG and *M. smegmatis*. The PhoA activities of the recombinant mycobacteria were then measured on intact cells. Figure 3 shows the PhoA activities of recombinant BCG as a function of the length of the deleted regions. Two sets of mutants were defined according to the levels of PhoA activity in the different mycobacteria. With the first set of plasmids (pEND22, pEND32, pEND41, and pEND61), significant PhoA activity was detected on the cell surface. However, these mutants consistently exhibited somewhat lower PhoA activity than the original pEND1-containing mycobacteria, suggesting that the sequences which were deleted by BAL 31 in these clones may play a role in the level of expression. Alternatively, it is possible that some vector sequence upstream of the *Kpn*I site, especially the *aph* gene and its adjacent sequences deleted by the BAL 31 digestion, might have some effect on the 85A promoter activity in the pEND series of plasmids. However, when the *aph* gene was placed downstream rather than upstream of the 85A-*phoA* fusion gene (20a), the PhoA activity measured on the recombinant mycobacteria was very similar to that measured for pEND1-transformed mycobacteria. This result suggests that the *aph* gene sequences have no dramatic effect on the 85A promoter activity in pEND1.

A second group of mutants (pEND71, pEND122, pEND113, pEND112, and pEND141) did not give any significant enzymatic activity (same level as for untransformed cells). These latter results were confirmed by immunoblotting (Fig. 4). For example, while PhoA was clearly present in pEND61-containing cells, no specific immunoreactive band could be detected in pEND71-containing cells. This observation together with the enzyme assay data indicated that BAL 31 had removed indispensable parts of the 85A promoter in pEND71. However, the deletion in pEND71 also removed two ATG triplets that are in the same reading frame as the 85A signal peptide. Since the actual ATG start codon has not been defined yet, it could be possible that in addition to indispensable promoter sequences, the translational initiation sequence was also removed in the pEND71 construct.

pEND1, pEND22, pEND41, pEND61, pEND71, and pEND113 were also introduced into *E. coli* CC118 (PhoA<sup>-</sup>) and grown on LB agar containing BCIP. In contrast to the *E. coli* CC118 cells that were transformed with pT7T3-19UphoA used as a positive control, all colonies were white, indicating that these *phoA* constructs were not expressed in *E. coli*. In addition, no 85A-PhoA mRNA was detected under conditions in which the 85A mRNA could readily be detected in BCG (data not shown). To exclude the possibility that the absence of PhoA activity in *E. coli* transformed with the pEND1 series of plasmids was due to the improper translation of the mRNA, improper transport of the protein, or improper cleavage of the signal peptide, rather than to the deficiency of the promoter activity, the *phoA* gene fused to the 85A signal peptide-coding region was cloned downstream of the T7 φ10 promoter. In the presence of the T7 RNA polymerase-coding gene, this construct was found to induce the production of active PhoA in permeabilized *E. coli* CC118 (data not shown). This result demonstrates that the 85A-PhoA mRNA can be translated in *E. coli* and that the protein can be translocated through the inner membrane by the 85A antigen signal peptide. This result confirms that neither the complete sequence of the 85A promoter (pEND1) nor a truncated form (pEND22, pEND41, pEND61, pEND71, or pEND113) is used by the *E. coli* transcription machinery.

The deletions in pEND22, pEND61, and pEND71 were further defined by DNA sequencing. In pEND22, 44 bp were removed by the BAL 31 nuclease. In pEND61, 266 bp were lost, while in pEND71, an additional 111-bp fragment was removed (Fig. 5). These results show that a region essential for promoter activity in mycobacteria is located between nucleotides 275 and 385 of the sequence shown in Fig. 6. During the sequence analysis, we noticed the following differences from the previously published sequence (9) in this promoter region: an insertion of GC at position 107, TA instead of AT at positions 171 and 172, and an insertion of a G at position 176. The numbers refer to the nucleotide positions of the sequence shown in Fig. 6. The sequence shown in this figure was independently confirmed by sequencing PCR products from plasmid BS-BY-5A. In addition, chromosomal BCG DNA amplified by PCR also had a sequence identical to that shown in Fig. 6.

**Identification of the transcriptional start site.** The transcriptional start site of the 85A-*phoA* fusion gene within pEND1 was determined by primer extension analysis (Fig. 7). The results revealed a unique transcriptional start site located 63 bp upstream of the ATG initiation codon of the signal peptide sequence proposed previously (5) (Fig. 6). Of course, we can-

```

1 AAGCTTGACCGGACCGCGATACGTTGGCGCAGGCATCTGGGCTGGCGGTGGTTCGCCCTCCGAAGC
  pEND22

69 CGTCGAAACACCATGCCAGCGGCCGCGGCCGCGGCCACCGCGGGAGTGGGGGCAATGAGGCCGCCCCGGGCG
137 AATACTGACAGCGAACATCACANTGACCCGGACTACGGGTGCAACCATGCCACAGACACTGGCGAATT
205 GCCACCTTCAGGCCGTCGGTCCGGAATTGGCGTGAAGCACGCCCGATAAGGTTTCCGGCG
  pEND61          -35          Apal      -10
273 TGGCGTTGATGGGGTGGACCCCGGAAGTTGTGCTGACACAGACACTGGCGGGCCACGCCCTG
  +1           pEND71
341 CAGCTTGACCTAACTCAGGATGCCAACATGATGGTTGAGATGGAGTGGAGTGGGGAAAGCAA

409 GA ATG CAG CTT GTT GAC AGG GTT CGT GGC GCC GTC ACG GGT ATG TCG CGT
  1>Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg

459 CGA CTC GTG GTC GGG GCC GTC GGC GCG GCC CTA GTG TCG TGG CTG GTC GGC
  17>Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val Gly

510 GCC GTC GGT GGC ACG GCG ACC GCG GGG GCG GAT CC
  34>Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Asp

```

FIG. 6. Nucleotide sequence of the 546-bp PCR fragment containing *M. tuberculosis* 85A promoter and signal peptide-coding sequences. The initiating ATG codon proposed by Borremans et al. (5) is underlined, and the deduced amino acid sequence of the signal peptide is indicated. The transcriptional start site is shown by +1, and the -35 and -10 regions are boxed. The dot shows the position up to which the BCG 85A antigen gene was sequenced (12, 20a). Positions of the deletions in the pEND1 derivatives are indicated by the arrows for pEND22, pEND61, and pEND71. The unique *Apa*I restriction site is also shown.

not entirely exclude the possibility that the transcriptional start site determined by primer extension corresponds in fact to a premature stop site of the reverse transcriptase reaction. However, it is more likely that the primer extension experiment identified a bona fide transcriptional start site, because computer analysis of this region of the mRNA did not reveal any

significant features, such as putative hairpin structures, known to prematurely arrest reverse transcription. Furthermore, the sequencing reactions in this region showed no signs of band compression. In addition, the primer extension results are consistent with the *phoA* expression results and further define the promoter structure of the 85A antigen gene between nucleotides 275 and 347.

The nucleotide sequences centered around the -10 and -35 positions from the transcriptional start site were compared with sequences of other promoter structures and are shown in Fig. 8. No obvious sequence similarities were found between the -10 region of the 85A antigen gene and other mycobacterial -10 regions or the -10 consensus sequences of  $\sigma^{70}$  promoters. In contrast, a region centered around position -35 showed some sequence similarities (3 of 6 bp) with the consensus -35 region of  $\sigma^{70}$  promoters. An even better alignment (5 of 6 bp) was obtained with a sequence positioned 22 bp upstream of the -10 hexamer. The +1 nucleotide as well as the -10 and -35 boxes are present in pEND61 but are absent in pEND71, consistent with the fact that BCG (pEND61) expresses the *phoA* gene and BCG (pEND71) does not.

**Effect of the distance separating the  $-35$  and  $-10$  regions on *phoA* expression.** As shown in Fig. 8, two putative  $-35$

on *phoA* expression. As shown in Fig. 8, two putative regions were identified in the 85A antigen promoter region. One is located at the (for *E. coli*) optimal 17-bp distance of the -10 region but with only 50% identity to the consensus -35 sequence, and one shows 83% identity to the consensus sequence but is located at a (for *E. coli*) suboptimal 22-bp distance to the -10 region. Since it is not known whether the presence of the -10 and -35 regions and/or their distance is of importance for promoter activity in mycobacteria, we decided to alter the distance between the -10 region and the two putative -35 regions and to analyze these alterations for their effects on promoter activity. To shorten the distance by 4 bp, pEND1 was linearized at its unique *Apa*I site (located between the two regions; Fig. 6), cut back with T4 DNA polymerase to remove the 3' protruding ends, and religated with T4 DNA ligase. Several recombinant clones were analyzed for the absence of the *Apa*I site. The 4-bp shortening was then confirmed by DNA sequencing. One correct plasmid was selected and named pENA1. After introduction of pENA1 into BCG and selection of the recombinant clones for kanamycin resistance, the recombinant mycobacteria were analyzed for PhoA activity. Figure 9 shows that the PhoA activity of BCG(pENA1) was lower than that of the BCG(pEND1) control strain but still significantly higher than that of BCG transformed with negative control plasmids. These results suggest either that the distance between the -10 and -35 regions is not critical or that in the mutant, the more distal -35 region (showing 83% similarity to the consensus sequence) had replaced the originally functional more proximal -35 region (with 50% similarity to the consensus sequence). To distinguish between the two possibilities, an additional mutant was analyzed.

During the screening for the 4-bp deletion mutant at the *Apa*I site, we unexpectedly isolated another clone, named pENA2, that contained an insertion of 64 bp within the *Apa*I site. Sequence analysis of pENA2 revealed that this insertion corresponds to a fragment of the *phoA* gene. This unexpected insertion within the promoter region separates the  $-35$  and  $-10$  regions by more than 80 bp. As illustrated in Fig. 9, the PhoA activity of this mutant after transformation into BCG was very similar to that of BCG(pENA1), indicating that increasing the distance between the  $-35$  and  $-10$  regions by 64 bp does not dramatically affect the expression level of the promoter. Sequence analysis of this insertion did not reveal the addition of an obvious new  $-35$  region. Analysis of PhoA

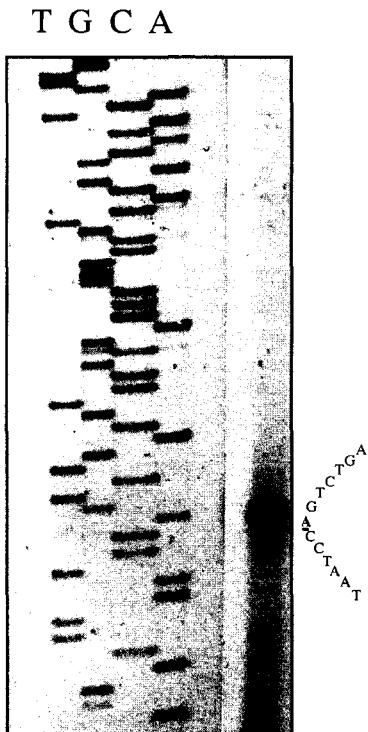


FIG. 7. Primer extension analysis. The radiolabeled oligonucleotide was hybridized to total RNA extracted from BCG(pEND1), and primer extension was performed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase as described in Materials and Methods. The same oligonucleotide was also used as a primer for DNA sequencing. The sequence of the coding strand is shown. The underlined letter indicates the transcriptional start site.

		-35		-10		+1	initiating codon
<i>E. coli</i> consensus	TTGACA	17-19	TATAAT				
<b>Mycobacterial promoters</b>							
<i>hsp60</i> BCG	TTGCAC	17	TAAGAA	6 T	183	ATG	
<i>P<sub>AN</sub></i> <i>M. paratub.</i>	TCGACA	17	TACACT	7 A	40	ATG	
16S rRNA <i>M. leprae</i>	TTGACT	16	ATTAAT	7 G			
16S rRNA <i>M. tub.</i>	TTGACT	18	TAGACT	7 T			
<i>cpn60</i> <i>M. tub.</i>	TGCTCA	17	GGCGGC	7 A	29	ATG	
<i>mpb70</i> BCG	CCGATC	17	CATCAG	6 G	176	ATG	
<i>bla</i> <i>M. fortuitum</i>	TTCAAA	19	TACGCT	7 A	0	ATG	
<i>ask</i> <i>M. smegmatis</i>	CCCACG	17	ACGCTG	7 G	250	GTG	
85A <i>M. tub.</i>	1)	TACACG	17	CGCCTG	7 A	63	ATG
	2)	TTGACT	22	CGCCTG	7 A	63	ATG
<b>Streptomyces promoters</b>							
<i>kgmB-p</i>			CGCTAG	7	G		
<i>strpB-p</i>			AGCCTG	5	A		
<i>aacC9-p</i>			AGCCTG	6	A		
<i>afsA-p</i>			CCGGTG	6	A		
<i>vph-p2</i>			CCGCTG	7	C		

FIG. 8. Comparison of mycobacterial promoter sequences. The  $-35$  and  $-10$  regions of those mycobacterial promoters of which the transcriptional start sites are known are compared with the  $-10$  and  $-35$  sequences of the *M. tuberculosis* 85A promoter region and the *E. coli* consensus sequences. The distances between the two regions ( $-35$  and  $-10$ ), between the  $-10$  region and the transcriptional start site (+1), and between the transcriptional start sites and the ATG initiation codons are indicated. The sequences were from Stover et al. (42) for *hsp60* of BCG, Murray et al. (28) for *P<sub>AN</sub>* of *M. paratuberculosis* (*M. paratub.*), Sela and Clark-Curtiss (37) for 16S rRNA of *M. leprae*, Ji et al. (16) for 16S rRNA *M. tuberculosis* (*M. tub.*), Kong et al. (20) for *cpn60* of *M. tuberculosis*, Radford and Wood (32) and Terasaka et al. (45) for *mpb70* of BCG, Timm et al. (47) for *bla* of *M. fortuitum*, and Cirillo et al. (7) for *ask* of *M. smegmatis*. For the streptomyce promoter sequences, only the  $-10$  boxes are shown, on the basis of the transcriptional start sites mapped by S1 nuclease or primer extension. These sequences are from Strohl (43).

activity in *M. smegmatis*(pENA1) and *M. smegmatis*(pENA2) showed results similar to those obtained in BCG. As for the wild-type promoter region, *E. coli* CC118 containing either plasmid had no detectable PhoA activity, indicating that the mutant promoters remained inactive in *E. coli*.

To investigate whether either  $-35$  region played any role for promoter activity, we digested pEND1 with *Kpn*I and *Apal* (see the restriction sites in Fig. 5), blunt ended the digested plasmid, and religated it, thereby deleting the entire region containing both putative  $-35$  boxes. After transformation of this plasmid into *M. smegmatis*, we were unable to detect any significant PhoA activity, indicating that the presence of the  $-35$  region is absolutely required for promoter activity, although its position may not be critical.

**Expression-secretion of the *S. mansoni* Sm28GST antigen in BCG, using the 85A promoter and signal peptide.** To test whether the *M. tuberculosis* 85A promoter and signal peptide sequences might be useful for the production and secretion of heterologous antigens in a recombinant BCG vaccine strain, we spliced the coding sequence of the glutathione S-transferase of *S. mansoni* (Sm28GST) with the promoter and signal peptide-coding sequence of the 85A antigen. Sm28GST is a

major protective antigen of *S. mansoni*, inducing between 40 and 80% of protection against schistosomiasis in rodents and primates, which makes it a promising vaccine candidate (6). The Sm28GST-coding sequence was amplified from clone TG10 by PCR and used to generate pEN00X4 (Fig. 2).

After transformation of BCG with pEN00X4, the presence of Sm28GST in BCG cells and culture supernatant was analyzed by immunoblotting (Fig. 10), using a rat antiserum raised against a synthetic peptide that corresponds to the Sm28GST portion comprised between amino acid residues 190 and 211. A protein reactive with this antiserum and of the expected size was detected both in crude extracts of BCG carrying pEN00X4 and in the corresponding culture medium. No anti-Sm28GST-reactive protein of this size was detected in untransformed BCG. This result indicated that Sm28GST is expressed and exported through the mycobacterial cell wall via the 85A promoter and signal sequences.

**Immune response against Sm28GST induced by recombinant BCG.** To investigate whether BCG containing pEN00X4 could generate a specific immune response against Sm28GST, three distinct mouse haplotypes, BALB/c ( $H-2^d$ ), C57BL/6 ( $H-2^b$ ), and C3H/HeJ ( $H-2^k$ ), were inoculated subcutaneously ei-

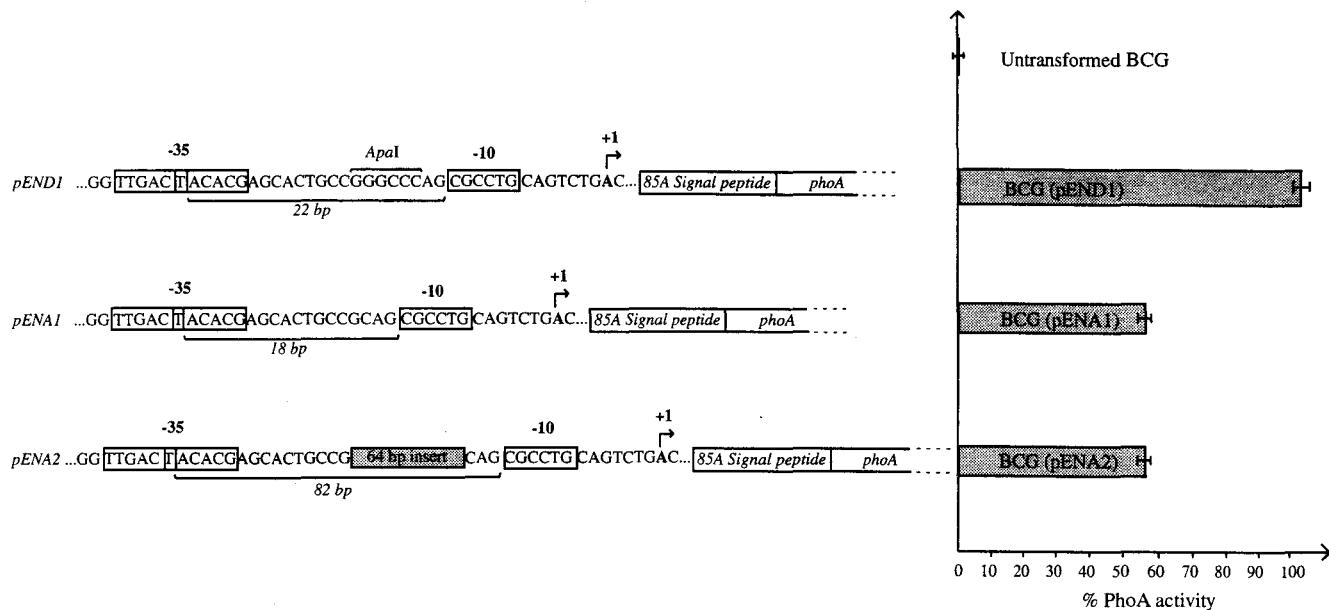


FIG. 9. Relative PhoA activities of recombinant BCG carrying the deletion or insertion at the *Apa*I site. Activities were measured and are expressed as described for Fig. 3.

ther with BCG 1173P2 (as a control) or with BCG harboring pEN00X4. Three weeks later, proliferative responses of spleen and lymph node cells from each group of mice (three mice per group) were analyzed by using Sm28GST-derived peptides (24-43, 65-86, 87-111, 115-131, 158-175, and 190-211), crude extract SEA and SWAP, both containing the Sm28GST antigen, or the purified protein. Lymph node and spleen cells from all groups of mice responded to the polyclonal T-cell activator concanavalin A or staphylococcal enterotoxin B. A significant antigen-specific proliferative response was observed when lymph node cells from BALB/c mice were restimulated by using Sm28GST, the 65-86 peptide, and SEA as recall antigens (Fig. 11). A very low response was also observed in C57BL/6 mice. No specific stimulation was observed when the mice were immunized with nonrecombinant BCG or when cells were derived from the spleen, irrespective of the mouse strain, the route of inoculation (subcutaneous or intravenous), or the BCG strain used (data not shown).

## DISCUSSION

The antigen 85 complex is composed of at least three different, closely related proteins named 85A, 85B, and 85C and is a major secretion product of several mycobacterial species. However, these proteins are also found associated with the bacterial cell surface (for a recent review, see reference 50). Their properties, especially the capacity to bind fibronectin (1), in addition to the surface association, make them attractive virulence factor candidates. The production of bacterial virulence factors is usually tightly and coordinately regulated at the transcriptional level in response to environmental signals (26).

Little is known about mycobacterial virulence factors or about gene expression, gene regulation, and the influence of environmental conditions on expression levels. Identification of sequences involved in gene regulation and characterization of transcriptional signals should be useful for the understanding of mycobacterial pathogenesis and may also help to identify

new antigens for the development of new vaccines against diseases such as tuberculosis and leprosy.

As a first step toward the understanding of gene expression and regulation, we have analyzed the promoter region of the 85A antigen of *M. tuberculosis*. The genes encoding the antigen 85 complex proteins of several species have been cloned and sequenced and show a high degree of sequence similarity in the coding regions (5, 9, 12, 24, 34). In this report, we describe the construction of a mycobacterial shuttle vector (pEND1) in which the expression of the *E. coli* *phoA* reporter gene was placed under the control of the *M. tuberculosis* 85A promoter and signal peptide-coding sequences. Recombinant BCG or *M. smegmatis* carrying pEND1 produced active PhoA, indicating that the 85A promoter and signal sequence were able to efficiently drive PhoA through the mycobacterial cell membrane. Western blot (immunoblot) analysis confirmed that the signal peptide was removed after secretion. PhoA activity was also detected in the culture supernatants, suggesting that the enzyme is also secreted into the growth medium. However, release into the culture supernatant was not very efficient, since PhoA could not be detected by immunoblot analysis of unconcentrated culture supernatants. The system thus appears particularly useful for the evaluation of the functional levels of mycobacterial promoters and the characterization of mycobacterial signal peptides. While this report was in preparation, Timm et al. (47) also reported on the use of *phoA* to study a promoter region of an *M. fortuitum*  $\beta$ -lactamase gene in *M. smegmatis*. The PhoA expression-secretion system may also be of use for comparison of the expression levels of different promoters in BCG and *M. smegmatis*.

To characterize the 85A promoter, several deletion mutants of the 5' untranslated region were developed by BAL 31 digestion. Removal of the first 44 bp resulted in a decrease of PhoA activity of about 40%. Deletion of a further 222 bp had no dramatic effect on the expression level, whereas after an additional 111-bp deletion, no significant activity was detected by either enzymatic assays or immunoblotting. This result in-

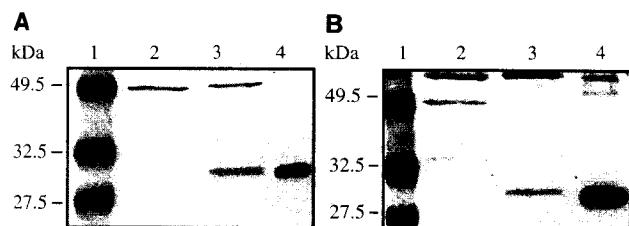


FIG. 10. Western blot analysis of BCG(pEN00X4) producing Sm28GST. Whole cell lysates (A) and culture supernatants (B) were analyzed by using a rat antiserum raised against the 190-211 peptide of the Sm38GST antigen. Lanes: 1, molecular mass marker (sizes are shown at the left); 2, extracts or supernatants of untransformed BCG; 3, extracts or supernatants of BCG(pEN00X4); 4, 100 ng of purified Sm28GST. Lanes contained material corresponding 0.2 OD<sub>600</sub> unit of the mycobacterial culture (A) or material corresponding to 40 µl of sixfold-concentrated supernatants (B).

dicates that essential regions for the promoter activity are located between positions -26 and -136 from the 85A initiation codon previously proposed (5). The transcriptional start site was found at position -63 from the initiation codon, implying that the promoter region is located between -63 and -136.

The specific recognition of prokaryotic promoter sites by RNA polymerase is largely mediated by associated sigma factors. In many bacterial species, most promoter sequences are recognized by  $\sigma^{70}$ -like factors at two hexameric sequences centered around positions -10 and -35 from the transcriptional start site that are optimally separated by  $17 \pm 1$  bp in *E. coli*. Alignment of the region centered around position -10 from the transcriptional start site of the 85A antigen gene showed no significant sequence similarities to *E. coli* consensus promoters or to other mycobacterial promoter regions identified by S1 mapping or primer extension analysis, except for 50% identity found with the BCG *mpb70* gene promoter and 50% identity found with the region centered around position -10 from the major transcriptional start site of the *M. smegmatis ask* gene (7). This latter sequence is also rich in C and G, similar to the 85A -10 region, a feature also shared with the -10 region of the *M. tuberculosis cpn60* gene (20). Interestingly, the -10 hexamer of the 85A promoter shows some similarities to several streptomycete promoters, such as the *kgnB-p*, *strpB-p*, *aacC9-p*, *afsA-p*, and *vph-p2* promoters (Fig. 8). Moreover, like the 85A promoter, these streptomycete promoters are not typically expressed in *E. coli* (43). Between positions -136 and -63 from the proposed translational start site in Fig. 6, there is no other hexamer with more than 50% identity to the *E. coli* -10 consensus sequence.

Two putative -35 regions were found, one positioned at 17 bp from the -10 region, showing 50% identity with the *E. coli* consensus promoter, and one positioned at 22 bp from the -10 region, showing 83% identity with the *E. coli* consensus sequence and being identical to the -35 region of the *M. leprae* and *M. tuberculosis* 16S rRNA promoter region.

The unconventional -10 region and/or the 22-bp spacer between the -10 and the -35 regions could explain the lack of expression in *E. coli*. This is different from what has been found for two other, recently studied mycobacterial promoters, in which cases both the -10 and -35 regions were more similar to the *E. coli* consensus sequences (28, 47) and were found to be functional in *E. coli*. However, since most mycobacterial promoters do not function in *E. coli*, the 85A promoter may be more typical for mycobacteria. Since spacer mutations result in dramatic effects on promoter activities in other bacterial spe-

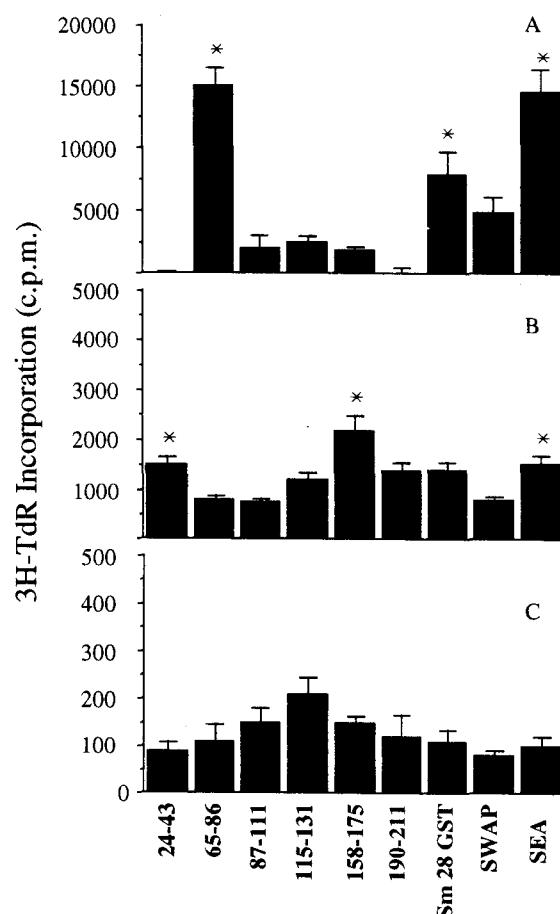


FIG. 11. Proliferative responses of total lymph node cells from three distinct mice haplotypes, BALB/c (*H-2<sup>a</sup>*) (A), C57BL/6 (*H-2<sup>b</sup>*) (B), and C3H/HeJ (*H-2<sup>c</sup>*) (C), immunized subcutaneously with one dose of  $10^7$  BCG producing Sm28GST. Lymph node cells were removed 3 weeks after immunization, and cells (250,000 per well) were stimulated with the different antigens (20 µg/ml) for 5 days. T-cell proliferations were assayed by tritiated thymidine (3H-TdR) incorporation. The assays were carried out in triplicate. The values represent proliferation minus the background levels of 8,500 cpm (A), 1,100 cpm (B), and 100 cpm (C). \*,  $P > 0.05$ , with an at least twofold increase over the background level. The purified protein derivative responses for the three haplotypes were 15,500 cpm (A), 3,250 (B), and 180 (C).

cies, the position of each of the putative -35 regions was further investigated by a 4-bp deletion and a 64-bp insertion in the 85A promoter region. Neither mutation abolished gene expression, indicating that the position is not critical for promoter activity. This is similar to what has been found for *Streptomyces* promoters (15). Also, *Streptomyces* promoter regions are usually C+G rich, with an average C+G content of about 60%, compared with 70% for coding regions (43). The 85A antigen promoter region contains 27 C+G within the 40 nucleotides upstream of the transcriptional start site. In that respect, it is interesting to note that mycobacterial genes are usually better expressed in streptomycetes than in *E. coli* (18). That the presence of the region containing the -35 boxes is critical for promoter activity was indicated by the total loss of expression when the *KpnI-ApaI* DNA fragment was deleted. The requirement of individual bases for promoter activity within the identified region awaits analyses by site-directed mutagenesis.

No sequence similarities were found between the *M. tuberculosis* 85A antigen promoter region and the promoter regions

of other genes coding for the proteins of the antigen 85 complex, except for a 100% identity between the *M. tuberculosis* 85A promoter and that of BCG (12, 20a). This finding suggests that the different genes encoding the antigen 85 proteins are transcribed by different mechanisms, perhaps requiring different regulators. This possibility is consistent with the fact that the different genes coding for the 85 complex are not clustered within the mycobacterial genome (9, 34) and is also consistent with previous reports suggesting differential expression of the components of the mycobacterial antigen 85 complex (29, 30). It would be of interest to compare the promoter activities of the 85A antigen gene with those of the 85B and 85C antigen genes, as well as with that of the MPT51 protein gene, which displays significant sequence similarities with the 85 complex proteins and was found adjacent to the 85A antigen gene in *M. leprae* (34). The availability of the *E. coli phoA* gene as a functional reporter gene for mycobacteria renders this approach feasible.

Recently, mycobacteria, especially BCG, have received considerable attention as hosts for the production of heterologous antigens. BCG is one of the first live bacterial vaccines used to immunize human populations and was found to present a very low incidence of serious side effects (51). In addition, its adjuvant activities makes it an attractive vector for the development of recombinant vaccines (42). For this purpose, several mycobacterial promoters have already been used to drive expression of cloned genes in BCG. Mycobacterial heat shock promoters (*hsp60* and *hsp70*) allowed the production of a variety of different antigens, including human immunodeficiency virus type 1 antigens (2, 42), the *Plasmodium falciparum* CS protein (13), the *Borrelia burgdorferi* OspA lipoprotein (41), gp63 of *Leishmania major* (8). Recombinant BCG strains producing these antigens were found to induce specific immune responses to the heterologous proteins in animals. The 85B antigen promoter of *Mycobacterium kansasii* (also called  $\alpha$ -K) has also been used to express a human immunodeficiency virus type 1 Gag P17 epitope as a fusion protein (25). This system also allowed the induction of a specific T-cell response in mice (17). We wanted to know whether the *M. tuberculosis* 85A antigen promoter and secretion signal could also be used to produce and secrete foreign antigens in BCG. Expression and secretion of the *S. mansoni* Sm28GST antigen was obtained, and mice immunized by a single dose of the recombinant BCG showed that lymph node T cells from BALB/c mice proliferated weakly but significantly in response to the recombinant Sm28GST, the 65-86 peptide, and SEA. No restimulation was observed in the C3H/HeJ mouse strain, and a very weak response was detected in the C57BL/6 strain.

The immune response obtained in this study is significantly weaker than that described by other laboratories using the *hsp* promoters or the more recently identified *P<sub>AN</sub>* promoter. We think that a difference in promoter strength could explain the weaker immune response obtained in our study. However, the 85A antigen and the other members of the 85 complex are abundantly secreted into the mycobacterial culture supernatants of a variety of mycobacteria (50) and are able to induce an immune response in humans infected by *M. tuberculosis* (14), implying that these proteins are produced *in vivo* in infected subjects. Experiments designed to compare the promoter strength of the 85A antigen promoter with that of other promoters are currently under way. We are currently also testing other model antigens that may provide information about the role of the nature of the antigen in achieving an efficient immune response in animals immunized with recombinant BCG using the 85A promoter and signal peptide.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Mercenier for helpful discussion, B. Gicquel, F. Rüker, S. Tabor, R. Pierce, and H. Krisch for plasmids, T. Kieser for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, C. Manoil for *E. coli* CC118, Transgène S.A. for the synthetic oligonucleotides, A. Tartar for Sm28GST-derived peptides, G. Renaud and N. Mielcarek for anti-Sm28GST antibodies, E. Collatz for anti-Aph antibodies, and A. McNair and S. Tomavo for critically reading the manuscript.

A.B. and L.K. were recipients of fellowships from the Région Nord-Pas de Calais, and J.E. held a fellowship from ANRS. This work was supported by INSERM, Région Nord-Pas de Calais, Institut Pasteur de Lille, and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by EEC grant BIO2-CT93-0238.

## REFERENCES

1. Abou-Zeid, C., T. L. Ratliff, H. G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, and G. A. W. Rook. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 56:3046-3051.
2. Aldovini, A., and R. A. Young. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. Nature (London) 351:479-482.
3. Baulard, A., C. Jourdan, A. Mercenier, and C. Locht. 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 20:4105.
4. Boros, D. L., and K. S. Warren. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J. Exp. Med. 132:488-507.
5. Borremans, M., L. DeWit, G. Volckaert, J. Ooms, J. De Bruyn, K. Huygen, J. P. Van Vooren, M. Stelandre, R. Verhofstadt, and J. Content. 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 57:3123-3130.
6. Capron, A., and J.-P. Dessaint. 1992. Immunologic aspects of schistosomiasis. Annu. Rev. Med. 43:209-218.
7. Cirillo, J. D., T. R. Weisbrod, L. Pascopella, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1994. Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria. Mol. Microbiol. 11:629-639.
8. Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. McMaster, B. R. Bloom, and D. G. Russell. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11473-11477.
9. Content, J., A. de la Cuvelerie, L. De Wit, V. Vincent-Levy-Frébault, J. Ooms, and J. De Bruyn. 1991. The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. Infect. Immun. 59:3205-3212.
10. Das Gupta, S. K., M. D. Bashyam, and A. K. Tyagi. 1993. Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. J. Bacteriol. 175:5186-5192.
11. Dellagostin, O. A., S. Wall, E. Norman, T. O'Shaughnessy, J. W. Dale, and J. McFadden. 1993. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. Mol. Microbiol. 10:983-993.
12. De Wit, L., A. De la Cuvelerie, J. Ooms, and J. Content. 1990. Nucleotide sequence of the 32 kDa-protein gene (antigen 85A) of *Mycobacterium bovis* BCG. Nucleic Acids Res. 18:3995.
13. Haeseler, F., J. F. Pollet, M. Haumont, A. Bollen, and P. Jacobs. 1993. Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. Mol. Biochem. Parasitol. 57:117-126.
14. Huygen, K., J. P. van Vooren, M. Turneer, R. Bosmans, P. Dierckx, and J. De Bruyn. 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. Scand. J. Immunol. 27:187-194.
15. Janssen, G. R., and M. J. Bibb. 1990. Tandem promoters, *tsrP1* and *tsrP2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*: transcriptional initiation from *tsrP2* occurs after deletion of the -35 region. Mol. Gen. Genet. 221:339-346.
16. Ji, Y., M. J. Colston, and R. A. Cox. 1994. Nucleotide sequence and secondary structures of precursor 16S rRNA of slow-growing mycobacteria. Microbiology 140:123-132.
17. Kameoka, M., Y. Nishino, K. Matsuo, N. Ohara, T. Kimura, A. Yamazaki, T. Yamada, and K. Ikuta. 1994. Cytotoxic T lymphocyte response in mice induced by recombinant BCG vaccination which produces an extracellular  $\alpha$  antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. Vaccine 12:153-158.
18. Kieser, T., M. T. Moss, J. W. Dale, and D. A. Hopwood. 1986. Cloning and

- expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **168**:72–80.
19. Kohl, J., F. Rüker, G. Himmeler, D. Mattanovich, and H. Katinger. 1990. Engineered gene for *Escherichia coli* alkaline phosphatase for the construction of translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **18**:1069.
  20. Kong, T. H., A. R. M. Coates, P. D. Butcher, C. J. Hickman, and T. M. Shinnick. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2608–2612.
  - 20a. Kremer, L. Unpublished data.
  21. Labidi, A., H. L. David, and D. Roulland-Dussoix. 1985. Restriction endonuclease mapping and cloning of *Mycobacterium fortuitum* var. *fortuitum* plasmid pAL5000. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136**:209–215.
  22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680–685.
  23. Manoil, C., and J. Beckwith. 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8129–8133.
  24. Matsuo, K., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, and T. Yamada. 1990. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive  $\alpha$  antigen of *Mycobacterium kansasi*. *Infect. Immun.* **58**:550–556.
  25. Matsuo, K., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, M. Totsuka, K. Kobayashi, H. Yukitake, and T. Yamada. 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**:4049–4054.
  26. Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**:1–7.
  27. Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149–2154.
  28. Murray, A., N. Winter, M. Lagranderie, D. F. Hill, J. Rauzier, J. Timm, C. Leclerc, K. M. Moriarty, M. Gheorghiu, and B. Gicquel. 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.* **6**:3331–3342.
  29. Nagai, S., H. G. Wiker, M. Harboe, and M. Kinomoto. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**:372–382.
  30. Pessolani, M. C. V., and P. J. Brennan. 1992. *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. *Infect. Immun.* **60**:4452–4459.
  - 30a. Pierce, R., et al. Submitted for publication.
  31. Prentki, P., and H. Krisch. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**:303–313.
  32. Radford, A. J., and P. R. Wood. 1990. Expression system for actinomycetes and related organisms. International patent application WO90/10701.
  33. Ranes, M. G., J. Rauzier, M. Lagranderie, M. Gheorghiu, and B. Gicquel. 1990. Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a "mini" *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**:2793–2797.
  34. Rinke-De Wit, T. F., S. Bekelie, A. Osland, B. Wieles, A. A. M. Janson, and J. E. R. Thole. 1993. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infect. Immun.* **61**:3642–3647.
  35. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  36. Sauton, B. 1912. Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C. R. Acad. Sci. Paris* **155**:860.
  37. Sela, S., and J. Clark-Curtiss. 1991. Cloning and characterization of the *Mycobacterium leprae* ribosomal RNA promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **98**:123–127.
  38. Sirokova, T. D., S. S. Bardarov, J. I. Kriakov, and K. I. Markov. 1989. Molecular cloning of mycobacterial promoters in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**:153–156.
  39. Snapper, S. B., L. Lugosi, A. Jekkel, R. E. Melton, T. Kieser, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1988. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6987–6991.
  40. Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**:1911–1919.
  41. Stover, K., G. P. Bansal, M. S. Hanson, J. E. Burlein, S. R. Palaszinski, J. F. Young, S. Koenig, D. B. Young, A. Sadzene, and A. G. Barbour. 1993. Protective immunity elicited by recombinant bacille-Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (Osp A) lipoprotein: a candidate lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* **178**:197–209.
  42. Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)* **351**:456–460.
  43. Strohl, W. R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**:961–974.
  44. Tabor, S., and C. C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled and exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1074–1078.
  45. Terasaka, K., R. Yamaguchi, K. Matsuo, A. Yamazaki, S. Nagai, and T. Yamada. 1989. Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:273–276.
  46. Thole, J. E. R., W. J. Keulen, A. H. J. Kolk, D. G. Groothuis, L. G. Berwald, R. H. Tiesjema, and J. D. A. van Embden. 1987. Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**:1466–1475.
  47. Timm, J., M. G. Perilli, C. Duez, J. Trias, G. Orefici, L. Fattorini, G. Amicosante, A. Oratore, B. Joris, J. M. Frère, A. P. Pugsley, and B. Gicquel. 1994. Transcription and expression analysis using *lacZ* and *phoA* gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum*  $\beta$ -lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level  $\beta$ -lactamase producer. *Mol. Microbiol.* **12**:491–504.
  48. Torriani, A. 1967. Alkaline phosphatase from *Escherichia coli*, p. 224–235. In G. L. Cantoni and D. R. Davies (ed.), *Procedures in nucleic acid research*. Harper & Row, Publishers, Inc., New York.
  49. Xu, C.-B., C. Verwaerde, J.-M. Grzych, J. Fontaine, and A. Capron. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* **21**:1801–1807.
  50. Wiker, H. G., and M. Harboe. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**:648–661.
  51. World Health Organization. 1991. Expanded programme on immunization, update. World Health Organization, Geneva.

## **2-Marqueurs de résistance au mercure**

Dans les pays industrialisés, la tuberculose n'a cessé de décliner jusqu'au milieu des années 80 lorsque certains pays ont soudainement vu le nombre de cas augmenter continuellement (Bloom and Murray, 1992). Aujourd'hui, près de 2 milliards de personnes sont infectées par le bacille tuberculeux et environ 8 millions de nouveaux cas apparaissent chaque année, ce qui porte la tuberculose aux premiers rangs des maladies infectieuses. L'un des facteurs contribuant à cette augmentation est lié à l'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes à un ou plusieurs antibiotiques utilisés pour traiter la maladie. Ceci est d'autant plus alarmant lorsqu'on sait que le taux de mortalité de la tuberculose non traitée est d'environ 50 %. Selon les enquêtes du Centre de Contrôle des Maladies américain (CDC), à New-York, un tiers des souches testées en 1991 étaient résistantes à au moins un antibiotique. Cette dissémination de souches multi-résistantes au sein de la population a nécessité la réintroduction de certains antibiotiques comme la streptomycine.

Par ailleurs, la plupart des mycobactéries sont insensibles à de nombreux antibiotiques. Ainsi, seulement un nombre restreint d'antibiotiques peut être utilisé pour sélectionner des souches de mycobactéries recombinantes. Si l'information exogène est portée par un plasmide, le gène de résistance servira à son introduction et son maintien au sein de la bactérie. Les gènes conférant la résistance à la kanamycine et à la streptomycine restent très largement utilisés au laboratoire.

Dans le cadre du développement d'un BCG recombinant utilisable chez l'homme ou l'animal, l'emploi de marqueurs de résistance aux antibiotiques est difficilement acceptable pour des raisons de sécurité. Gormley and Davies (1991) ont montré qu'un transfert de marqueurs de résistance aux antibiotiques vers les mycobactéries pouvait se produire par conjugaison. Le risque d'une éventuelle dissémination de l'information codant la résistance à l'antibiotique doit être totalement éliminé.

Pour éviter l'usage et les risques de transfert de ce type de marqueur, un système de résistance à un phage a récemment été développé. La mycobactérie transformée par un vecteur exprimant le gène 71 du mycobacteriophage L5 devient immune à la surinfection par ce phage (Donnelly-Wu *et al.*, 1993). Un système de sélection basé sur l'utilisation du gène 71 de L5 a été décrit avec succès chez *M. smegmatis*, mais pas encore chez le BCG. Cependant, la restriction des mycobactériophages à leur hôte bactérien en limite l'usage. Le phage L5 est un phage tempéré formant des plages chez plusieurs espèces mycobactériennes à croissance rapide. Par contre, et bien qu'il soit capable de les infecter, L5 présenterait des difficultés à former des plages sur des tapis bactériens de BCG ou de *M. tuberculosis* (Hatfull and Jacobs, 1994).

Nous proposons une approche alternative qui réponde aux exigences du suivi des souches mycobactériennes recombinantes, sans faire usage de marqueurs de résistance aux antibiotiques. La publication suivante intitulée "Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria", décrit la construction de deux plasmides navettes conférant la résistance aux composés mercuriels chez les mycobactéries.

## Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria

Alain Baulard,<sup>1</sup> Vincent Escuyer,<sup>2</sup> Nadia Haddad,<sup>2</sup> Laurent Kremer,<sup>1</sup> Camille Locht<sup>1</sup> and Patrick Berche<sup>2</sup>

Author for correspondence: Camille Locht. Tel: +33 20 87 77 28. Fax: +33 20 87 79 06.

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM C1F9109, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie INSERM U411, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France

**The use of antibiotic-resistance markers for the selection of recombinant mycobacteria is widespread but questionable considering the development of live recombinant BCG vaccines. In contrast, vector-encoded resistance to heavy metals such as mercury may represent an interesting alternative for the development of live vaccines compatible with use in humans and in animals. The mercury resistance genes (*mer*) from *Pseudomonas aeruginosa* and from *Serratia marcescens* were cloned into the *Escherichia coli*-Mycobacterium shuttle vector pRR3. The resulting vectors, designated pMR001 and pVN2, were introduced by electroporation into *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. The recombinant mycobacteria were stable *in vitro* and *in vivo*, and had high-level mercury resistance, thus indicating that the *mer* genes can be useful as selective markers in mycobacteria.**

**Keywords:** *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis*, mercury resistance, live vaccine

### INTRODUCTION

The genus *Mycobacterium* encompasses more than 50 species including major human pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. Mycobacterial infections, especially tuberculosis, remain among the world's leading causes of death, mainly in the developing world. In addition, with the appearance and spread of AIDS, tuberculosis as well as opportunistic mycobacterial infections have re-emerged as serious threats in the United States and in Europe. The recent appearance of multidrug-resistant strains is of especially great concern for public health (Bloom & Murray, 1992).

Despite the fact that *M. tuberculosis* was one of the first micro-organisms to be recognized as a human pathogen, its molecular genetics remains poorly understood. This may in part be related to the slow growth rate of these organisms, the difficulty of introducing foreign DNA, and the lack of suitable cloning vectors. However, the development of efficient electroporation methods (Snapper *et al.*, 1988), and the construction of autonomously replicating shuttle vectors (Ranes *et al.*, 1990), have, in

recent years, rendered mycobacteria amenable to molecular investigations.

In addition, several important breakthroughs have led to the promising utilization of attenuated mycobacteria as multiple live-vaccine carriers (Stover *et al.*, 1991). *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) has been used for several decades as a live vaccine against tuberculosis, with a remarkably low record of serious side effects (WHO, 1991). Recently developed molecular tools have opened the possibility of introducing and expressing genes coding for foreign antigens in BCG vaccine strains, and of constructing recombinant multivalent BCG strains capable of immunizing and protecting against multiple infectious diseases simultaneously (Stover *et al.*, 1993).

The cloning vectors currently most widely used in mycobacteria are shuttle plasmids based on pAL5000 isolated from *Mycobacterium fortuitum* (Labidi *et al.*, 1985), although others, such as pMSC262-derivatives isolated from *Mycobacterium scrofulaceum* (Goto *et al.*, 1991), and even RSF1010 and its derivatives (Gormley & Davies, 1991; A. Baulard and others, unpublished) can also be used. Mycobacteria are generally resistant to many antibiotics, probably due to their inherently complex cell wall, and therefore transformed mycobacteria can be selected only by resistance to a limited panel of antibiotics. Thus far, most investigators have used the *aph* gene which

**Abbreviations:** BCG, *M. bovis* bacille Calmette-Guérin; PMA, phenylmercuric acetate.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference/source
<b>Strain</b>		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F'::Tn10 proA <sup>B+</sup> lacI <sup>a</sup> Δ(lacZ) M15 /recA1 endA1 gyrA96 (Nal <sup>r</sup> ) thi hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 relA1 lac	Stratagene
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Hypertransformable mutant derived from <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 6	Snapper <i>et al.</i> (1990)
<i>M. bovis</i> BCG 1173P2	Vaccine strain	WHO, Stockholm
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Avirulent <i>M. tuberculosis</i>	Institut Pasteur Collection
<b>Plasmid</b>		
PRR3	<i>E. coli</i> -mycobacterial shuttle vector Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , pAL5000 ori, pUC18 ori	Ranes <i>et al.</i> (1990)
pHP45ΩHg	mer from Tn501 ( <i>P. aeruginosa</i> )	Fellay <i>et al.</i> (1987)
pLOFHg	mer from pDU1358 ( <i>S. marcescens</i> )	Herrero <i>et al.</i> (1990)

confers high-level resistance to kanamycin in BCG (Murray *et al.*, 1992; Stover *et al.*, 1991, 1993). However, a few other antibiotic-resistance markers have also been used. Some of these antibiotics, such as streptomycin-spectinomycin (Guilhot *et al.*, 1994), have therapeutic value. Since mycobacterial shuttle plasmids can replicate in many mycobacterial species, recombinant BCG might disseminate such antibiotic resistance in nature. The use of broad-host-range vectors, such as RSF1010-derivatives, further increases this potential. Therefore it is highly desirable to develop new and safe markers to select recombinant mycobacteria.

The use of resistance to heavy metals, especially mercury, represents an interesting alternative. Mercury and organomercurial compounds are widely distributed in nature and bacterial resistance to mercury is very common in the environment. In addition, many clinical isolates, including most *Enterobacteriaceae* and almost all *Pseudomonas aeruginosa* isolates are resistant to mercury (for a review see Robinson & Tuovinen, 1984).

Mercury resistance is usually determined by plasmids or transposons that contain up to six *mer* genes; these genes are involved in mercury uptake, resistance or regulation, and are organized in operons (for a review see Misra, 1992). The key enzyme is the *merA*-encoded mercuric reductase, which reduces Hg<sup>2+</sup> to Hg<sup>0</sup>, a highly volatile compound easily eliminated by the bacterium. Sometimes the operons contain an additional gene, *merB*, encoding an organomercurial lyase, an enzyme capable of cleaving C-Hg bonds to yield Hg<sup>2+</sup>, which is subsequently reduced by the *merA* gene product. Other *mer* genes are involved in transport or genetic regulation of the operon.

Meissner & Falkinham (1984) showed that mycobacteria are generally sensitive to mercury and that resistance of some strains is related to the presence of a megaplasmid probably containing mercury-resistance genes. In this study we investigated the possibility of using *mer* genes from *P. aeruginosa* and *Serratia marcescens* for the con-

struction of useful cloning vectors providing selectable resistance to organic and inorganic mercury in recombinant mycobacteria.

## METHODS

**Plasmids, bacterial strains and culture conditions.** The plasmids, as well as the *Escherichia coli* and mycobacterial strains used in this study, are listed in Table 1. The *E. coli* strains were grown in LB medium as described by Sambrook *et al.* (1989). *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG were grown on solid Middlebrook agar 7H10 (Difco) supplemented with 20 mg kanamycin l<sup>-1</sup> where indicated or with the indicated concentrations of HgCl<sub>2</sub> or phenylmercuric acetate (PMA). Sauton medium (Sauton, 1912) was used for growth of the mycobacteria in liquid medium.

**Genetic constructions.** All genetic constructions and plasmid analyses were carried out using standard procedures as described by Sambrook *et al.* (1989). Electroporation of mycobacteria using the CellJect apparatus (Eurogentec) and analysis of plasmids by electroporation was performed as described previously (Baulard *et al.*, 1992).

**Estimation of mercury MICs.** To estimate the MIC, which was defined as the lowest concentration of the mercury compounds at which no bacterial growth was detected, 10 µl mycobacterial suspensions (10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup>) were spotted onto Middlebrook 7H10 agar, or 100 µl of the suspension was inoculated in Roux bottles containing 10 ml liquid medium each supplemented with increasing concentrations of HgCl<sub>2</sub> or PMA. The cultures were incubated at 37 °C for 5 d (for *M. smegmatis*) or 2–3 weeks (for BCG and *M. tuberculosis*) until bacterial growth was detected in the controls. As the maximum permitted dose of inorganic mercury vapour, including Hg<sup>0</sup>, is 50 µg m<sup>-3</sup>, proper ventilation should be used when large quantities of selective growth medium are handled and disposed of. (For a recent review on mercury toxicity, see De Flora *et al.*, 1994.)

**Analysis of plasmid stability in BCG.** To analyse the stability of the recombinant plasmids, five 6- to 8-week-old female Swiss mice (Charles Rivers, France) were infected intravenously with 5 × 10<sup>6</sup> BCG(pMR001) or BCG(pVN2). After 2 weeks, their spleens were removed aseptically, homogenized, and serial dilutions were plated onto Middlebrook 7H10 agar with or

without 10 mg PMA l<sup>-1</sup> for BCG(pVN2) or 12 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> for BCG(pMR001); plates were then incubated for 2 weeks at 37 °C.

## RESULTS

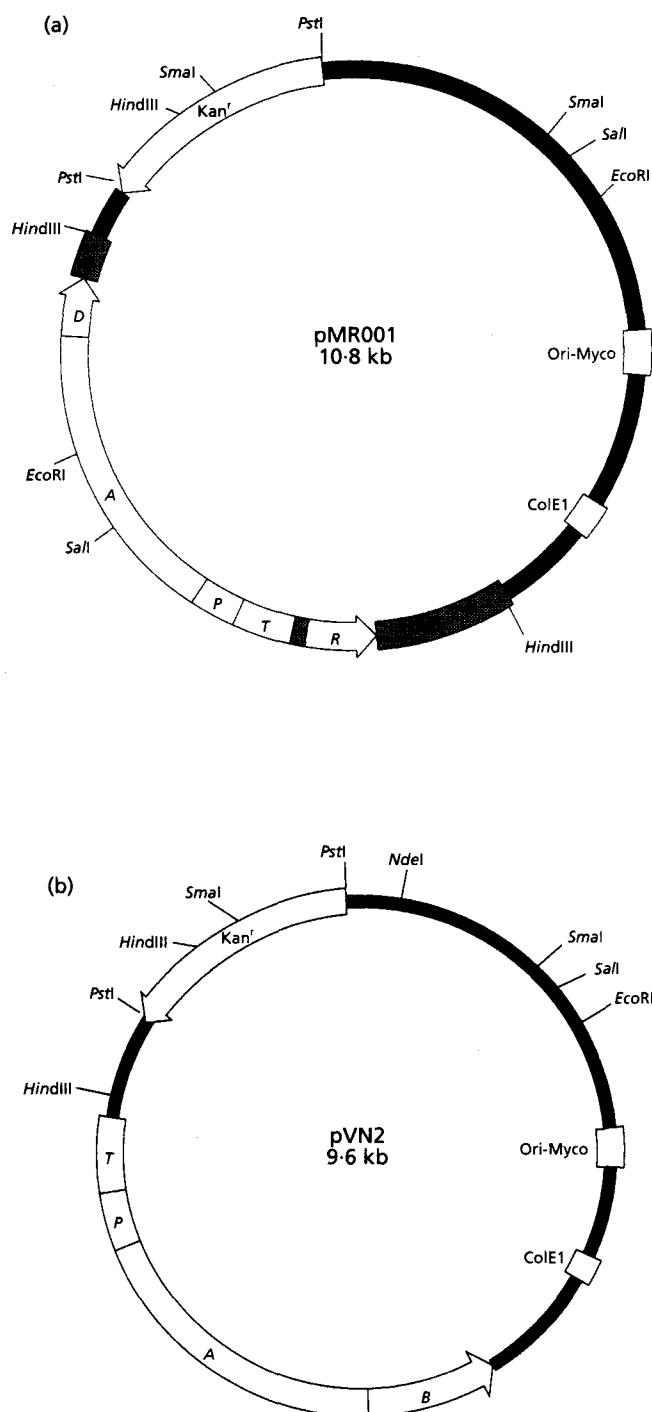
### Construction of mycobacterial shuttle vectors containing the *mer* operons of *P. aeruginosa* and *S. marcescens*

The *mer* operons from plasmids pHP45ΩHg (from *P. aeruginosa*) and pLOFHg (from *S. marcescens*) were introduced separately into the *E. coli*-mycobacterial shuttle vector pRR3 using the following cloning strategies. The 4.3 kb *Sma*I fragment of pHP45ΩHg, containing the complete Tn501 *mer* operon, was inserted into the unique *Sca*I site of pRR3. After ligation and transformation of *E. coli* XL1-Blue, the transformants were plated onto LB agar supplemented with 12 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. Mercury-resistant colonies appeared after overnight incubation at 37 °C, whereas no mercury-resistant colonies developed on LB agar + HgCl<sub>2</sub> plated with *E. coli* XL1-Blue(pRR3). The plasmids from 10 mercury-resistant clones were extracted and analysed, confirming the presence of recombinant plasmids with the expected restriction pattern (data not shown). One of these plasmids, designated pMR001 (Fig. 1a), was then purified by the alkaline-lysis method.

To clone the *mer* operon from *S. marcescens* into pRR3, a 3 kb *Mlu*I fragment was isolated from pLOFHg, blunted using DNA polymerase I (Klenow fragment) and then inserted into the unique *Sca*I site of pRR3. The recombinant plasmids were introduced into *E. coli* XL1-Blue and the transformants selected on LB agar supplemented with 10 mg PMA l<sup>-1</sup>. After isolation and restriction analysis of the recombinant plasmids, one representative showing the correct restriction pattern was purified and designated pVN2 (Fig. 1b).

### Mycobacterial resistance to inorganic mercury in liquid medium

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. bovis* BCG 1173P2 and *M. tuberculosis* H37Ra were transformed with pMR001 and pVN2. Since both plasmids contain the *aph* gene in addition to their *mer* genes, the transformants were first selected on Middlebrook 7H10 agar supplemented with Middlebrook ADC Enrichment and 20 mg kanamycin l<sup>-1</sup>. After incubation at 37 °C for 5 d (for *M. smegmatis*) or 2–3 weeks (for BCG or *M. tuberculosis*), single kanamycin-resistant colonies were obtained for all three mycobacteria. To ensure that the kanamycin resistance was due to the presence of pMR001 or pVN2, four isolated colonies for each species and for each plasmid were analysed by electroporation. All plasmids isolated from the mercury-resistant *E. coli* back-transformants displayed the correct restriction pattern (data not shown). The recombinant mycobacteria were then transferred to mercury-containing growth medium to assess whether mercury-resistance could be expressed in mycobacteria using the *mer* genes from *P. aeruginosa* or *S. marcescens*.



**Fig. 1.** Partial restriction map of pMR001 (a) and pVN2 (b). The thick black line represents DNA originating from pRR3. The open boxes within the black line represent the ColE1 and mycobacterial origins of replication as indicated. The open arrow within the black line represents the kanamycin-resistance gene from Tn903. The open arrows within the grey box show the *merRTPAD* genes from Tn501 (a) or the *merTPAB* genes from pDU1358 (b) as indicated. The direction of transcription of the different genes is indicated by the arrows.

**Table 2.** Expression of mercury resistance in mycobacteria harbouring mycobacterial shuttle vector pRR3, and its derivatives pMR001 or pVN2

Plasmid*	Mercury compounds	MIC (mg l <sup>-1</sup> )†		Mercury resistance phenotype‡
		Solid	Liquid	
pRR3	HgCl <sub>2</sub>	0·15	<1·25	S
	PMA	0·15	<0·15	S
pMR001	HgCl <sub>2</sub>	160	40	R
	PMA	0·6	ND	S
pVN2	HgCl <sub>2</sub>	160	40	R
	PMA	40	5	R

ND, Not determined.

\* Plasmids conferred the same level of mercury resistance in *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG.

† MIC in Sauton liquid medium or on Middlebrook 7H10 solid medium.

‡ Phenotype on Middlebrook 7H10 agar supplemented with 12 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> or 10 mg PMA l<sup>-1</sup>; S, sensitive; R, resistant.

As shown in Table 2, untransformed mycobacteria or organisms transformed with pRR3 were highly susceptible to mercury. As little as 0·15 mg l<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> or PMA in solid medium, and 1·25 mg l<sup>-1</sup> or 0·15 mg l<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> or PMA, respectively, in liquid medium, totally inhibited growth. In contrast, growth of pMR001-containing mycobacteria was only inhibited above 160 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> on solid medium or 40 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> in liquid medium, whereas they were susceptible to PMA in both media, which was expected. The pVN2-harbouring mycobacteria were found to be as resistant as the pMR001-containing bacteria to HgCl<sub>2</sub>, but, in addition, showed increased levels of resistance to PMA, with MIC values of 40 mg l<sup>-1</sup> and 5 mg l<sup>-1</sup> for solid and liquid medium, respectively. Interestingly, similar results were obtained for each plasmid, regardless of which of the three mycobacterial species was analysed.

### Plasmid stability in BCG

The stability of plasmids was analysed by infecting mice with BCG(pMR001) or BCG(pVN2) and, after 2 weeks, plating serial dilutions of their homogenized spleens onto Middlebrook 7H10 agar with or without 10 mg PMA l<sup>-1</sup> for BCG(pVN2) or 12 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> for BCG(pMR001). After 2 weeks' growth at 37 °C, all plates contained about the same number of viable colonies (10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> per spleen) regardless of the presence or absence of the mercuric compounds, indicating that pMR001 and pVN2 are both highly stable *in vivo* in the absence of selective pressure.

### Direct use of mercury resistance for the selection of recombinant mycobacteria

To investigate whether mercury resistance encoded by pMR001 or pVN2 can be directly used for the selection of transformed mycobacteria, each plasmid was electro-

porated into all three bacterial species and the transformants were directly plated onto Middlebrook 7H10 agar supplemented with 12 mg HgCl<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> or 10 mg PMA l<sup>-1</sup>. After 5 d (for *M. smegmatis*) or 2 to 3 weeks (for BCG or *M. tuberculosis*) of growth at 37 °C, 10<sup>3</sup> HgCl<sub>2</sub>-resistant colonies (µg plasmid DNA)<sup>-1</sup> were obtained for each species and 10<sup>3</sup> PMA-resistant colonies (µg pVN2 DNA)<sup>-1</sup> were obtained. No growth was observed for either species transformed with pRR3. In all cases, back transformation to *E. coli* by electroporation confirmed the presence of the expected plasmids in the resistant mycobacterial colonies. Interestingly, the numbers of mercury-resistant clones were generally 2–5-fold higher than the number of kanamycin-resistant clones after transformation with the same plasmids, suggesting that mycobacteria tolerate selection on mercury better than selection on kanamycin.

### DISCUSSION

The insertion of the *mer* operons from Tn501 or from pDU1358 into pAL5000-derivatives resulted in the construction of stable recombinant plasmids which supported the growth of mycobacteria in mercury-supplemented media. These results demonstrate that the *mer* genes from *P. aeruginosa* or *S. marcescens* are expressed in recombinant mycobacteria and provide useful selectable markers. The introduction of pMR001 or pVN2 in mycobacteria induces high-levels of mercury resistance, with MIC values 40–100-fold greater than background values for HgCl<sub>2</sub> and 20–100-fold for PMA. The MIC values were always lower in liquid medium as opposed to solid medium, most likely because of better exposure of the bacteria to mercurial compounds in liquid medium. Similar levels of resistance were observed with all three mycobacteria tested, suggesting that the copy number of the vectors, as well as the expression levels of the *mer* genes, are similar in the three organisms, regardless of differences in growth rate. Besides safety considerations, the *mer* genes studied here offer certain advantages over the most commonly used *E. coli*-derived aminoglycoside phosphotransferase gene, in that selection on mercuric compounds gave consistently higher transformation frequencies than selection on kanamycin. A similar observation has also recently been reported when a hygromycin-resistance marker was compared to the kanamycin-resistance marker (Garbe *et al.*, 1994). As reported for the use of hygromycin-resistance, selection by mercury resistance may therefore also be helpful for the transformation of mycobacteria that have so far been refractory to transformation, especially those that are already resistant to the commonly used antibiotics.

Given that the spectra of resistance of the transformed bacteria correspond to that of the introduced respective *mer* operons (see Table 2), at least the *merA* gene of pMR001 and both the *merA* and *merB* genes of pVN2 are expressed. In addition, both the mercuric reductase and the organomercurial lyase encoded by these genes are enzymatically active within the mycobacterial cell. Whether the other genes of the *mer* operons, *merT*, *merC* and *merD*, are also expressed is unknown at present.

However, it is likely that at least the *merT* and *merP* genes of both *mer* operons are also transcribed, because they constitute the first two cistrons in the polycistronic *mer* operons. Even if these genes are transcribed, it is possible that their products are not needed for mercury resistance in mycobacteria, because, unlike for Gram-negative bacteria, transport proteins are not required for mercurial resistance in Gram-positive bacteria (Silver & Laddaga, 1990).

The *mer* operons are most likely expressed under the control of their own promoter sequences in the mycobacteria, because similar levels of resistance are obtained regardless of the orientation of the *mer* operons in the pRR3 derivative (compare the orientation of the *mer* genes in pMR001 with that in pVN2; see Fig. 1). Although the two *mer* operons come from different bacteria, the operator-promoter sequences are almost identical (Griffin *et al.*, 1987; Misra *et al.*, 1984). In addition, deletion of vector DNA upstream of the *mer* operon, up to the *Nde*I site of pVN2 shown in Fig. 1(b), did not alter the mercury-resistance pattern of the recombinant mycobacteria (V. Escuyer, unpublished results).

In *P. aeruginosa* and *S. marcescens*, expression of the *mer* operons is regulated by the *merR* gene product acting both as a repressor in the absence of  $Hg^{2+}$  and as an activator in the presence of  $Hg^{2+}$ . Although pMR001 contains *merR*, this gene is absent in pVN2. Given that both plasmids provide approximately the same level of resistance to  $HgCl_2$ , *merR* is apparently not needed for the expression of the *mer* operons in mycobacteria, and perhaps is not even expressed in these organisms. In *E. coli* induction of the *mer* operon by MerR increases expression about 100-fold (Ross *et al.*, 1989). Therefore, one might expect drastically increased *mer* promoter activity in pMR001 compared to pVN2, if high levels of functional MerR were produced in mycobacteria transformed with pMR001; this was not seen in this study.

### Concluding remarks

Whatever the mechanism of expression of mercury resistance might be in mycobacteria, the pRR3-derivatives constructed in this study showed high stability both *in vitro* after several subcultures in the absence of selective pressure (A. Baulard, unpublished observations) and *in vivo* in the spleen of intravenously infected mice. Their high stability, combined with mercury-resistance markers, is safe for the environment, and in the absence of antibiotic-resistance markers make such vectors ideal tools for the production of heterologous antigens in BCG with the aim of developing new recombinant live vaccines for human and animal use. In addition, recombinant mycobacteria resistant to mercury rather than to antibiotics should facilitate safe molecular approaches for the study of pathogenesis in a wide array of animal models. The use of mercury resistance is, in principle, not limited to the selection of mycobacteria containing recombinant plasmids, but should also prove useful for the selection of

chromosomal integration events through transposition, phage integration or recombination. Because of the relatively small quantities of mercury compounds used in laboratory-scale experiments, the release of  $Hg^0$  from the recombinant mycobacteria is generally insignificant. The inherent plasmid stability in mycobacteria decreases the need for continued addition of mercury compounds in preparative-scale cultures. If the presence of those compounds in large-scale fermenters is nevertheless required, proper ventilation should prevent the accumulation of toxic mercury vapours.

### ACKNOWLEDGEMENTS

A.B. and V.E. contributed equally to this study. We thank A. Mercenier and D. Marzin for helpful discussion, G. Delcroix for culturing *M. tuberculosis*, B. Gicquel, H. Krisch and K. Timmis for plasmids, and T. Kieser for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. A.B. and L.K. benefited from fellowships from the Région Nord-Pas de Calais. This work was supported by INSERM, Région Nord-Pas de Calais, Institut Pasteur de Lille, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and the Université Paris V.

### REFERENCES

- Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A. & Locht, C. (1992). Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **20**, 4105.
- Bloom, B. R. & Murray, C. J. L. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**, 1055–1064.
- De Flora, S., Bennicelli, C. & Bagnasco, M. (1994). Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutation Res* **317**, 57–79.
- Fellay, R., Frey, J. & Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria. *Gene* **52**, 147–154.
- Garbe, T. R., Barathi, J., Barnini, S., Zhang, Y., Abou-Zeid, C., Tang, D., Mukherjee, R. & Young, D. B. (1994). Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiology* **140**, 133–138.
- Gormley, E. P. & Davies, J. (1991). Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **173**, 6705–6708.
- Goto, Y., Taniguchi, H., Udo, T., Mizuguchi, Y. & Tokunaga, T. (1991). Development of a new host vector system in mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **83**, 277–282.
- Griffin, H., Foster, T. J., Silver, S. & Misra, T. K. (1987). Cloning and DNA sequence analysis of the mercuric and organomercurial resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 3112–3116.
- Guilhot, C., Otal, I., Rompaey, I. V., Martin, C. & Gicquel, B. (1994). Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertion mutant libraries. *J Bacteriol* **176**, 535–539.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557–6567.
- Labidi, A., David, H. L. & Roulland-Dussoix, D. (1985). Restriction endonuclease mapping and cloning of *Mycobacterium fortuitum* var. *fortuitum* plasmid pAL5000. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **136**, 209–215.
- Meissner, P. S. & Falkinham, J. O. (1984). Plasmid-encoded mercuric reductase in *Mycobacterium scrofulaceum*. *J Bacteriol* **157**, 669–672.

- Misra, T. K. (1992).** Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* **27**, 4–16.
- Misra, T. K., Brown, N. L., Fritzinger, D. C., Pridmore, R. D., Barnes, W. M., Haberstroh, L. & Silver, S. (1984).** The mercury resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 5975–5979.
- Murray, A., Winter, N., Lagranderie, M., Hill, D. F., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Moriarty, K. M., Gheorghiu, M. & Gicquel, B. (1992).** Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol Microbiol* **6**, 3331–3342.
- Ranes, M. G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M. & Gicquel, B. (1990).** Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a ‘mini’ *Mycobacterium*–*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* **172**, 2793–2797.
- Robinson, J. B. & Tuovinen, O. H. (1984).** Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol Rev* **48**, 95–124.
- Ross, W., Park, S. J. & Summers, A. O. (1989).** Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the Tn21 *mer* operon. *J Bacteriol* **171**, 4009–4018.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sauton, M. B. (1912).** Sur la nutrition minérale du Bacille Tuberculeux. *C R Acad Sci* **155**, 860–861.
- Silver, S. & Laddaga, R. A. (1990).** Molecular genetics of heavy metal resistances of *Staphylococcus* plasmids. In *Molecular Biology of Staphylococci*, pp. 531–549. Edited by R. P. Novick. New York: VCH.
- Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R. E., Kieser, L., Bloom, B. R. & Jacobs, W. R. Jr (1988).** Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6987–6991.
- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R. Jr (1990).** Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **37**, 1911–1919.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R. Jr & Bloom, R. (1991).** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–460.
- Stover, C. K., Bansal, G. P., Hanson, M. S., Burlein, J. E., Paszynski, S. R., Young, J. F., Koenig, S., Young, D. R., Sadziene, A. & Barbour, A. G. (1993).** Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette–Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *Exp Med* **178**, 197–209.
- WHO. (1991).** *Expanded Programme on Immunization, updated*. Stockholm: World Health Organization.

Received 17 October 1994; revised 14 December 1994; accepted 23 December 1994.

### **3-Vecteurs d'expression et de sécrétion adaptés à l'usage vaccinal**

Sur la base des résultats précédents, nous avons entrepris la construction d'une série de 3 vecteurs conférant à la fois la résistance au mercure et permettant l'expression et la sécrétion d'un antigène hétérologue chez le BCG. Ces vecteurs ont été aménagés de façon à faciliter le clonage de séquences codantes en phase avec la séquence d'exportation 85A. De plus, ils contiennent des sites de restriction uniques permettant d'échanger très aisément les signaux d'expression/sécrétion de l'antigène 85A.

Puisque les taux d'expression et de sécrétion de la Sm28GST sont relativement faibles lorsque le gène codant la Sm28GST est placé en aval des signaux géniques de l'antigène 85A, l'immunogénicité de la souche recombinante est faible chez la souris, même si une réponse cellulaire spécifique a pu être détectée. Deux hypothèses peuvent expliquer la faible expression de l'antigène. D'une part, la Sm28GST pourrait présenter des difficultés à être exportée et une exportation forcée pourrait conduire à une chute de son propre taux d'expression. D'autre part, le promoteur 85A pourrait ne pas être suffisamment fort pour induire une expression optimale de Sm28GST chez le BCG.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons tenté d'exprimer et de sécréter chez le BCG un autre antigène sous le contrôle des signaux d'expression et d'exportation de l'antigène 85A de *M. tuberculosis*. L'antigène utilisé est naturellement sécrété chez l'hôte original. Il s'agit de la

sous-unité  $\beta$  de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG $\beta$ ). La hCG $\beta$  est un marqueur tumoral associé au cancer de la vessie. Chez l'homme sain, ce marqueur n'est pas exprimé. Ainsi, dans l'optique de mettre au point un vaccin antitumoral destiné à protéger des formes infiltrantes de ce type de cancer, nous avons développé un BCG recombinant résistant au mercure (compatible avec son utilisation chez l'homme) qui exprime et sécrète la hCG $\beta$ .

Les résultats obtenus sont décrits dans l'article "A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines", soumis à "Gene". Ils montrent que la hCG $\beta$  peut être exprimée à haut niveau et sécrétée de manière efficace par le BCG. Ces résultats suggèrent donc que le faible niveau d'expression de la Sm28GST n'est pas lié à la force du promoteur 85A mais plutôt à la nature intrinsèque de l'antigène lui-même, particulièrement réfractaire à la sécrétion.

# A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines

(*Mycobacterium bovis* BCG; shuttle vectors; mercury resistance; 85A antigen promoter; human choriogonadotropin; bladder cancer)

Alain Baulard<sup>a</sup>, Laurent Kremer<sup>a,b</sup>, Philip Supply<sup>a</sup>, Dominique Vidaud<sup>c</sup>, Jean-Michel Bidart<sup>c</sup>, Dominique Bellet<sup>c</sup>, and Camille Locht<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109, <sup>b</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, and <sup>c</sup>Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs URA1484 CNRS ,4, Avenue de l'Observatoire 75006 Paris, France.

Correspondence to: Dr. C. Locht, Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

Tel. (+33) 20.87.77.28; Fax (+33) 20.87.79.06.

Abbreviations: BCG, bacillus Calmette-Guérin; bp, base pair(s); hCG $\beta$ , free human chorionic gonadotropin beta subunit; kb, kilobase(s); mAB, monoclonal Antibody; M<sub>r</sub>, molecular weight; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; R, resistance; SD, Shine-Dalgarno box; SDS, sodium dodecyl sulfate.

## SUMMARY

Recombinant BCG is a promising candidate as a live vaccine delivery system. Thus far, however, only autoreplicative plasmids carrying the heterologous genes to be expressed in BCG together with antibiotic-resistance genes have been successfully used. This could potentially lead to the spreading of antibiotic resistance among other bacteria, and might therefore be unsafe for the environment. In this study, we present a series of 3 *Escherichia coli*-Mycobacteria shuttle vectors which enable expression and secretion of antigens without the use of antibiotic resistance markers. All these plasmids confer mercury resistance to the host bacteria as the only selectable marker and contain a unique restriction site to allow for single-step in-frame cloning of open reading frames downstream from the *M. tuberculosis* 85A antigen promoter and export signal. The system was used to express and secrete the free  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin (hCG $\beta$ ), the potential target of an immunotherapeutic vaccine.

## INTRODUCTION

The use of vaccines is one of the most cost-effective medical interventions in terms of the public health. Delivery of vaccines by live vehicles provides a particularly interesting approach. In several instances, attenuated viral and bacterial strains have been shown to provide excellent protection against their respective virulent microorganisms. The most spectacular success using this strategy was the eradication of smallpox by systematic immunization with cowpox virus. More recently, expression of heterologous antigens in attenuated live vaccine strains has shown promise for the development of multivalent vaccines capable of protecting against several diseases simultaneously (Stover, 1994).

Among live bacterial vaccines, the anti-tuberculosis vaccine *Mycobacterium bovis* BCG has been the most widely used over the past several decades, and has shown a very low incidence of severe side-effects. In addition, BCG expresses intrinsic adjuvant activities, especially for the development of cell-mediated immunity. It is therefore an attractive microorganism for heterologous antigen expression, in particular for those antigens against which cellular immune responses are desired. Several heterologous antigens have recently been expressed, and recombinant BCG has already provided protection against *Borrelia burgdorferi* (Langermann et al., 1994b), *Leishmania* (Connell et al., 1993), and *Streptococcus pneumoniae* (Langermann et al., 1994a).

In all cases, the recombinant antigens have been expressed from autoreplicative plasmids containing antibiotic-resistance genes as selectable markers. Since these plasmids can replicate in many mycobacterial species, their use could potentially disseminate plasmid-borne resistance to other mycobacteria, including important pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* and

*Mycobacterium leprae*, thereby increasing the risk of the acquisition of drug resistance. The use of alternative selective markers is therefore highly desirable.

In a previous study, we described the potential of mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria (Baulard et al., 1995). Here, we describe a new series of mycobacterial expression vectors based on mercury resistance as the only selectable marker and containing the *M. tuberculosis* 85A antigen promoter and signal sequence-coding region. The 85A antigen is one of the major secreted proteins of slow growing mycobacteria (Wiker and Harboe, 1992). We have recently characterized its promoter and shown that, together with its signal peptide-coding sequence, it can be used for heterologous gene expression in BCG (Kremer et al., 1995).

## RESULTS AND DISCUSSION

### (a) Construction of the pEN103 expression vector

The various steps in the construction of the expression vector pEN103 are depicted in Fig. 1. The 4.3-kb *Hind*III fragment of pHG45Ω-Hg (Fellay et al., 1987) containing the *merDAPTR* genes was cloned into the unique *Hind*III site of pEC001. This plasmid is a pUC18-derivative that contains the 85A antigen promoter and signal peptide-coding sequence (Kremer et al., 1995). The signal peptide-coding sequence is immediately followed by unique *Bam*HI and *Kpn*I sites. The resulting plasmid, named pEC013, was then digested by *Pvu*II, and the 4.8-kb fragment was ligated into the unique *Scal*I site of pRR3ΔKan (Kremer et al., 1995) to create pEN102. Next, the *Hind*III site located at the 5' end of the HgCl<sub>2</sub><sup>R</sup> gene block was eliminated. Therefore, pEN102 was partially digested with *Hind*III, and the linearized pEN102 was purified by agarose gel electrophoresis using a 0.6%

agarose gel, and electro-eluted. It was then filled-in with PolIk, self-ligated and transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA). After restriction analysis of several HgCl<sub>2</sub><sup>R</sup> clones, one pEN102-derivative containing a unique *Hind*III site at the beginning of the 85A antigen promoter was purified and named pEN103. This plasmid contains the 85A antigen promoter and signal peptide-coding sequence, in addition to the *merDAPTR* genes that confer resistance to HgCl<sub>2</sub> as the only selectable marker. The vector also contains unique *Bam*HI and *Kpn*I sites directly downstream of the 85A antigen signal peptide-coding sequence that allow easy in-frame cloning of open reading frames to be expressed and secreted in mycobacteria. Finally, pEN103 also contains a unique *Hind*III site upstream of the 85A antigen promoter, which, together with the *Bam*HI and the *Kpn*I sites, facilitates the replacement of 85A antigen expression and secretion signals by other expression signals.

#### (b) Construction of pEN104 and pEN105

Two derivatives of the pEN103 expression vector were constructed to facilitate the cloning of principally any gene in frame with the 85A antigen signal sequence. To construct pEN104, the 545-bp *Hind*III/*Bam*HI fragment from pEN103 was replaced by a 546-bp *Hind*III/*Bam*HI fragment amplified from pEC001 by polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotides with the following sequences: 5'-TATAAGCTTGACCGGCACCGCGATACGTT-3' and 5'-CGCGGATCCTGCCCGCGGTGCGCCGTGCCACC-3'. Similarly, pEN105 was obtained by replacing the 545-bp *Hind*III/*Bam*HI fragment from pEN103 with a 547-bp *Hind*III/*Bam*HI PCR fragment amplified from pEC001 using oligonucleotides 5'-TATAAGCTTGACCGGCACCGCGATACGTT-3' and 5'-CGCGGATCCGTGCCCGCGGTGCGCCGTGCCACC-3'. All PCR fragments, including the 545-bp *Hind*III/*Bam*HI fragment from pEN103, were completely

sequenced using the dideoxy chain termination method as described by Sambrook et al. (1989). The three plasmids pEN103, pEN104 and pEN105 differ from each other only by the addition of 1 and 2 nucleotides between the 3' end of the 85A antigen signal peptide-coding sequence and the unique *Bam*HI site (Fig. 2).

### (c) Expression-secretion of hCG $\beta$ using pEN102 in mycobacteria

To test the use of the new series of vectors for expression in mycobacteria, we used cDNA encoding the free beta subunit of human chorionic gonadotropin (hCG $\beta$ ), a tumour-associated antigen detected in patients with bladder cancer (Iles and Chard, 1991). Since intravesical BCG therapy is one of the most effective treatments for superficial bladder tumours (Lamm et al., 1991; Herr, 1992), the expression of hCG $\beta$  in BCG might constitute a new immunotherapeutic approach to bladder cancer by combining the therapeutic effect of BCG with its adjuvanticity against the hCG $\beta$  tumor-associated antigen (Housseau et al., in press). In addition, recombinant BCG which produces hCG $\beta$  might be useful in the development of anti-fertility vaccines (Talwar et al., 1994).

The DNA sequence encoding mature hCG $\beta$  without its original signal sequence was cloned in pBSK+ (Stratagene) and then amplified using the following oligonucleotides: 5'-CATGGGGATCCCAAGGAGGCCGCTTCG-3' and 5'-CGGGGTACCTTATTGTGGGAGGATCGGG-3'. The PCR product was purified by agarose gel electrophoresis and electro-elution, completely sequenced, digested with *Bam*HI and *Kpn*I, and then inserted into the *Bam*HI/*Kpn*I-restricted pEN102. The resulting plasmid, named pEN101, was then used to transform BCG (vaccine strain 1173P2, WHO Stockholm) and *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (Snapper et al., 1990) by electroporation as described previously (Kremer et al., 1995). The transformed mycobacteria were then plated onto Middlebrook agar 7H10 (Difco) containing 12  $\mu$ g HgCl<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> and incubated at 37°C. Six (for *M. smegmatis*) or

fifteen (for BCG) days later, several  $\text{HgCl}_2^R$  colonies were then analyzed for their plasmid content by the electroporation procedure (Baulard et al., 1992). Clones containing the expected recombinant plasmid were then grown in 50 ml of Sauton medium (Sauton, 1912) containing 10  $\mu\text{g}$   $\text{HgCl}_2$   $\text{ml}^{-1}$ . Ten milliliter aliquots of the cultures were harvested at mid-log phase by centrifugation. The cell pellets were resuspended in 0.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS; 20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [pH 7.5], 0.15 M NaCl) and disrupted for 10 min with a Branson Sonifier 450 at half-maximal constant output. The resulting BCG or *M. smegmatis* crude extracts were then separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel as described by Laemmli (1970). After electrophoresis, the proteins were transferred onto a Hybond-C Extra membrane (Amersham, Les Ulis, France). The membrane was then saturated with 5% dry milk in PBS and 0.1 % Tween 20. The presence of hCG $\beta$  was detected using the anti-peptide monoclonal antibody (mAB) FB12 followed by incubation with goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Promega, Madison, WI). FB12 is an antibody elicited against a synthetic peptide corresponding to the 109-145 carboxy-terminal portion of hCG $\beta$ . This antibody recognizes residues 110-116 of hCG $\beta$ , is totally specific for this glycoprotein subunit and binds to the hCG $\beta$  polypeptide in either its native or its unfolded configuration (Bidart et al., 1987).

As shown in Fig. 3, two specific immunoreactive proteins were detected in pEN101-containing *M. smegmatis* and BCG, whereas they were not detected in extracts of untransformed *M. smegmatis* or BCG. In each case, both immunoreactive proteins were significantly smaller than the purified native hCG $\beta$  subunit which is naturally glycosylated. The apparent  $M_r$  of the smaller immunoreactive protein corresponds to the expected size of the deglycosylated hCG $\beta$  subunit after cleavage of the signal peptide. Since signal peptidases are on the extracytoplasmic side of the membrane, this observation strongly suggests that

recombinant hCG $\beta$  was at least partially secreted through the mycobacterial plasma membrane. In addition, it is likely that the larger immunoreactive protein represents the precursor form. Indeed, its apparent  $M_r$  is compatible with the size of unglycosylated pre-hCG $\beta$  fused to the 85A antigen signal peptide.

**(d) Immunochemical analysis of the hCG $\beta$  subunit produced by recombinant BCG**

To analyse the configuration of hCG $\beta$  produced by recombinant BCG, we used mABs FBT11 and HB2 in addition to FB12 to carry out Western blotting experiments, immunoradiometric assays and competitive inhibition assays with hCG. The mABs FBT11 and HB2 are highly specific for hCG $\beta$  but, in contrast to FB12, these antibodies bind only to hCG $\beta$  in its native form. Immunoradiometric assays and competitive inhibition assays were performed as already described (Bidart et al., 1987). The results from these experiments indicate that the hCG $\beta$  subunit produced by recombinant BCG bound only to antibody FB12, and that  $^{125}\text{I}$ -labelled hCG displaced the binding to FB12. Taken together, these observations indicate that the protein recognized by antibody FB12 (1) possessed the carboxy-terminal portion characteristic of hCG $\beta$ , (2) displayed a  $M_r$  similar to that of the deglycosylated hCG subunit, and (3) adopted a conformation different from that of the native hCG $\beta$  subunit.

**(e) Conclusions**

We have constructed a series of mycobacterial expression vectors with the following features:

- (1) They contain the mercury resistance genes as the only marker for safe selection in *E. coli* and in mycobacteria.

- (2) They contain the 85A antigen promoter and signal sequence-coding region followed by unique *Bam*HI and *Kpn*I sites for easy in-frame cloning of open reading frames encoding proteins to be expressed and secreted in mycobacteria.
- (3) They contain a unique *Hind*III site which, together with the *Bam*HI or *Kpn*I site, can conveniently be used to exchange the expression signals.
- (4) Efficient expression and secretion of the hCG $\beta$  subunit in *M. smegmatis* and BCG was demonstrated using one of the members of the pEN series. The hCG $\beta$  subunit produced by recombinant BCG adopts an unfolded conformation favourable to the generation of antigenic determinants capable of stimulating T cells.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

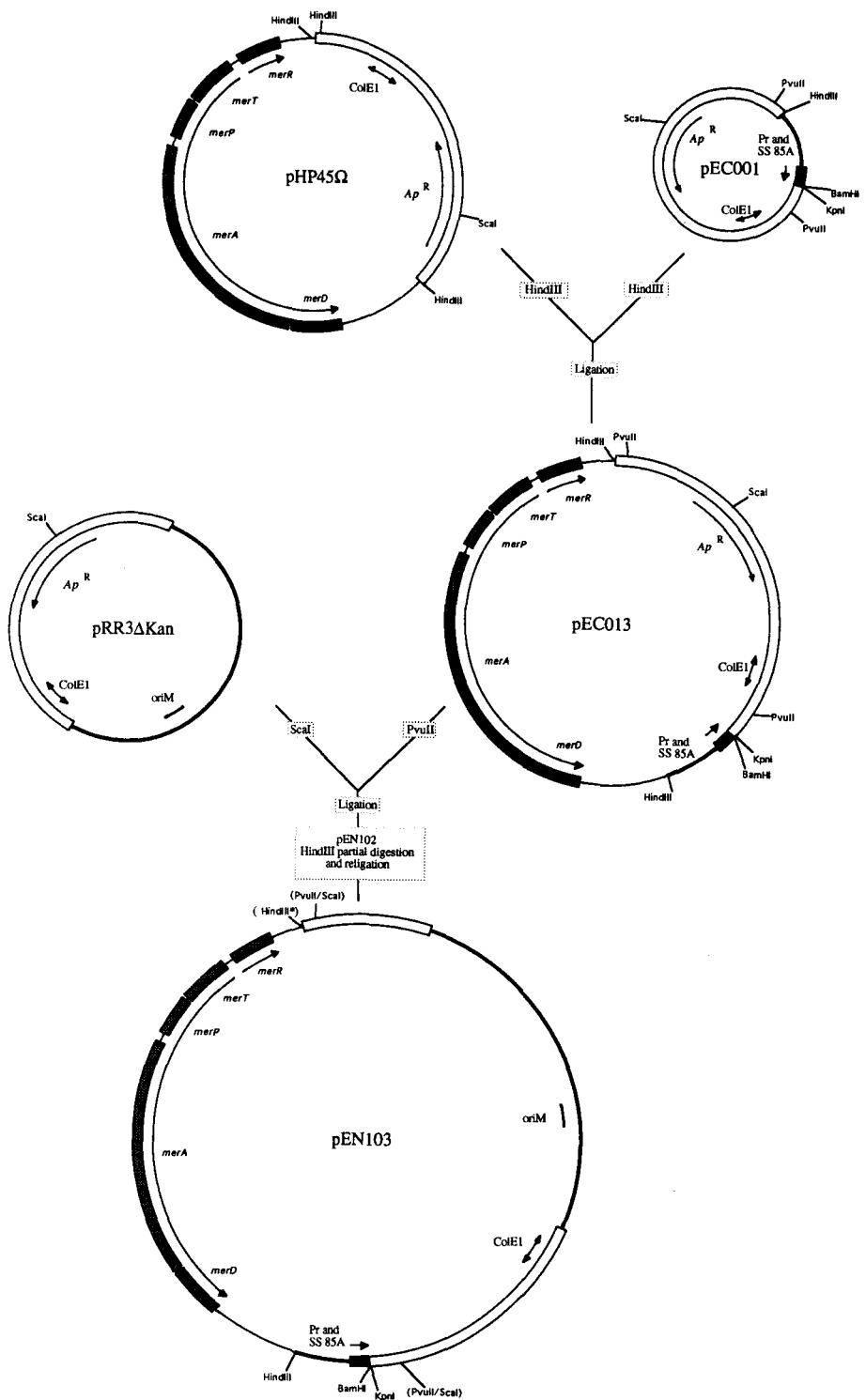
We thank H. Krisch for pHp45Ω-Hg and T. Kieser for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. This work was supported by INSERM, the Institut Pasteur de Lille, the Région Nord-Pas-de-Calais, the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the EC Biotech program. L. K. holds a fellowship from the Région Nord-Pas-de-Calais, and P. S. of the EC.

## REFERENCES

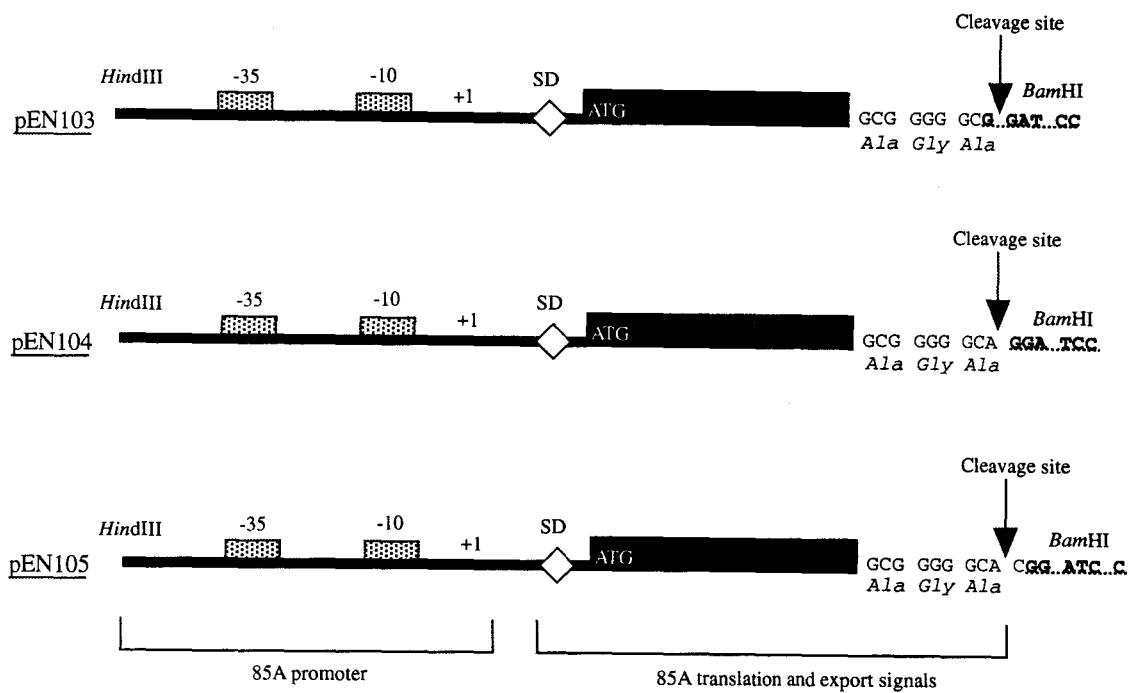
- Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A. and Locht, C.: Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp and *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 20 (1992) 4105.
- Baulard, A., Escuyer, V., Haddad, N., Kremer, L., Locht, C. and Berche, P.: Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. Microbiology 141 (1995) 1045-1050.
- Bidart, J.-M., Troalen, F., Bohuon, C.J., Hennen, G. and Bellet, D.: Immunochemical mapping of a specific domain on human choriogonadotropin using anti-protein and anti-peptide monoclonal antibodies. J. Biol. Chem. 262 (1987) 15483-15489.
- Connell, N.D., Medina-Acosta, E., McMaster, W.R., Bloom, B.R. and Russell, D.G.: Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 11473-11477.
- Fellay, R., Frey, J. and Krisch, H.: Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. Gene 52 (1987) 147-154.
- Herr, H.W.: Intravesical BCG - current results, natural history and implications for urothelial cancer prevention. J. Cell. Biochem. 161 (1992) 112-119.
- Housseau, F., Rouas-Freiss, N., Benifla, J.-L., Marcillac, I., Roy, M., Troalen, F., Fernandez, H., Prapotnick, D., Valencien, G., Bougaran, J., Cottu, P., Culiné, S., Droz, J.-P., Bidart, J.-M. and Bellet, D.: Reaction of peripheral blood lymphocytes to the human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit in patients with productive tumors. Int. J. Cancer (in press)

- Iles, R.K. and Chard, T.: Human chorionic gonadotropin expression by bladder cancers : biology and clinical potential. *J. Urol.* 145 (1991) 453-458.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. and Locht, C.: Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* 177 (1995) 642-653.
- Laemmli, U.K.: Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Lamm, D.L., Brent, M.D., Blumenstein, A., Crawford, E.D., Montie, J.E., Scardino, P., Barton Crossman, H., Stanisic, T.H., Smith Jr, J.A., Sullivan, J., Sarosdy, M.F., Crissman, J.D. and Coltman, C.A. : A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *New Engl. J. Med.* 325 (1991) 1205-1209.
- Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J.E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E. and Stover, C.K.: Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* 180 (1994a) 2277-2286.
- Langermann, S., Palaszynski, S.R., Sadziene, A., Stover, C.K. and Koenig, S.: Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing an outer-surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 372 (1994b) 552-555.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sauton, B.: Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C. R. Acad. Sci. Paris* 155 (1912) 860-861.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Keiser, T. and Jacobs, W.R.Jr.: Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4 (1990) 1911-1919.

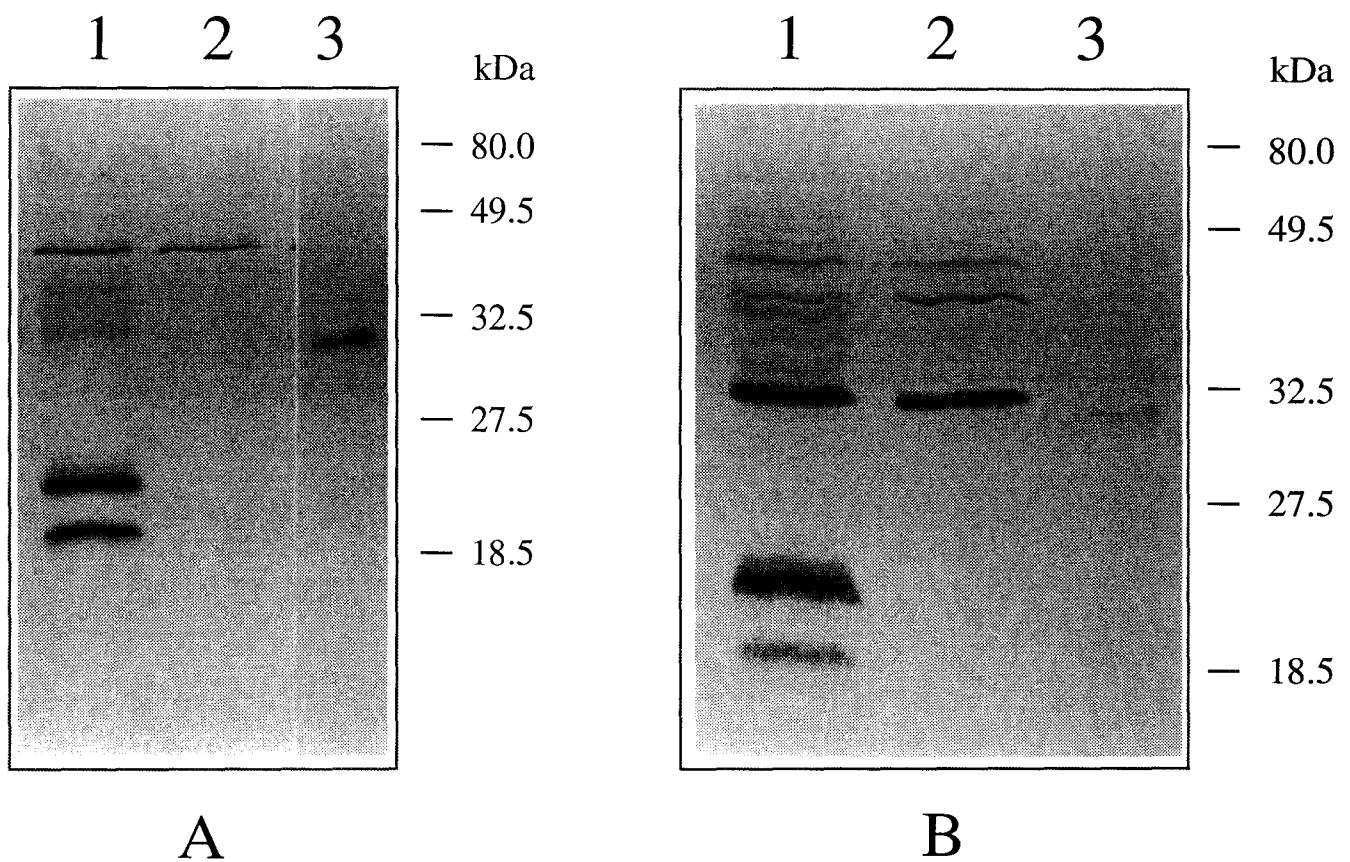
- Stover, C.K.: Recombinant vaccine delivery systems and encoded vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 6 (1994) 568-571.
- Talwar, G.P., Singh, O., Pal, R., Chatterjee, N., Sahai, P., Dhall, K., Kaur, J., Das, S.K., Suri, S., Buckshee, K., Saraya, L. and Saxena, B.N.: A vaccine that prevents pregnancy in women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 8532-8536.
- Wiker, H.G. and Harboe, M.: The antigen-85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56 (1992) 648-661.



**FIG. 1.** Construction of pEN103. Open boxes represent DNA fragments originating from pUC18. Thick lines correspond to mycobacterial DNA, including the 85A antigen promoter and signal peptide coding sequence (indicated by the black box labelled Pr and SS 85A). Thin lines represent DNA from pHp45Ω-Hg and containing the *merDAPTR* genes, shown by stippled boxes. The arrows show the direction of transcription. Only restriction sites relevant to the pEN103 construction or its use are indicated. (*HindIII\**) refers to the *HindIII* site present in pEN102, but absent in pEN103. (*PvuII/Scal*) indicates junctions of the half *PvuII* and *Scal* sites. *ColE1* denotes the *E. coli* origin of replication and *oriM* the mycobacterial origin of replication originally from pAL5000.



**FIG. 2.** Structure of the 85A antigen promoter and signal peptide coding sequence of the pEN series. Thick lines represent the 85A antigen promoter region, with -10 and -35 boxes indicated by stippled boxes. The transcriptional start site is shown by +1. SD represents the ribosomal binding site followed by the indicated ATG initiation codon. Black boxes show signal peptide-coding sequences ending with the indicated nucleotides coding for the last three residues of the signal peptide. Signal peptide-cleavage sites are indicated by arrows. Underlined bold letters show the unique *Bam*HI site in each of the three plasmids.



**FIG. 3.** Production of hCG $\beta$  in *M. smegmatis* (A) and BCG (B). Lanes 1 contain extracts of mycobacteria transformed with pEN101, lanes 2 contain extracts of untransformed mycobacteria, and lanes 3 contain 80 ng of purified hCG $\beta$ . The hCG $\beta$  proteins were detected by mAB FB12 used at 5-10  $\mu$ g/ml. Sizes of  $M_r$  are given in the right margins.

Quatrième partie:

**CONSTRUCTION D'UNE SOUCHE  
IMMUNOGENE DE BCG  
EXPRIMANT LA Sm28GST SOUS  
FORME CYTOPLASMIQUE**

Les résultats précédents ont montré que lorsque le gène codant la Sm28GST était placé sous le contrôle des signaux de sécrétion de l'antigène 85A, un faible niveau d'expression était obtenu. Dans le but d'augmenter le niveau de production de la Sm28GST chez le BCG, nous avons tenté d'exprimer l'antigène sous forme cytoplasmique. Dans un nouveau système d'expression, l'information codant la Sm28GST a été fusionnée en aval du promoteur *hsp60* du BCG. Ce promoteur constitutif fort a en effet été utilisé à plusieurs reprises pour surexprimer divers antigènes hétérologues chez les mycobactéries.

Après évaluation du taux d'expression de la Sm28GST chez le BCG par immunoempreinte, nous avons purifié l'antigène par chromatographie d'affinité sur une matrice de glutathion-agarose. La protéine recombinante purifiée était enzymatiquement active, suggérant qu'elle avait conservé sa structure tridimensionnelle, au moins au niveau de son site actif.

Enfin, la capacité de cette nouvelle souche de BCG à induire une réponse humorale spécifique de la Sm28GST a été évaluée chez des souris BALB/c immunisées par différentes voies. La nature et l'intensité de la réponse humorale anti-Sm28GST ont été analysées par immunoempreinte et par ELISA. Une réponse humorale spécifique est obtenue après une seule immunisation par le BCG quelle que soit la voie d'immunisation. Cette réponse est fortement augmentée après un rappel et persiste pendant au moins une année chez les souris immunisées. La présence d'anticorps spécifiques neutralisant l'activité enzymatique de la Sm28GST a également été observée.

L'ensemble de ces résultats est détaillé dans l'article qui suit et qui a été soumis à "Journal of Immunology": "Antibody responses elicited in mice immunized with recombinant BCG producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase".

**Antibody responses elicited in mice immunized with recombinant BCG  
producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase<sup>1</sup>**

(Running head : anti-Sm28GST antibodies with recombinant BCG)

Laurent Kremer<sup>\*,†</sup>, Gilles Riveau<sup>\*</sup>, Alain Baulard<sup>†</sup>, André Capron<sup>\*</sup>, and  
Camille Locht<sup>2†</sup>

<sup>\*</sup>Laboratoire des Relations Hôtes-Parasites et Stratégies Vaccinales, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

<sup>†</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109,

**Abstract**

Schistosomiasis is a group of severe parasitic diseases in man and domestic animals, which are especially of importance in the developing world. No efficacious vaccine is currently available. However, both cell-mediated and antibody-mediated immune responses against the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) appear to be involved in protection. This antigen was produced at high levels in recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. The recombinant protein bound glutathione and expressed glutathione S-transferase activity, indicating that the active site of the enzyme was properly folded. Single i.v., i.p., s.c., or intranasal immunizations with the recombinant BCG resulted in significant anti-Sm28GST antibody responses in BALB/c mice which were enhanced by a booster dose. The antibody responses remained high for at least one year after immunization. Analyses of the isotype profiles indicated that i.v.-immunized mice produced high titers of anti-Sm28GST IgG2a antibodies, and less IgG2b and IgG1 antibodies, suggesting a Th1-like type of response. Mice immunized by the s.c. route initially also produced high levels of IgG2a and low titers of IgG1 and IgG2b, but the titers of the latter two isotypes increased gradually thereafter, tending towards a mixed Th1/2 profile. Intraperitoneal immunization provided a mixed profile directly after the first administration. High titers of anti-Sm28GST antibodies also corresponded to high levels of neutralization of the enzymatic activity. These results indicate that recombinant BCG induces both a strong Th1-type response and a neutralizing antibody response against Sm28GST, two parameters that have been found to correlate with protection against *S. mansoni*.

## Introduction

Human schistosomiasis is a chronic and debilitating disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. With a prevalence of 200 million people infected and some 500,000 deaths per year (1), schistosomiasis remains a major health problem in the developing world. In addition, it is an important pathogen for several domestic animal species and causes significant economic losses, mostly in tropical countries. The disease is associated with the daily production of eggs by the intravascular worms. When trapped in liver sinusoids these eggs cause an inflammatory response, leading to cell-mediated granuloma formation and ultimately to hepatic fibrosis (2).

Significant progress has been made towards the identification of protective antigens (3), and considerable attention has been directed to molecules common to the larval and adult stage of the parasite, such as the glutathione S-transferase. The *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase (Sm28GST)<sup>3</sup> was found to protect rodents and baboons against experimental infections (4, 5). The protection conferred by Sm28GST affected worm burden and female fecundity (6, 7). Immune protection appears to be both cell and antibody mediated (4, 8).

BCG, a live attenuated *Mycobacterium bovis* strain, is used in many countries as a vaccine against human tuberculosis (9). Both cellular and humoral immune responses are observed in animal models vaccinated with BCG (10, 11). Therefore this micro-organism constitutes an attractive live vector for the presentation of foreign antigens such as Sm28GST. In addition, BCG offers several other advantages for use as a recombinant antigen delivery

system (12). It has been given to more than 3 billion people world-wide since 1948 with a very low incidence of severe side effects. It can be administered at, or any time after birth, and its take is unaffected by maternal antibodies. Given as a single inoculum BCG can sensitize to tuberculin for 5 to 50 years. It is also a potent immunostimulant in humans and animals. Moreover, the dose of BCG vaccine is substantially less expensive than many other current vaccine formulation.

Recombinant expression systems have already been developed for the presentation of heterologous antigens by BCG (13), and have been shown to induce antibody, helper T cell and cytotoxic T cell responses against the foreign antigens in experimental models (14-16). In this study, we developed a recombinant BCG strain expressing the Sm28GST with or without a signal peptide under the control of the *hsp60* promoter. We compared and characterized the specific antibody responses elicited after a single or two administrations by four different routes in BALB/c mice. Both Th1-and Th2-type antibodies were elicited. In addition, strong neutralization of the Sm28GST enzyme activity was obtained, a property that has been correlated with protection against schistosomiasis in humans (17).

## Materials and Methods

### Plasmids and DNA manipulation

Vectors pUC18 and pUC4K were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA) and Stratagene (La Jolla, CA), respectively. Plasmids pRR3ΔKan, pEN00X4 and pUC::*hsp60* were described previously (18, 19). Restriction analyses of plasmids from mycobacteria were done by electroporation in *Escherichia coli*, as described elsewhere (20). Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, T4 DNA ligase and Klenow enzyme were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). All DNA manipulations were performed under standard conditions, as described by Sambrook *et al.* (21). Nucleotide sequences were determined from double-stranded DNA by the dideoxyribonucleotide chain-termination method, using [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (1,000 Ci/mmol; Amersham France, Les Ulis, France) and the DNA T7 sequencing kit (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden).

### Bacterial strains and growth conditions

All cloning steps were performed in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). Expression studies were performed in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (22), generously provided by T. Kieser, and in *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2, WHO Stockholm, Sweden). All liquid cultures of BCG and *M. smegmatis* were grown in Sauton medium (23) at 37°C. Mycobacterial transformation was performed as previously described (18).

## Construction of the Sm28GST expression vectors

To construct pUC::Sm28GST, a 780-bp fragment containing the Sm28GST gene was amplified by PCR as described previously (18). This fragment was then restricted by *Bgl*II and cloned into the *Bam*HI site of pUC18. The *Hind*II/*Nco*I fragment containing the *hsp60* promoter was isolated from pUC::*hsp60* and cloned into pUC::Sm28GST restricted by *Sma*I and *Nco*I to yield pEC011. Next, a kanamycin-resistance cassette was isolated from pUC4K after *Hind*II restriction and inserted into pEC011, linearized with *Asp*718 and filled-in with Klenow fragment. The 5.22-kb *Eco*RI/*Sph*I fragment containing the *aph* gene, the BCG *hsp60* promoter, ribosomal binding site and ATG initiating triplet, as well as the Sm28GST-coding sequence, was treated with T4 DNA polymerase and cloned into the *Sca*I-digested pRR3ΔKan shuttle plasmid. The resulting plasmid pEN005 (Fig. 1A) was introduced in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 and BCG, and transformants were selected for resistance to kanamycin.

In a second construction, we attempted to secrete Sm28GST by splicing its gene in-frame with the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen signal peptide-coding sequence. For this purpose the 211-bp DNA fragment containing the *M. tuberculosis* 85A antigen signal peptide-coding sequence followed by the first 57 nucleotides from the Sm28GST gene was amplified by PCR from pEN00X4 using the primers 5'GGGAAGCAAACATGTTGCTTGTTGACAGG3' and 5'CGATTCAAGCACGTCCGCGTCCG3' (Eurogentec, Liège, Belgium). The first primer contains an *Af*III restriction site (underlined), compatible with *Nco*I. The PCR product was first cloned into *Sma*I-restricted pUC18, and the 147-bp *Af*III/*Nco*I fragment was then isolated from this resulting plasmid and cloned in-frame into pEN005, partially digested with *Nco*I. Finally, a clone carrying the

85A antigen signal peptide- and Sm28GST-coding sequences in the proper orientation relative to the *hsp60* promoter was designated pEN006 (Fig. 1B).

#### Analysis of Sm28GST production in recombinant mycobacteria

Ten ml of mycobacterial cultures were harvested at mid-log phase. The cells were centrifuged, washed once with 1.5 ml of PBS and disrupted on ice for 10 min with a Branson sonifier 450 at half maximum constant output. Culture lysates, approximately equivalent to  $5 \times 10^6$  bacteria, were separated by 15% SDS-PAGE, as described by Laemmli (24). Total proteins were then transferred onto a Hybond-C extra membrane (Amersham France). The membrane was saturated with 5% dry milk in PBS-0.1% Tween 20 (PBS/Tw) and then incubated with anti-Sm28GST 190-211 peptide rat polyclonal antibodies. These antibodies were kindly provided by G. Renauld and N. Mielcarek (Institut Pasteur de Lille, France) and were generated as previously described (18). Goat anti-rat alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Immunotech, Marseille, France) were then used to develop the immunoblots.

#### Purification of Sm28GST from recombinant BCG

Recombinant BCG were grown to mid-log phase in Sauton medium supplemented with 25 µg/ml kanamycin, sedimented by centrifugation, washed and disrupted as described above. After sonication, the lysates were clarified by centrifugation at 25,000 x g for 30 min at 4°C. The soluble fraction was recovered and diluted approximately 10 fold in equilibration buffer (PBS

containing 1 mM EDTA and 0.5 mM PMSF). Glutathione-agarose beads (Sigma, St. Louis, MO) were suspended in equilibration buffer 2 hours before use, packed into a column (1 x 1 cm) and equilibrated with the same buffer. The protein sample was applied at a flow rate of 1 ml/min. After extensive washing with equilibration buffer, Sm28GST was eluted with 7 mM glutathione (GSH, Sigma) in elution buffer (0.1 mM DTT, 50 mM Tris-base adjusted to pH 9.1 with NaOH). Fractions of 1 ml were collected and analyzed for the presence of Sm28GST by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. Fractions containing the protein were pooled, concentrated by ultrafiltration on a Centricon-10 concentrator (Amicon France, France) and dialysed against PBS. The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Europe, the Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

#### Antigen preparation

Purified Sm28GST produced in yeast was kindly provided by Transgène (Strasbourg, France). Soluble BCG antigens from total cellular extracts were prepared by sonication of the mycobacteria in PBS, followed by centrifugation at 10,000 x g for 30 min at 4°C and 100,000 x g for 90 min at 4°C. The soluble protein fraction was then recovered, and the total protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Europe). Soluble worm antigen products (SWAP) from *S. mansoni* were prepared as previously described (18).

## Immunization

Three groups of twelve 4-week-old female BALB/c mice (Iffa Credo, l'Arbresle, France) were administrated either i.v., i.p. or s.c. with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) suspended in PBS. Eight weeks later, each group was divided into groups of four mice which were subsequently boosted either i.v., i.p., or s.c. with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) suspended in PBS. A fourth group of 4 mice was immunized and boosted intranasally (i.n.). Sera from each group of mice were collected before and at several times points after boosting over a one year period. The antibody responses against Sm28GST and soluble BCG extracts were analyzed by immunoblotting and ELISA.

## Immunoblots and ELISA

Sera of mice were diluted 100-fold in PBS/Tw containing 5% dry milk and analyzed by immunoblotting on nitrocellulose strips containing total soluble BCG proteins (15 µg), purified Sm28GST (300 ng) or SWAP (25 µg) separated by 15% SDS-PAGE. After extensive washing, the membranes were developed with goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Promega, Madison, WI).

For ELISA, Immulon 3 microtiter plates (Dynatech, Chantilly, VA) were coated with 50 µl of purified Sm28GST at 20 µg/ml in PBS, or with soluble BCG antigens at 25 µg/ml in PBS for 2h30 at 37°C or overnight at 4°C. The antigen solutions were removed, and the plates were washed three times with PBS/Tw. Two-fold serial dilutions of anti-sera in PBS/Tw containing 0.5% (w/v) gelatin

were added to the antigen-coated plates (50 µl/well for each dilution), and incubation was continued overnight at 4°C or for 2h30 at 37°C. The plates were then washed 5 times with PBS/Tw and incubated for 90 min at 37°C with 50 µl of peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG in a 1/17,000 dilution, IgG1 (1/10,000), IgG2a (1/12,000), or IgG2b (1/12,000) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). For IgA determination, the plates were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgA antibodies diluted 1/5,000 (Amersham France) for 90 min at 37°C, washed 5 times with PBS/Tw and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (Amersham France) diluted 1/2,000 for 30 min at 37°C. The plates were washed 4 times with PBS/Tw and 50 µl of peroxidase substrate were added. After 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped with 50 µl 2 N HCl and the plates were read photometrically at 492 nm. Titers were defined as the highest dilution yielding an absorbency 3 times above the background.

#### Viable BCG counts

For counts of viable BCG in mouse organ homogenates, groups of three BALB/c mice were sacrificed 2, 4, 8, 12 and 16 weeks after a single immunization with approximately  $5 \times 10^6$  recombinant BCG by the i.p. or i.n. routes. The livers, spleens and lungs were homogenized separately in 5 ml of RPMI 1640 medium, and serial dilutions were spread on Middlebroock 7H10 supplemented with 25 µg/ml of kanamycin. Viable colony-forming units were counted after three weeks incubation at 37°C.

### Enzymatic activity of Sm28GST

The enzyme activity of the Sm28GST purified from BCG was measured in 820  $\mu$ l of reaction buffer (50 mM potassium phosphate (pH 6.5) containing 0.36 mM 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB, Sigma) and 4.76 mM GSH). The enzymatic reaction was started when 10  $\mu$ l of enzyme (10  $\mu$ g/ml) was added and monitored spectrophotometrically at 340 nm for 90 min.

The neutralizing activity of the anti-Sm28GST antisera was analyzed as described by Grzych *et al.* (17) with the following modifications. In a total reaction volume of 430  $\mu$ l containing 400  $\mu$ l of reaction buffer 30  $\mu$ l of enzyme mix were added. This enzyme mix contained 10  $\mu$ l of enzyme (10  $\mu$ g/ml) incubated with 20  $\mu$ l of 50 mM potassium phosphate (pH 6.5), or of the indicated antisera in different dilutions in 50 mM potassium phosphate (pH 6.5) for 1 h at 37°C followed by 1 h at 4°C. The reaction was started by the addition of the enzyme mix and was followed continuously for 20 min at 340 nm. The linear slope was taken to evaluate the initial velocity of the reaction.

## Results

### Expression of Sm28GST in BCG

We have recently shown that the BCG *hsp60* promoter is active within infected tissue sections and macrophages (19). In addition, this promoter has already been successfully used for high level expression of recombinant antigens in BCG (13, 16, 25). Therefore, we used the *hsp60* promoter to drive expression of the Sm28GST gene in BCG and *M. smegmatis*. In one plasmid, designated pEN005, the antigen-coding sequence was cloned in-frame with the ATG initiating codon from the *hsp60* gene (Fig. 1A). In a second construct, designated pEN006, the *M. tuberculosis* 85A antigen signal peptide-coding sequence was inserted between the *hsp60* promoter and the Sm28GST-coding sequence in an attempt to favour antigen secretion by BCG (Fig. 1B). Expression of Sm28GST in BCG harbouring either pEN005 or pEN006 was analyzed by immunoblotting of whole-cell lysates using a rat anti-serum raised against peptide 190-211 of the Sm28GST. A protein reactive with this antiserum and of the expected size was readily detected in recombinant *M. smegmatis* (data not shown) and BCG carrying pEN005 (Fig. 2A). No reactive protein was detected in untransformed cells. Only barely detectable expression was found in whole-cell lysates of BCG carrying pEN006 (Fig. 2B). Three very weak immunoreactive bands could be seen when the blot was overdeveloped. The middle band comigrating with purified Sm28GST could represent the mature form of the antigen. The upper band may correspond to the uncleaved preprotein (Sm28GST fused to the 85A antigen signal peptide). The lower band probably corresponds to a degradation product of the Sm28GST. Because of the very low

level of expression, this recombinant strain was not pursued further for immunization studies.

#### Purification and enzymatic activity of Sm28GST expressed in BCG

Protective immunity has been associated with antibodies directed against the active site of the Sm28GST (26). Therefore, it is important that the active site of the recombinant antigen produced in BCG remains intact. This was investigated by affinity chromatography using the GSH substrate as a ligand and by determination of the enzyme activity of the purified protein. As shown in Fig. 4, Sm28GST produced in BCG(pEN005) was purified in a single step by affinity chromatography on a GSH-agarose column. Eluted fractions were pooled and analyzed by SDS-PAGE. The BCG-produced protein comigrated exactly with the protein purified from yeast and used as a positive control (Fig. 3A). This result suggests that the active site of the Sm28GST has been preserved in the BCG.

To test whether the recombinant protein was enzymatically active, the enzyme activity of the purified protein was determined. As shown in Fig. 3B, the enzymatic activity was found to be very similar to that obtained with the protein purified from yeast. This demonstrates that the Sm28GST produced in BCG has retained full enzymatic activity, implying that the antigen has conserved the three-dimensional structure of its active site.

### Recombinant BCG recovery in organs

We first analyzed the dissemination of the recombinant BCG in the spleens, the livers and the lungs of BALB/c mice and measured the persistence of the mycobacteria in these organs following a single i.p. (Fig. 4A) or i.n. (Fig. 4B) administration of  $5 \times 10^6$  organisms. The results shown in Fig. 5A and 5B indicate that the BCG could be recovered in the 3 organs regardless of the route of administration. High numbers of bacteria were found in spleens and livers of i.p. inoculated mice ( $10^4 - 5 \times 10^4$ /organ after 2 weeks) and in the lungs of i.n. immunized mice ( $5 \times 10^5$ /organ after 2 weeks). The number of BCG in the lungs of i.n. inoculated mice decreased regularly over the 16 week observation time. This is in agreement with results obtained with BCG expressing  $\beta$ -galactosidase (27). Generally, the bacteria were eliminated within 16 weeks. In the spleen of both groups of mice, the number of BCG decreased slowly over 8 weeks and remained stable for the following 4 weeks. Finally, after 16 weeks almost all BCG were eliminated.

### Antibody response induced after immunization with recombinant BCG in mice

BALB/c mice were administered i.v., i.p., s.c. or i.n. with the BCG strain producing the recombinant antigen. Anti-Sm28GST-specific and anti-BCG-specific antibody responses were analyzed by immunoblotting and ELISA 8 weeks after immunization.

A single dose of  $8 \times 10^6$  recombinant BCG was sufficient to generate specific immune responses against BCG proteins and Sm28GST, regardless of

the route of administration. However, i.p. or i.v. immunization elicited a much stronger response against Sm28GST than s.c. or i.n. immunization (Fig. 5A). In contrast, the i.n. immunization was found to be more efficient in triggering a high anti-BCG response, compared to the other routes (Fig. 5B).

The animals were boosted 8 weeks after the first immunization, and antisera were recovered 2 weeks after the boost and analyzed by immunoblotting against BCG antigens, purified recombinant Sm28GST, and SWAP, as shown in Fig. 6A, 6B and 6C, respectively. The results demonstrate that the quantity and quality of the antibody response varied according to the protocol of immunization. The animals immunized twice i.n., i.v. or i.p. exhibited a striking anti-BCG response, compared to that obtained with s.c./s.c. immunization. Nevertheless, the response was enhanced in s.c.-immunized animals boosted i.p. and especially in those boosted i.v.

Differences in the idiotypic quality of the response was observed since several immunoreactive bands could be detected with some but not all sera (Fig. 6A). This indicates that the antibody repertoire raised against BCG antigens is dependent on the route of immunization. Intense immunoreactive bands corresponding to Sm28GST were obtained in i.p./i.v., i.p./i.p., i.p./s.c. immunized mice (Fig. 6B). Immunoreactive bands of intermediate intensity were generated in i.v./i.v., i.v./i.p., s.c./i.v. and s.c./i.p. immunized mice. A weak Sm28GST response was elicited in s.c./s.c. i.v./s.c. and i.n./i.n. immunized mice (Fig 6B). As expected, no immunoreactive band was detected by control sera. Fig. 6C shows that the antibodies were capable of reacting with the native protein. Moreover, sera from mice immunized by the different

routes yielded a profile with SWAP which was similar to that obtained after immunization with the Sm28GST purified from yeast.

ELISA analyses confirmed these results and showed that the boost significantly enhanced the IgG response to Sm28GST regardless of the administration route (Fig. 5). However, all routes were not equally efficient in generating rapid antibody responses. Whereas high antibody titers were achieved very quickly after the boost of i.v.-, i.p.- or i.n.-immunized mice, a very slow and gradual increase was observed following the two s.c. administrations. Peak anti-Sm28GST antibody titers of 1:6,400 were elicited in i.p./i.p. immunized mice. Moreover, the responses against BCG antigens and Sm28GST were very stable and detectable even 1 year after the first immunization (Fig. 5A and 5B).

Isotypic profiles directed against Sm28GST are shown in Fig. 7. After i.v. immunizations, essentially IgG2a antibodies were detected. The boost was immediately followed by the production of IgG2b antibodies which decreased progressively, whereas the IgG2a response remained stable, thus leading to a Th1-like profile (Fig. 7A). The i.p. immunization protocol was characterized by the coexistence of IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes with no significant decrease over the time of the study, suggesting a mixed response (Fig. 7B). The antibody response induced after s.c. administrations was initially of the IgG2a isotype developing into a mixed response after the boost (Fig. 7C). The response elicited 2 weeks after the intranasal boost consisted of a mixed response with no detectable IgG1 but with significant levels of IgG2a and IgG2b antibodies. This response was then characterized by a decrease of the IgG2b subclass, thus leading

to a pure Th1-like type of response at week 32 (Fig. 7D). Interestingly, constant levels of anti-Sm28GST IgA antibodies were found in all groups of mice.

#### Antiserum-mediated neutralization of the Sm28GST enzymatic activity

The ability of the anti-Sm28GST antisera to neutralize the enzymatic activity of Sm28GST was also investigated. As shown in Fig. 8, 100 % of neutralization was obtained with 25 µl/ml of antisera obtained from mice immunized and boosted by the i.p. route with BCG(pEN005). 50 % inhibition was obtained with 5 µl of serum per ml of reaction mix. Mice immunized by the i.v. or i.n. route also produced significant levels of neutralizing antibodies, albeit with somewhat lower activity even at comparable total anti-Sm28GST antibody levels (data not shown). In contrast, no significant inhibition was observed with sera obtained from mice immunized with untransformed BCG even up to 50 µl/ml.

## Discussion

Among the various vaccination approaches tested so far against schistosomiasis, the most effective protective immunity in many experimental hosts was achieved by immunization with live schistosomes attenuated by irradiation (28). Antigenic extracts of whole non-attenuated parasites are much less effective. However, although the use of such live attenuated schistosome vaccines is probably impracticable and certainly also unethical for humans, they provide an excellent model to study the effector mechanisms of protective immunity. In mice, protective immunity induced by immunization with irradiated schistosomes can be adoptively transferred by antigen-specific Th cell lines (4) and IFN-gamma may play a protective role (29). However, in a variety of other hosts, including man, antibody responses contribute significantly to protection (17, 26). One of the most promising protective antigens studied so far is Sm28GST (5). The presence of antibodies capable of neutralizing the Sm28GST enzymatic activity has been found to correlate with protection in humans (17).

Mycobacterial infections are known to generate a strong Th1-like response, which is followed later by a Th2-like response accompanied by the production of antibodies against the mycobacterial antigens (30). Humoral and cellular immune responses have also been generated against heterologous antigens produced by recombinant BCG. The induction of cellular immune responses has been described for recombinant  $\beta$ -galactosidase (13, 31), HIV antigens (25, 32), SIV-Nef (15, 33), and gp63 of *Leishmania* (34). Antibodies have been successfully induced against tetanus toxin (13), *Borrelia burgdorferi* OspA (35) and *Streptococcus pneumoniae* PspA (16). For the latter two, humoral

immune responses were especially elevated after immunization with the respective recombinant BCG strain producing the heterologous antigen as an exported protein.

In this study we have therefore attempted to produce Sm28GST at high levels in an exported form in recombinant BCG. In a previous study (18) we described the expression of the Sm28GST coding region under the control of the 85A antigen promoter and signal peptide-coding sequence. Only low levels of the antigen were produced in both *M. smegmatis* and BCG, and immunization with the recombinant BCG resulted in no detectable Sm28GST-specific antibody response, suggesting that production levels of the recombinant antigen were not high enough. The reasons for the poor Sm28GST production in these constructs may include the strength of the 85A antigen promoter and/or the difficulty to export Sm28GST, a protein that is not exported by the parasite. Expression of the Sm28GST-coding region under the control of the *hsp60* promoter yielded high production levels of the recombinant antigen in BCG, whereas the addition of the 85A antigen signal peptide-coding sequence resulted in a drastic drop of production levels. This indicates that at least one of the reasons for the previous low production levels is the inability to efficiently export Sm28GST. Expression of DNA coding for other, naturally secreted proteins is indeed quite efficient under the control of the 85A antigen promoter<sup>4</sup>. Conversely, production of Sm28GST has also been found to be very low when export was attempted in other systems<sup>5</sup>.

Although intracellular Sm28GST was produced at high levels in BCG, this is apparently not necessarily the case for other expression systems. Khan *et al.* (36) recently reported that high levels of Sm28GST could be produced in

*Salmonella typhimurium* only as a fusion protein with fragment C of tetanus toxin. Full-length, unfused Sm28GST was produced at much lower levels and was not immunogenic when administered by recombinant *S. typhimurium* to mice.

A single immunization with  $8 \times 10^6$  BCG producing non-exported Sm28GST under the control of the *hsp60* promoter generated a high level of antigen-specific and BCG-specific antibodies. A booster dose with the same BCG strain increased significantly these immune responses. After the booster dose, the antibody titers remained high for at least one year in BALB/c mice. Interestingly, the antibody response obtained after s.c. immunization and booster increased continually for up to at least a year. The sera from all groups of mice recognized Sm28GST in SWAP by immunoblotting, indicating that the antibodies were able to recognize the native Sm28GST antigen. The immune response lasted much longer than the colonization time of the recombinant BCG, since the microorganisms were generally almost completely eliminated after 16 weeks, whereas the antibody responses remained high. This suggests that very few bacilli may be enough to continuously stimulate the immune system, or that antibody production and/or stability is of long lasting duration.

Interestingly, the different routes of immunization yielded different intensities of the idiotypic responses. Immunization by the i.n. route gave the strongest anti-BCG response, whereas the anti-Sm28GST antibody response was strongest after i.p. or i.v. immunization. Western blot analyses on total BCG extracts confirmed that different antigen specificities were obtained after administration by the different routes. This suggests that BCG antigens as well as heterologous antigens are presented differently to the immune system

depending on the immunization mode. A comparison of the immune responses obtained after different priming routes with those obtained after different booster routes suggests that the priming may play a decisive role in the development of the idotypic immune response.

The different routes of immunization also provided different isotypic responses. The i.n. and i.v. immunizations lead to an initial production of high titers of IgG2a and low titers of IgG1 and IgG2b, indicative of Th1-like responses. Immediately after the boost, high titers of IgG2b also emerged in these animals. However, these antibodies tended to disappear later on. On the other hand, the i.p. immunization immediately induced a rather mixed response, characterized by the co-induction of IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes. Finally, the s.c. immunization initially yielded a IgG2a response, followed several weeks after the boost by a mixed response that remained stable. A stable level of the specific IgA antibodies was obtained regardless of the route of immunization. This is of particular interest since it has been suggested that the IgA isotype might participate in the protective immune response against schistosomiasis in humans (17) and rats (5). However, only i.n.-immunized mice generated anti-Sm28GST IgA antibodies in the bronchoalveolar cavity (data not shown), suggesting that these antibodies may be secretory IgA.

Since protective antibodies should neutralize the Sm28GST enzymatic activity, the antigen produced by the recombinant BCG should preferably retain the native conformation, bind glutathione and catalyse the transferase reaction. Many heterologous genes produced in recombinant bacteria, however, are not produced in a soluble, properly folded, or active form and usually accumulate as insoluble aggregates (37). Fortunately, the full-length Sm28GST produced in

BCG was soluble, able to bind GSH, and was enzymatically active, strongly suggesting that the protein had folded correctly to adopt a native-like conformation. In addition, and most importantly, anti-Sm28GST antibodies elicited after i.p. immunization with the recombinant BCG strain were able to efficiently neutralize the Sm28GST enzymatic activity. Interestingly, at comparable total anti-Sm28GST antibody titers (week 32), s.c.- and i.n.-immunized mice produced markedly less, although still significant neutralizing antibodies than i.p.-immunized mice (data not shown), suggesting that the main neutralizing isotypes might be the IgG1 and/or IgG2b isotypes. This is consistent with previous studies suggesting a protective role of Th2-type antibodies (38). Recombinant BCG producing Sm28GST is thus able to induce both a strong antigen-specific Th1-type immune response followed by a neutralizing Th2-type antibody response.

Bout *et al.* (39) have already described the capacity of BCG to induce short-term resistance against *S. mansoni*. Recombinant BCG producing protective antigens may thus combine this endogenous property of BCG with antigen-specific immunoprotection. BCG represents therefore a particularly attractive vaccine vehicle against schistosomiasis. In addition, BCG may be very cost-effective, which is especially important for the developing world, where schistosomiasis is severe and frequent.

### Acknowledgements

We thank C. Leportier and A.-M. Schacht for technical assistance, C. Auriault and P. Sutton for critically reading the manuscript, T. Kieser for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, N. Mielcarek and G. Renauld for anti-Sm28GST antibodies, and Transgène for Sm28GST-producing recombinant strains.

### References

1. WHO. 1993. The control of schistosomiasis. *Second Report of the WHO Expert Committee.*
2. Phillips, S. M., and P. Lammie. 1986. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in Schistosomiasis. *Parasitol. Today* 2: 296.
3. Dunne, D. W., P. Hagan, and F. G. C. Abath. 1995. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *Lancet* 345: 1488.
4. Wolowczuk, I., C. Auriault, H. Gras-Masse, C. Vendeville, J.-M. Balloul, A. Tartar, and A. Capron. 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28-1 antigen. *J. Immunol.* 142: 1342.
5. Grezel, D., M. Capron, J.-M. Grzych, J. Fontaine, J.-P. Lecocq, and A. Capron. 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 23: 454.
6. Boulanger, D., G. D. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J.-M. Balloul, D. Grezel, R. J. Pierce, M. F. Otieno, S. Guerret, J. A. Grimaud, A. E. Butterworth, and A. Capron. 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13: 473.
7. Xu, C.B., C. Verwaerde, J.-M. Grzych, J. Fontaine, and A. Capron. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* 21: 1801.

8. Auriault, C., H. Gras-Masse, R. J. Pierce, A. E. Butterworth, I. Wolowczuk, M. Capron, J. H. Ouma, J.-M. Balloul, J. Khalife, J.-L. Neyrinck, A. Tartar, D. Koech, and A. Capron. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1918.
9. Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *JAMA* 271: 698.
10. Ladel, C. H., S. Daugelat, and S. H. E. Kaufmann. 1995. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur. J. Immunol.* 25: 3377.
11. Huygen, K., L. Ljungqvist, R. Ten Berg, J. P. Van Vooren. 1990. Repertoires of antibodies to culture filtrate antigens in different mouse strains infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 58: 2192.
12. Bloom, B. R., S. B. Snapper, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr. 1990. Development of recombinant BCG vaccines. *Semin. Virol.* 1: 21.
13. Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, and B. R. Bloom. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 458.

14. Stover, C. K., V. F. de la Cruz, G. P. Bansal, M. S. Hanson, T. R. Fuerst, W. R. Jacobs, and B. R. Bloom. 1992. Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. In *Genetically Engineered Vaccines*, J. E. Ciardi, J. R. McGhee, and J. M. Keith, eds. Plenum Press, New-York, p. 175.
15. Yasutomi, Y., S. Koenig, S. S. Haun, C. K. Stover, R. K. Jackson, P. Conrad, A. J. Conley, E. A. Emini, T. R. Fuerst, and N. L. Letvin. 1993. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 150: 3101.
16. Langermann, S., S. R. Palaszynski, J. E. Burlein, S. Koenig, M. S. Hanson, D. E. Briles, and K. Stover. 1994. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* 180: 2277.
17. Grzych, J.-M., D. Grezel, C. B. Xu, J.-L. Neyrinck, M. Capron, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and A. Capron. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 150: 527.
18. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht. 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A Antigen promoter region. *J. Bacteriol.* 177: 642.
19. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Locht. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 17: 913.
20. Baulard, A., C. Jourdan, A. Mercenier, and C. Locht. 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 20: 4105.

21. Sambrook, J., F. E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jr. Jacobs. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4: 1911.
23. Sauton, B. 1912. Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *Comptes Rend. Hebdo. Séances Acad. Sci. Paris* 155: 860.
24. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
25. Aldovini, A., and R. A. Young. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 351: 479.
26. Xu, C. B., C. Verwaerde, J.-M. Grzych, J. Fontaine, and A. Capron. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* 21: 1801.
27. Lagranderie, M., A. Murray, B. Gicquel, C. Leclerc, and M. Gheorghiu. 1993. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine* 11: 1283.
28. Taylor, M. G., and Q. D. Bickle. 1986. Towards a schistosomiasis vaccine: irradiated schistosomes vaccines. *Parasitol. Today* 2: 132.
29. Smythies, L. E., P. S. Coulson, and R. A. Wilson. 1992. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.* 149: 3654.

30. Orme, I. M., A. D. Roberts, J. P. Griffin, and J. S. Abrams. 1993. Cytokine secretion of CD4 lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 151:1.
31. Murray, A., N. Winter, M. Lagranderie, D. F. Hill, J. Rauzier, J. Timm, C. Leclerc, K. M. Moriarty, M. Gheorghiu, and B. Gicquel. 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.* 6: 3331.
32. Winter, N., M. Lagranderie, J. Rauzier, J. Timm, C. Leclerc, B. Guy, M. P. Kiieny, M. Gheorghiu, and B. Gicquel. 1991. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* 109: 47.
33. Winter, N., M. Lagranderie, S. Gangloff, C. Leclerc, M. Gheorghiu, and B. Gicquel. 1995. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251 *nef* gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* 13: 471.
34. Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. McMaster, B. R. Bloom, and D. G. Russell. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11473.
35. Langermann, S., S. Palaszynski, A. Sadziene, C. K. Stover, and S. Koenig. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 372: 552.

36. Khan, C. M. A., B. Villarreal-Ramos, R. J. Pierce, G. Riveau, R. D. de Hormaeche, H. McNeill, T. Ali, N. Fairweather, S. Chatfield, A. Capron, G. Dougan, and C. E. Hormaeche. 1994. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11261.
37. Schein, C. H., and M. H. M. Noteborn. 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. *Bio/Technology* 6: 291.
38. Butterworth, A. E. 1992. Vaccines against schistosomiasis: where do we stand ? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:1.
39. Bout, D., H. Dupas, Y. Carlier, D. Afchain, and A. Capron. 1977. High resistance induced by young live bacillus Calmette-Guérin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128 c: 811.

**Footnotes**

<sup>1</sup>This work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas-de-Calais, and Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. L. K. holds a fellowship of Région Nord-Pas-de-Calais.

<sup>2</sup>Corresponding author : Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cedex, France, Tel. : (+33) 20.87.77.28, Fax : (+33) 20.87.79.06.

<sup>3</sup>Abbreviations used in this paper : bp, base pair; CDNB, 1-chloro-2,4 dinitrobenzene; GSH, glutathione; i.n., intranasal; PBS/Tw, PBS with 0,1% Tween 20; Sm28GST, *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase; SWAP, soluble worm antigen products.

<sup>4</sup>Baulard, A, L. Kremer, P. Supply, D. Vidaud, J.-M. Bidart, D. Bellet, and C. Locht. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. Submitted.

<sup>5</sup>Renauld, G., N. Mielcarek, J. Cornette, A.-M. Schacht, A. Capron, G. Riveau, and C. Locht. Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to Filamentous Hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. Submitted.

## Figure Legends

**FIGURE 1.** Expression vectors for intracellular production (A) or secretion (B) of Sm28GST in BCG. The plasmids contain a kanamycin resistance gene indicated by the grey box labelled Kan, the ColE1 origin of replication from pUC18, indicated as ori ColE1, the mycobacterial origin of replication from pAL5000, indicated as ori myco. The expression cassettes contain the BCG *hsp60* promoter including the ribosome binding site and the *hsp60* initiating codon, represented by the black box, and the Sm28GST-coding sequence, represented by the grey arrow. The directions of the arrows indicate the directions of transcription of the kanamycin resistance gene and of the Sm28GST gene. The white box labelled 85A PS in pEN006 (B) denotes the *M. tuberculosis* 85A antigen signal peptide-coding region. The sizes of the plasmids are given in kb.

**FIGURE 2.** Immunoblot analyses of recombinant BCG producing Sm28GST. Whole cell extracts of BCG(pEN005) (A) and BCG(pEN006) (B) were analyzed by immunoblotting using anti-Sm28GST polyclonal antibodies. Lanes 1 contain extracts of BCG(pEN005) (A) or BCG(pEN006) (B), lanes 2 contain extracts of non-transformed BCG, and lanes 3 contain 100 ng of purified recombinant Sm28GST produced in yeast. The equivalent of 0.2 OD<sub>600</sub> unit of the mycobacterial cultures was loaded in lanes 1 and 2. The sizes of the molecular mass markers are given in the right margins.

**FIGURE 3.** Purification and enzymatic activity of the Sm28GST produced by BCG(pEN005). (A) Sm28GST was purified by single-step affinity chromatography on a GSH-agarose column. Sm28GST-containing fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration, dialyzed and then subjected to SDS-PAGE Coomassie-Blue staining. Lane 1 contains whole cell extracts from untransformed BCG, lane 2 contains whole cell extracts of BCG(pEN005), lane 3 contains the purified Sm28GST, and lane 4 contains purified Sm28GST produced in yeast (approximately 2 µg). The position of Sm28GST is indicated by the arrow. The molecular mass markers are shown in lane M, and their sizes in kDa are given in the left margin. (B) The glutathione S-transferase activity catalyzed by Sm28GST purified from recombinant BCG (closed circles) was compared to that catalyzed by Sm28GST purified from yeast (open circles) in a time-dependent fashion.

**FIGURE 4.** Colonization of mouse organs by recombinant BCG. After i.p. (A) or i.n. (B) administration of  $5 \times 10^6$  recombinant BCG, BALB/c mice were sacrificed at the indicated time points, and the spleens (open triangles), livers (closed circles) and lungs (closed diamonds) were removed and homogenized. The organ extracts were than plated onto Middlebrook 7H10 supplemented with 25 µg/ml of kanamycin, and the BCG colonies were counted after 3 weeks incubation at 37°C. Standard deviations were calculated from groups of 3 animals for each time point.

**FIGURE 5.** ELISA titers of anti-Sm28GST and anti-BCG antibodies. BALB/c mice were immunized i.n. (black bars), i.v. (dark grey bars), i.p. (light grey bars) or s.c. (white bars) with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) at week 0 and boosted by the same respective routes with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) at week 8 as indicated by the arrows.

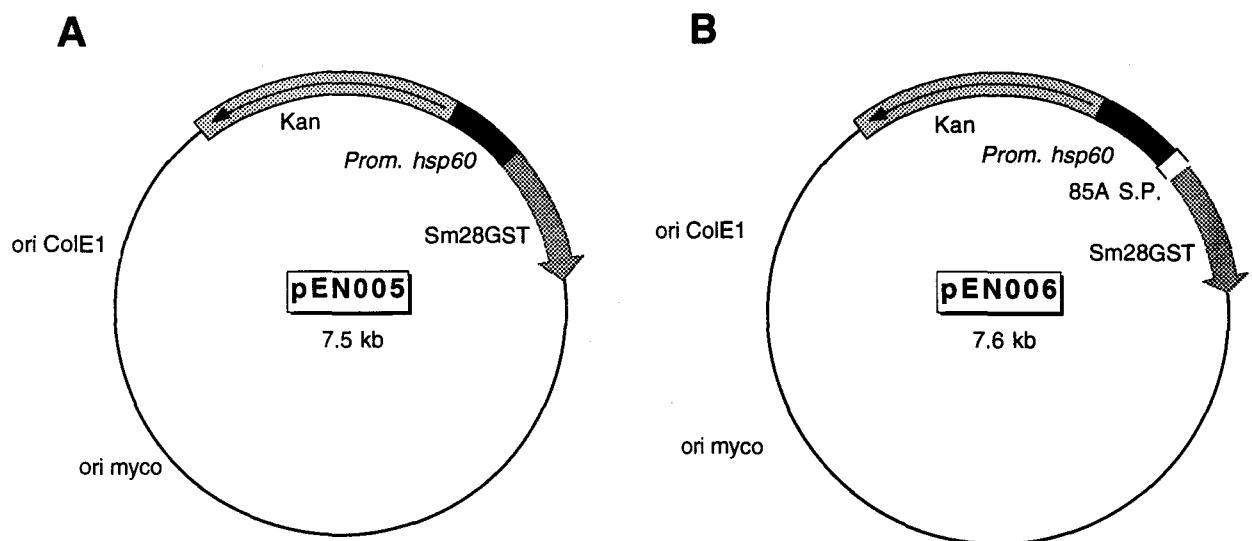
Sera from each group of mice were collected at the indicated time points, pooled and analyzed by ELISA against Sm28GST purified from yeast (A) or total soluble BCG antigens (B). Titers are given in log10 of maximal dilutions of the antisera that gave absorbencies 3-fold higher than the background.

**FIGURE 6.** Immunoblot analyses of antibodies elicited by BCG(pEN005). Total soluble BCG proteins (A), Sm28GST purified from yeast (B), or SWAP (C) were separated by SDS-PAGE and transferred onto Hybond-C extra membranes. The membranes were then incubated with pooled antisera collected from BALB/c mice 2 weeks after the booster immunization (given 8 weeks after the primary immunization) with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005). All antisera were diluted 100-fold. The top lines on each panel indicate the primary immunization route, and the second line on each panel indicate the booster route. (-) corresponds to the negative control, *i. e.* naïve antiserum (A, B) or antiserum from mice immunized with untransformed BCG (C).

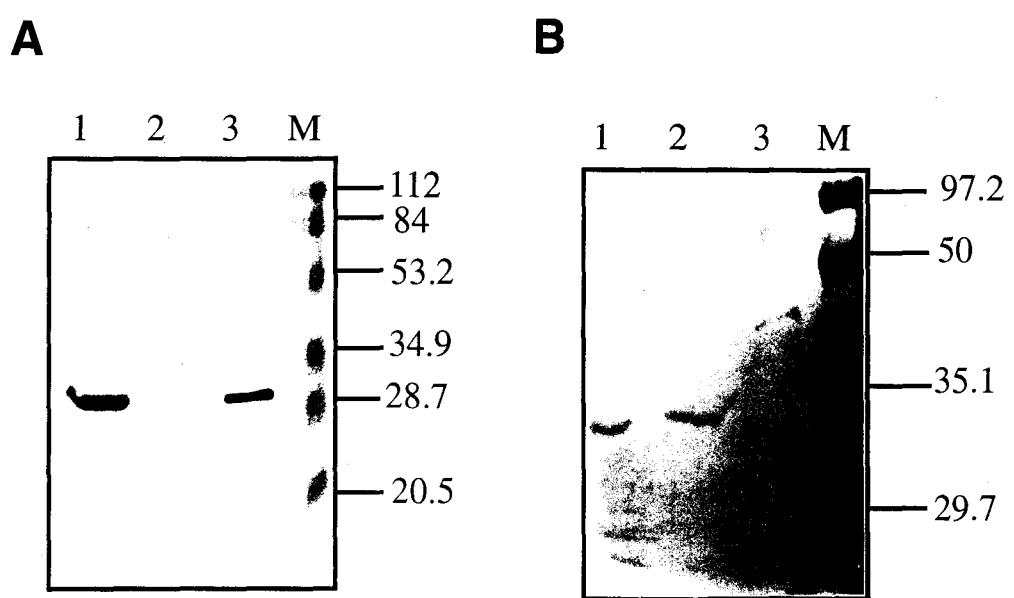
**FIGURE 7.** Antibody isotype profiles elicited after immunization with BCG(pEN005). Anti-Sm28GST IgG1 (white bars), IgG2a (black bars), IgG2b (grey bars) and IgA (stippled bars) titers were determined at the indicated time points in pooled sera from BALB/c mice, before immunization (week 0), after immunization with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) (week 8) and after boosting with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) as indicated by the arrows (weeks 10, 17, and 32). Mice were immunized and boosted i.v. (A), i.p. (B), s.c. (C), or i.n. (D). Titers are given in log10 of maximal dilutions of the antisera that gave absorbencies 3-fold higher than the background.

**FIGURE 8.** Neutralization of the glutathione S-transferase activity catalyzed by Sm28GST. The glutathione S-transferase activity was measured in the absence (0

$\mu\text{l/ml}$ ) or presence of increasing concentrations of antisera obtained from mice immunized and boosted i.p. with  $8 \times 10^6$  BCG(pEN005) (closed squares) or with  $8 \times 10^6$  untransformed BCG (open circles). The neutralizing activity was analyzed two weeks after the boost, corresponding to week 10 in Fig. 5 and 7.



**FIGURE 1**



**FIGURE 2**

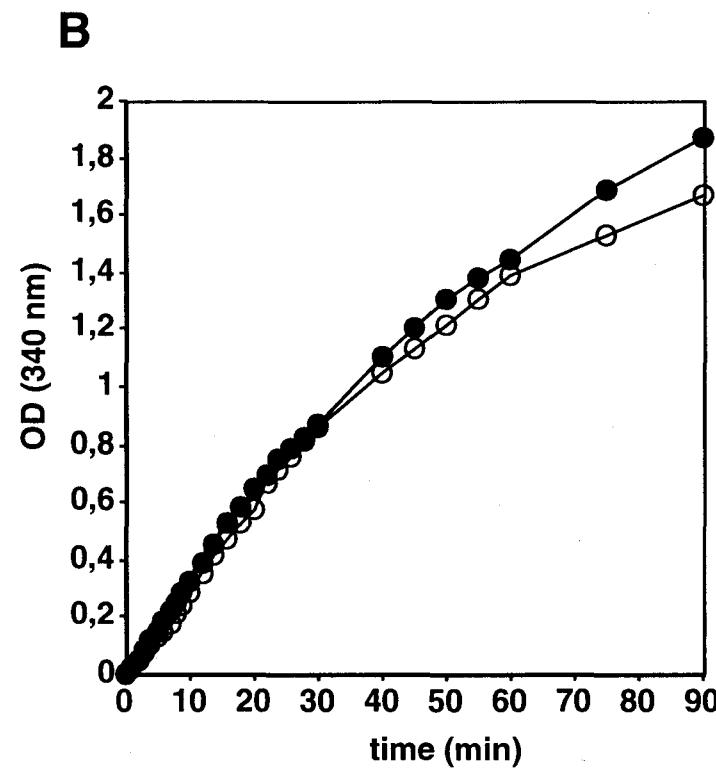
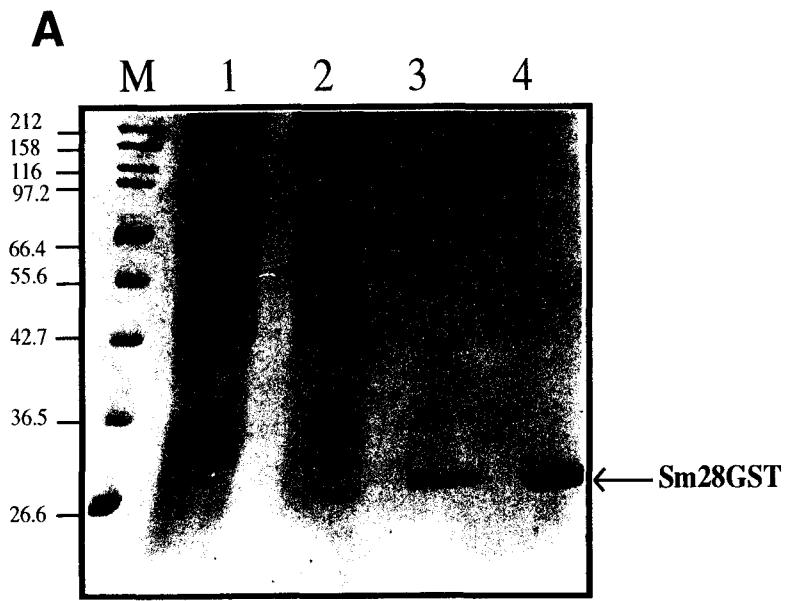


FIGURE 3

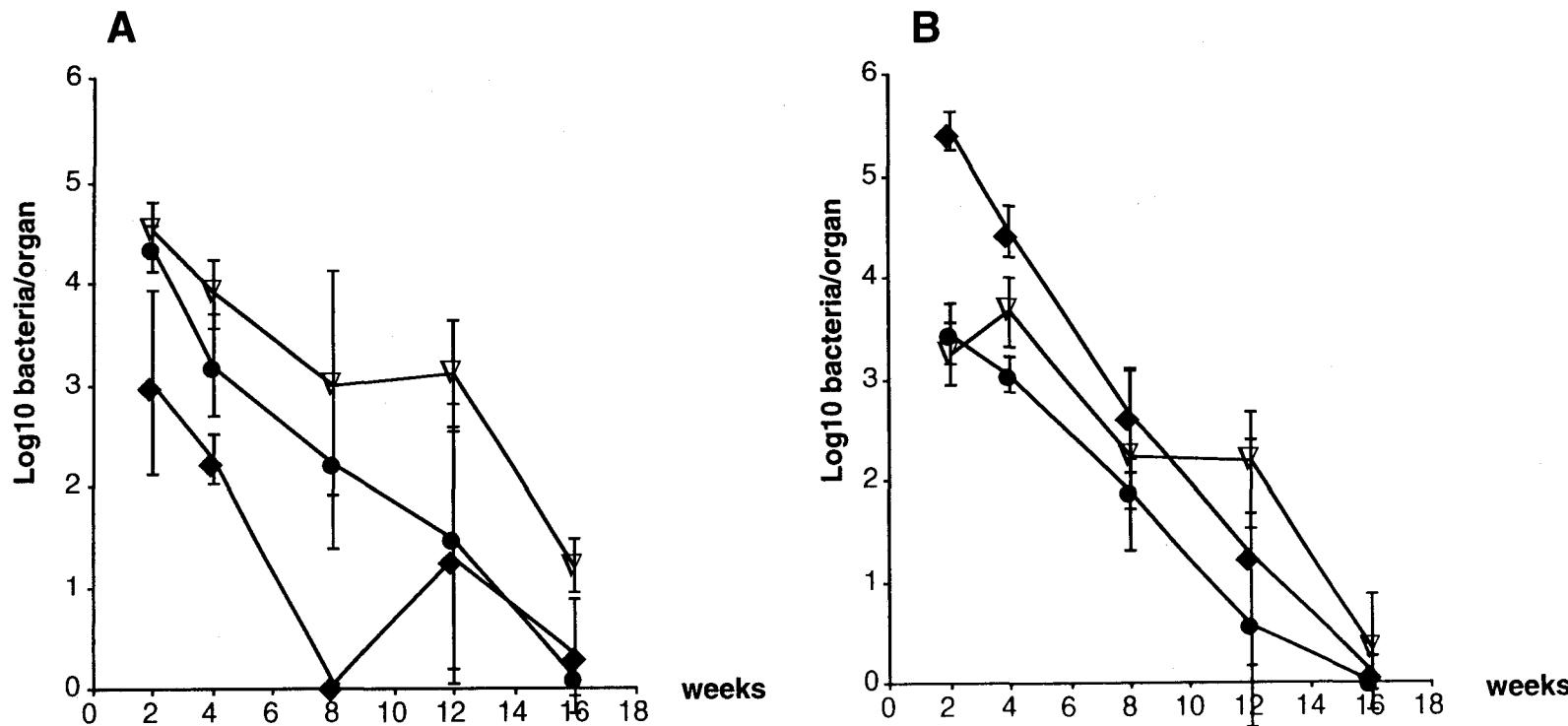
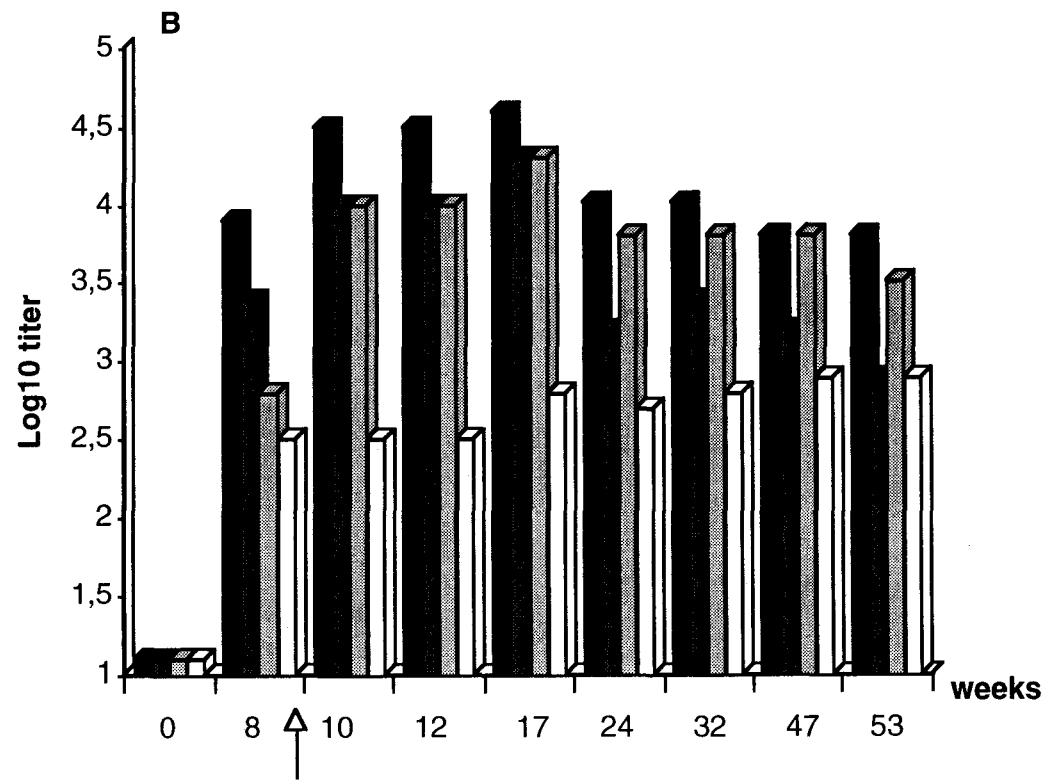
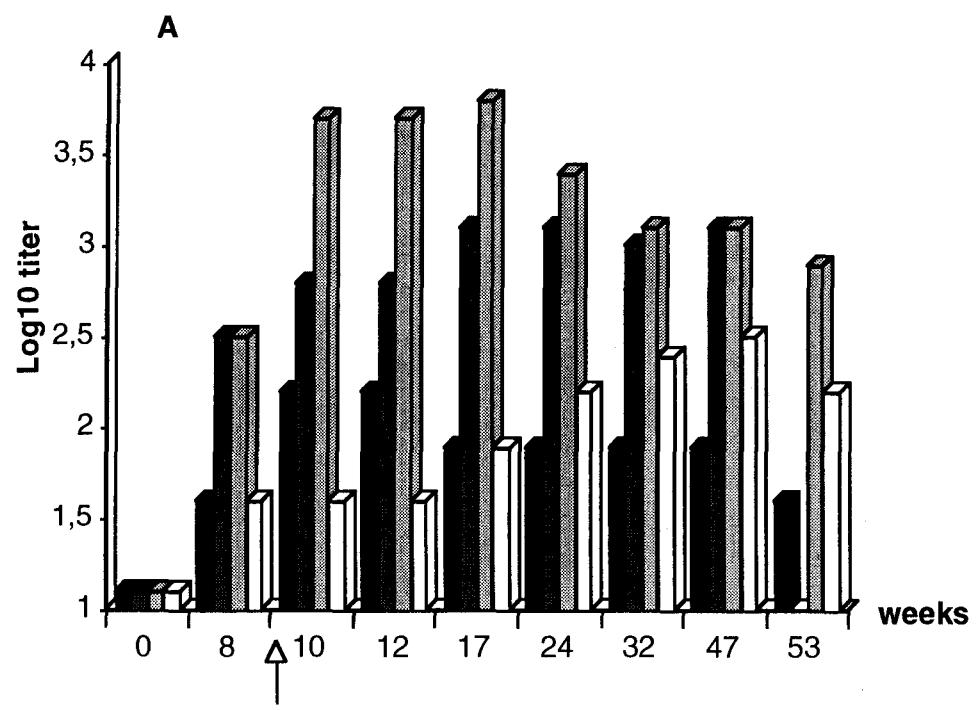
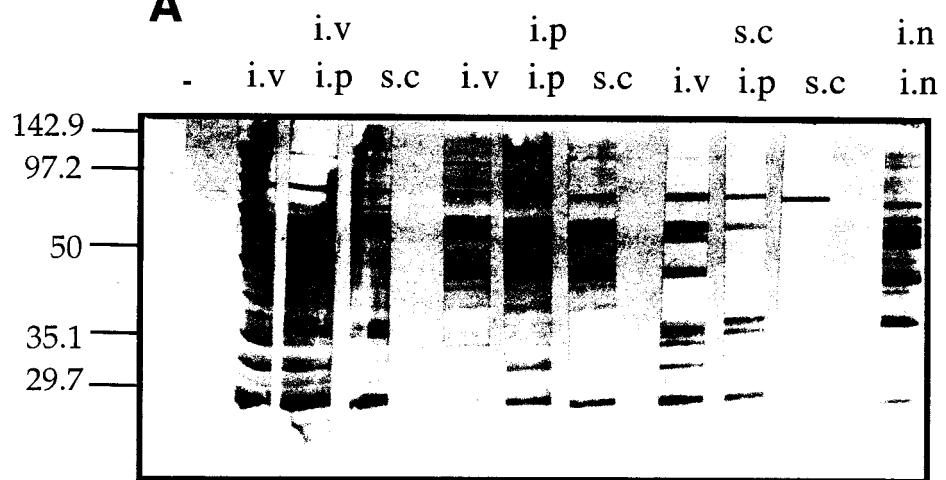
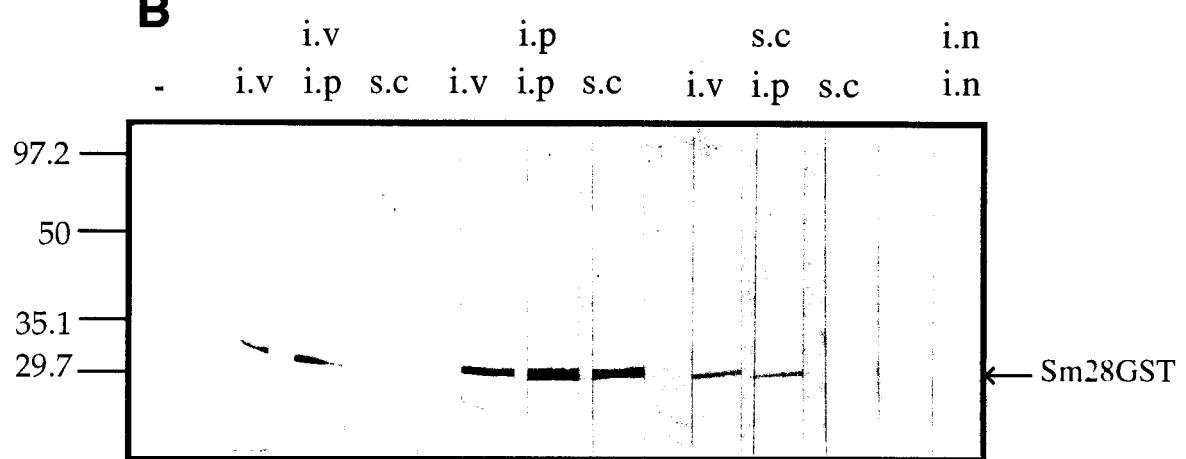
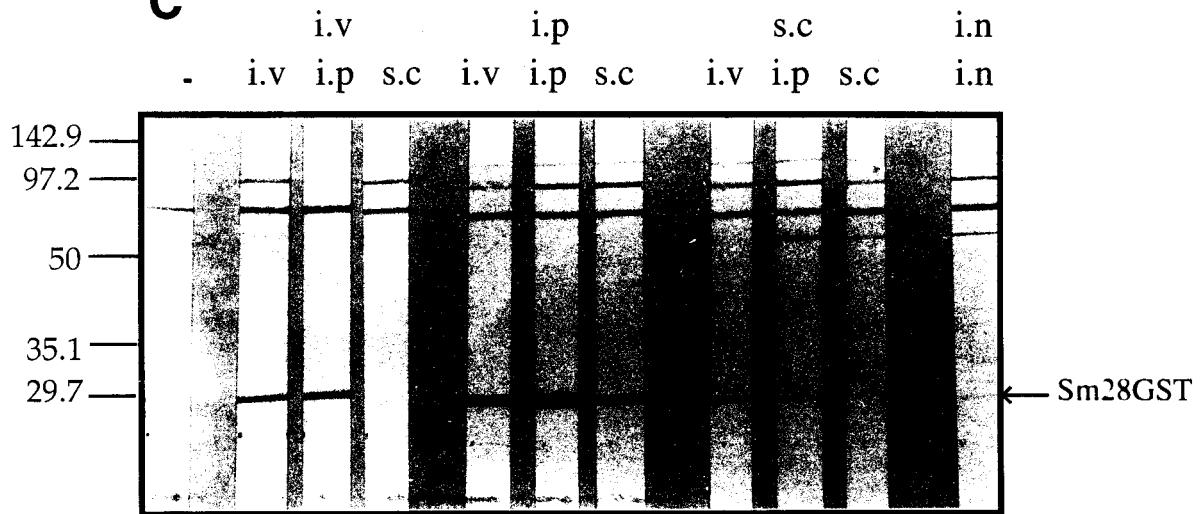


FIGURE 4



**FIGURE 5**

**A****B****C****FIGURE 6**

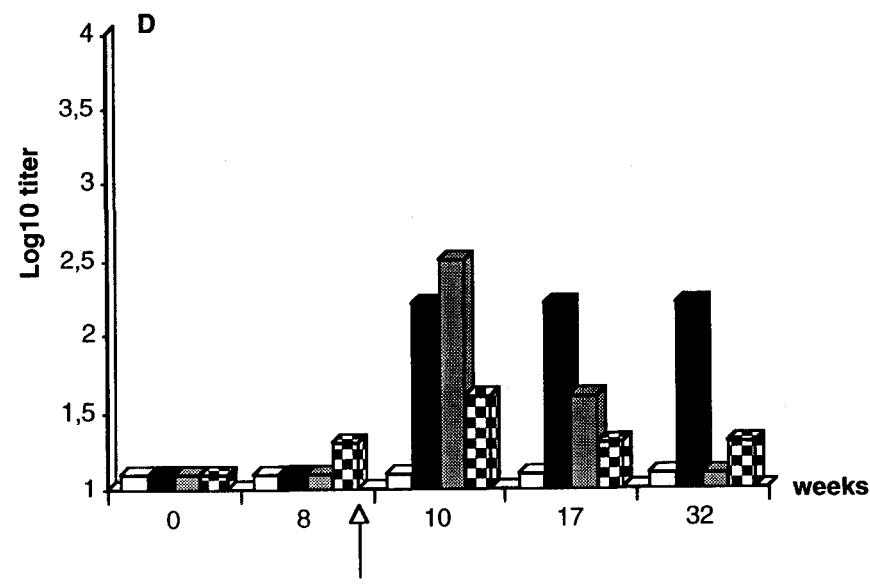
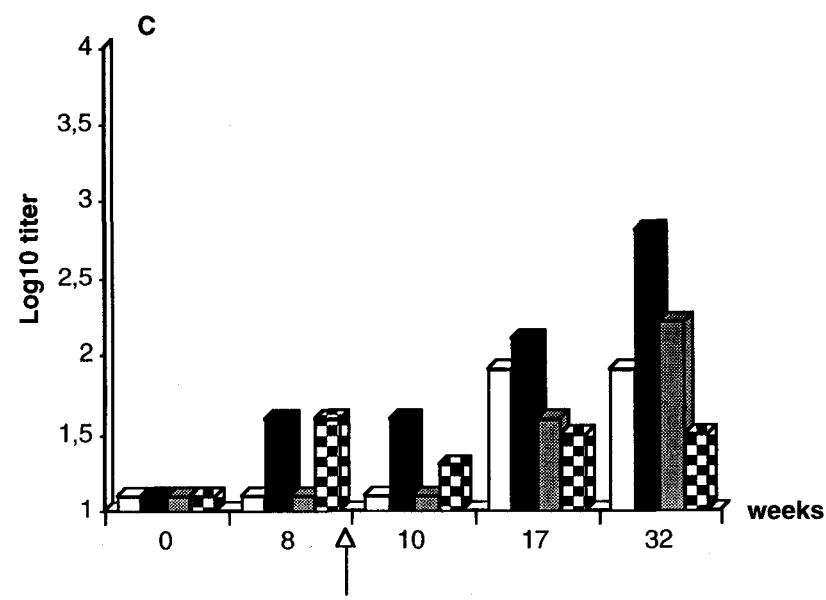
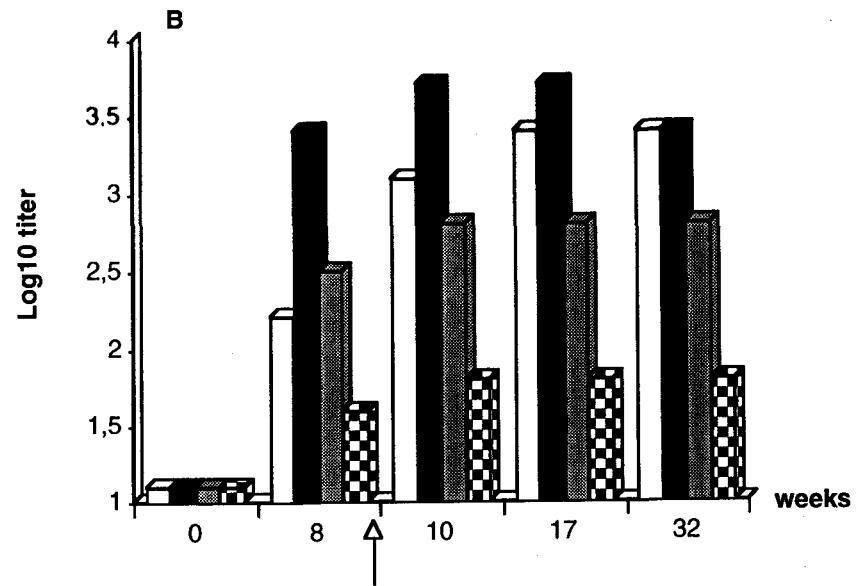
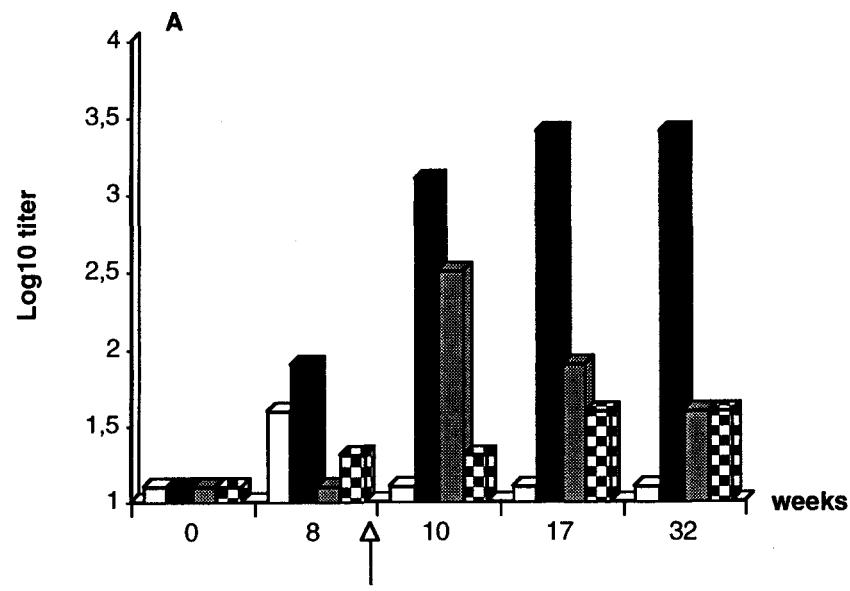
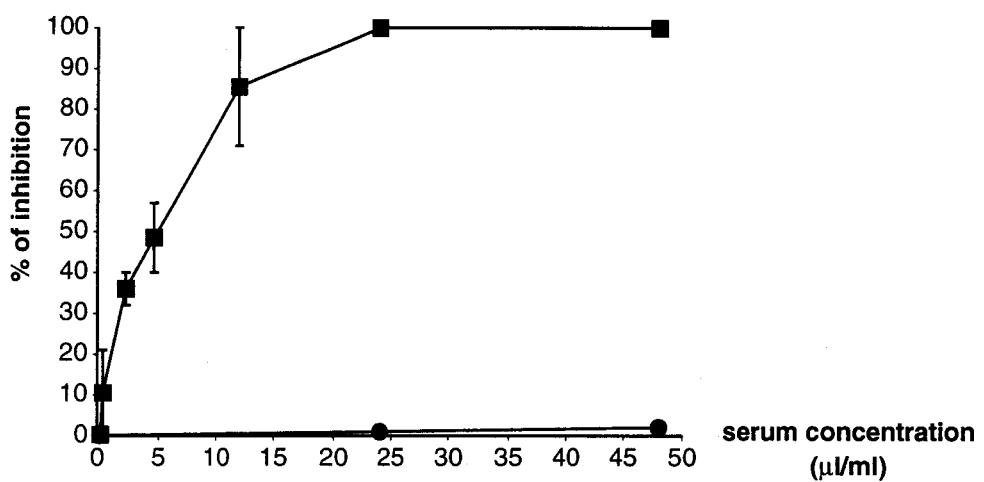


FIGURE 7



**FIGURE 8**

Cinquième partie:

LA "Green Fluorescent Protein"  
(GFP): UN NOUVEAU MARQUEUR  
D'EXPRESSION CHEZ LES  
MYCOBACTERIES

Le promoteur *hsp60* permet d'exprimer de manière efficace la Sm28GST sous une forme cytoplasmique. Une importante réponse immune anti-Sm28GST a pu être obtenue chez des souris BALB/c immunisées avec cette souche recombinante. Ces résultats montrent que le niveau de production de l'antigène constitue un élément important pour induire une immunogénicité significative. D'autre part, la localisation cellulaire de l'antigène, la régulation potentielle du promoteur *in vivo* sont autant de facteurs susceptibles d'influencer qualitativement et/ou quantitativement la réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène vaccinal. Des travaux réalisés chez *S. typhimurium* ont montré que l'expression d'un antigène dont le gène est sous le contrôle d'un promoteur inductible *in vivo* dans le macrophage, augmentait de manière significative l'immunogénicité de la souche recombinante (Hohmann *et al.*, 1995). Des promoteurs inductibles *in vivo* chez le BCG pourraient constituer une alternative intéressante pour le contrôle de l'expression d'antigènes vaccinaux *in vivo*.

Afin de stimuler une importante réponse immunitaire spécifique par vaccination, les signaux géniques utilisés pour exprimer des antigènes hétérologues doivent fonctionner correctement lorsque la mycobactéries est internalisée dans le macrophage de l'hôte. En élaborant un vecteur adapté à l'identification de nouveaux promoteurs mycobactériens, nous souhaitons diversifier les signaux d'expression utilisables chez le BCG recombinant.

La publication intitulée "Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria" apporte un élément nouveau à la liste des outils moléculaires utilisés en mycobactériologie. Elle décrit l'expression de la GFP sous contrôle du promoteur *hsp60* chez les mycobactéries. Les avantages offerts par ce marqueur pour l'identification de promoteurs adaptés à l'expression d'antigènes hétérologues chez les mycobactéries *in vivo* sont également abordés. De tels promoteurs permettent peut-être d'augmenter l'immunogénicité des antigènes hétérologues chez le BCG.

D'autres applications sont également proposées, telles que l'étude de la susceptibilité aux molécules anti-bactériennes, la visualisation directe du bacille dans les différents organes de la souris infectée ou l'étude des gènes de virulence.

VOLUME 17 NUMBER 4 AUGUST 1995

CODEN MOMIEE ISSN 0950-382X

# molecular microbiology

A dark blue background with numerous small, glowing spots of various colors (red, green, yellow) scattered across it, resembling a microscopic view of microorganisms or cells.

Blackwell  
Science

Iron regulation

High-pressure growth

*Streptomyces* heat shock

# Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria

Laurent Kremer,<sup>1,2</sup> Alain Baulard,<sup>1</sup> Jérôme Estaquier,<sup>3</sup> Odile Poulain-Godefroy<sup>2</sup> and Camille Locht<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM CJF9109, <sup>2</sup>Unité d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM U167, and <sup>3</sup>Unité de Pathogénèse du SIDA et des Infections à Tropisme Immunitaire et Nerveux INSERM U415, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

## Summary

This study describes the use and the advantages of the green fluorescent protein (GFP) as a reporter molecule for mycobacteria. The *gfp* gene from *Aequorea victoria* was placed under the control of the *hsp60* promoter in the shuttle vector pGFM-11. The *gfp* expression in the recombinant *Mycobacterium smegmatis* and BCG was readily detected on agar plates by the development of an intense green fluorescence upon irradiation with long-wave u.v. light. In mycobacteria containing a pGFM-11 derivative that lacks the *hsp60* promoter, no fluorescence was observed. However, this plasmid was successfully used as a promoter-probe vector to identify BCG promoters. The fluorescence emission of GFP in mycobacteria harbouring pGFM-11 and grown in liquid media could be quantified by spectrofluorimetry. This allowed for easy assessment of drug susceptibility. As GFP does not require the addition of substrates or co-factors, the green fluorescent bacilli could be directly observed within infected macrophages using fluorescence and laser confocal microscopy, or in tissue sections of infected mice. Finally, infected cells or free-living recombinant mycobacteria could also be analysed by flow cytometry. The GFP thus appears to be a convenient reporter for mycobacteria, allowing tracing of recombinant mycobacteria, isolation of promoters with interesting properties, *in vivo* drug testing and the development of new diagnostic tools.

## Introduction

Tuberculosis is the single most frequent cause of death

Received 24 April, 1995; revised 7 August, 1995; accepted 14 August, 1995. \*For correspondence. Tel. 20 87 77 28; Fax 20 87 79 06.

from infectious disease world-wide and has been resurgent in recent years even in developed countries (Raviglione *et al.*, 1995). This major public health problem is in sharp contrast to the relative paucity concerning the knowledge on virulence factors and gene regulation in mycobacteria. Only in recent years significant progress has been made generating powerful genetic systems for mycobacteria (Snapper *et al.*, 1988; Ranes *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 1991; Hatfull, 1993; Young and Cole, 1993).

In many instances, the study on microbial gene expression and regulation has benefited tremendously from the use of reporter genes. They have been very instrumental for the screening of novel genes with phenotypes that otherwise are not easy to analyse (for a recent review, see Wood, 1995). Promoter-probe plasmids and transposons have been developed and successfully used in a number of microorganisms to identify new genes and to understand gene regulation in response to environmental changes (Taylor *et al.*, 1989). Reporter genes are also of great interest to measure and compare the strength of different promoters.

Recently, various reporter genes have also been demonstrated to be useful for mycobacteria, including the *Escherichia coli lacZ* gene (Timm *et al.*, 1994), the chloramphenicol acetyl transferase (*cat*) gene (Das Gupta *et al.*, 1993), the *E. coli phoA* gene (Kremer *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1995), the *xylE* gene from *Pseudomonas putida* coding for a catechol 2,3-dioxygenase (Curcic *et al.*, 1994), and the firefly luciferase (*lux*) gene (Jacobs *et al.*, 1993). Although these reporters have provided useful tools for mycobacteria, in most cases their use requires lysis or permeabilization of the cells and the addition of the respective substrate. As a result, the mycobacterial cells are usually killed before or following addition of the substrate and hence the expression of the reporter gene cannot easily be measured *in vivo*.

In the present study, we explore the green fluorescent protein (GFP) gene as a reporter gene for mycobacteria. The GFP is the source of fluorescent-light emission in the jellyfish *Aequorea victoria*. It absorbs u.v. light at 395 nm and has a fluorescence emission maximum at 510 nm. The active chromophore is generated by the spontaneous cyclization and oxidation of a serine-dehydrotyrosine-glycine trimer within a defined hexapeptide sequence of the protein (Cody *et al.*, 1993). The recent cloning of the *gfp* gene (Prasher *et al.*, 1992) and

its subsequent expression in heterologous systems (Chalfie *et al.*, 1994) have allowed it to be used as a novel genetic reporter system. Unlike other reporters, GFP generates fluorescence in the absence of any other proteins, substrates or co-factors, allowing expression to be monitored *in vivo* and in real time. In addition, the cells do not need to be lysed to measure the fluorescence. Here, we show that the *gfp* gene placed under the control of the BCG heat-shock promoter (*hsp60*) confers a green fluorescent phenotype of recombinant BCG *in vitro* and *in vivo* in infected mice.

## Results

### Expression of the *gfp* gene in mycobacteria and detection of GFP on agar plates

To test *gfp* gene expression in mycobacteria, pGFM-11 (Fig. 1) was constructed, in which the *gfp* gene was placed under the control of the *hsp60* promoter (Thole *et al.*, 1987). The *hsp60* promoter region was first isolated from *Mycobacterium bovis* BCG chromosomal DNA using the polymerase chain reaction (PCR) and was cloned upstream of the *E. coli lacZ* gene. The resulting

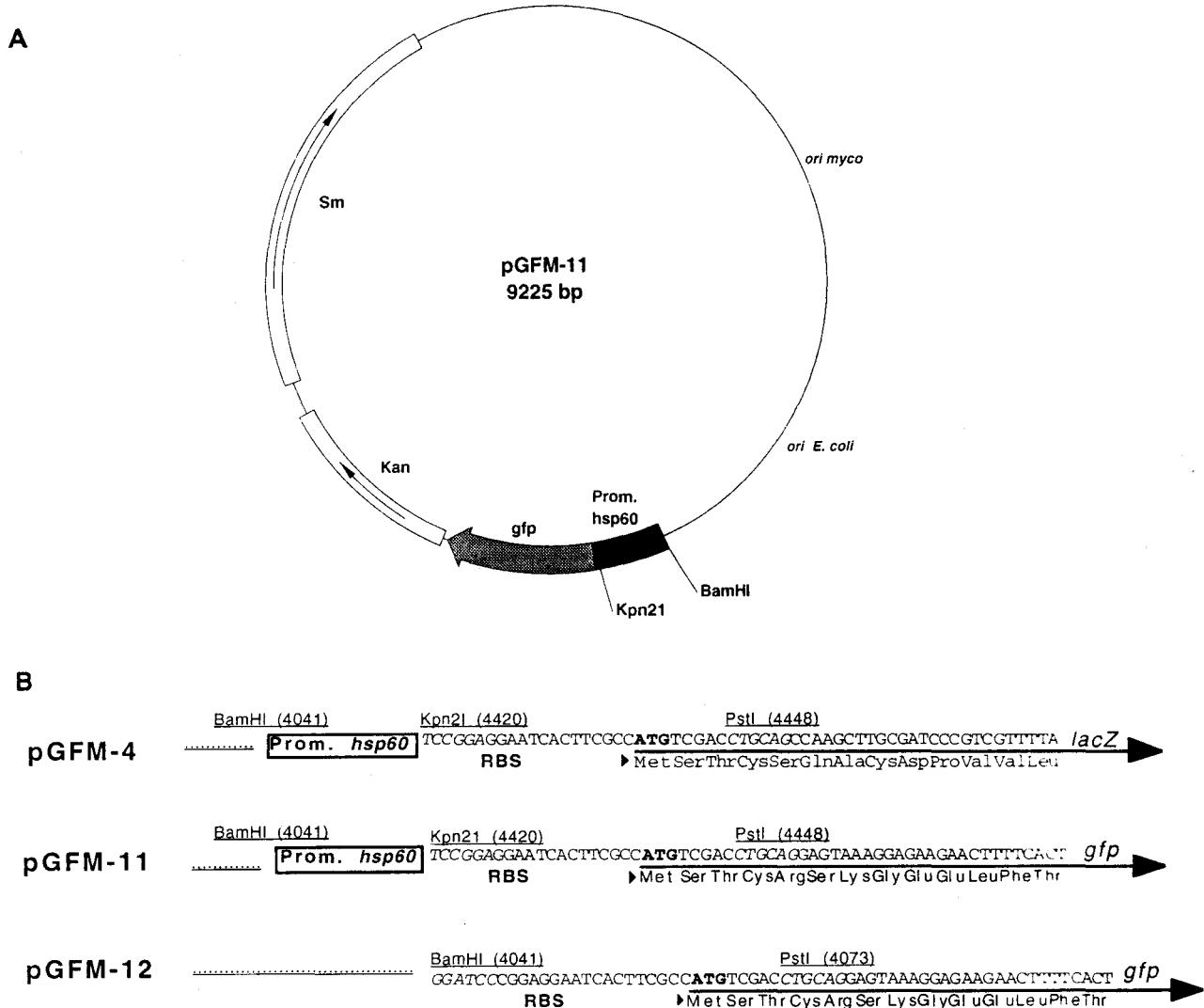


Fig. 1. Structure of the *gfp* expression vectors.

A. Physical map of the *gfp* expression vector. The pGFM-11 vector contains 0.4 kb of the 5' end of the BCG *hsp60* gene, including the promoter region, ribosome-binding site and the initiation codon (black box). This expression cassette is bordered at its 5' end by a unique *Bam*HI site and is located upstream of the *gfp* coding sequence (grey arrow). The vector also contains a kanamycin- and a streptomycin-resistance cassette (open boxes), as well as a mycobacterial and an *E. coli* origin of replication. The arrows indicate the direction of transcription. The unique *Bam*HI and *Kpn*21 sites are indicated.

B. Sequence and localization of the ribosome-binding site (RBS), the initiation codon (in bold) and the 5' end of the *lacZ* and *gfp* reporter genes in pGFM-4, pGFM-11, and pGFM-12. The positions of restriction sites are shown in brackets and their sequence is indicated in italics. The coding sequences are underlined. Amino acid sequences are represented using the three-letter code.

vector pGFM-4 contains a mycobacterial origin of replication from pAL5000, the ColE1 replicon from pUC19, the Tn903-derived *aph* gene conferring resistance to kanamycin, and a unique *Bam*HI site upstream of the *hsp60* promoter (Fig. 1B). When this plasmid was introduced into *E. coli* XL1-blue, all recombinant clones appeared blue after overnight incubation at 37°C on Luria–Bertani (LB) agar containing Xgal. The recombinant plasmid was then purified from *E. coli* and introduced into *M. bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. The electroporated mycobacteria were plated onto Middlebrook 7H10 agar containing Xgal, and also appeared blue after incubation at 37°C for two to three weeks (BCG), or four days (*M. smegmatis*). Non-transformed mycobacteria remained white, indicating successful expression of the *lacZ* gene under the control of the *hsp60* promoter in BCG(pGFM-4) and *M. smegmatis*(pGFM-4).

The *lacZ* gene of pGFM-4 was then substituted by the promoterless GFP-coding sequence amplified by PCR from pGFP10.1. The resulting plasmid, pGFM-11, was introduced into *E. coli*, *M. smegmatis* and BCG. Whereas, surprisingly, no fluorescence was detected in recombinant *E. coli* upon u.v. illumination, *M. smegmatis* and BCG harbouring pGFM-11 exhibited an intense green light (Fig. 2A). In contrast, the mycobacteria carrying pGFM-4 were unable to produce green fluorescence.

To verify that the expression of the *gfp* gene in BCG(pGFM-11) and *M. smegmatis*(pGFM-11) was controlled by the *hsp60* promoter, we developed pGFM-12. This plasmid was derived from pGFM-11 by deleting the 379 bp *Bam*HI–*Kpn*21 fragment, thereby generating a new unique *Bam*HI site located near the *hsp60* ribosome binding site (RBS) (Fig. 1B). The plasmid therefore lacks the *hsp60* transcriptional signals whilst the *hsp60* translational elements remain present. It was then transformed into *E. coli*, *M. smegmatis* and BCG. As expected, none of the recombinant bacteria exhibited fluorescence when irradiated with long-wave u.v. (Fig. 2A), indicating that the expression of the *gfp* gene in pGFM-11-transformed mycobacteria was under the control of the *hsp60* promoter. This also indicates that there was no read-through from vector sequences upstream of the *gfp* gene.

These observations suggest that pGFM-12 can be used as a promoter-probe vector. To test this possibility, BCG chromosomal DNA was partially digested with *Sau*3AI and ligated into the unique *Bam*HI site of pGFM-12. After being transformed into *E. coli* and plating onto LB agar, approximately 6000 clones containing recombinant plasmids were obtained. Interestingly, no fluorescent *E. coli* colonies were detected upon u.v. irradiation. After pooling and amplification of the kanamycin-resistant clones, plasmid DNA was prepared and used to transform *M. smegmatis*. Approximately 3 to 5% of the 4000 recombinant *M. smegmatis* clones obtained showed green

fluorescence with different intensities on agar plates. Some of them exhibited very strong fluorescence and therefore are likely to contain strong BCG promoters. Experiments are under way to determine the structure of these promoters.

#### *GFP detection in liquid medium*

To test whether fluorescent GFP can also be detected in recombinant mycobacteria grown in liquid culture, a fluorescence assay in microtitration plates was developed. Mycobacteria carrying pGFM-11 were added to wells containing either Sauton, Middlebrook 7H9, or Dubos medium and the microtitration plates were incubated at 37°C. The intensity of fluorescence was then measured using a spectrofluorimeter. Figure 3 shows that a green fluorescent light could be readily detected and quantified in wells containing BCG(pGFM-11) without lysing the cells. The results also indicated that the GFP levels were approximately the same regardless of the medium used.

#### *Drug-susceptibility testing*

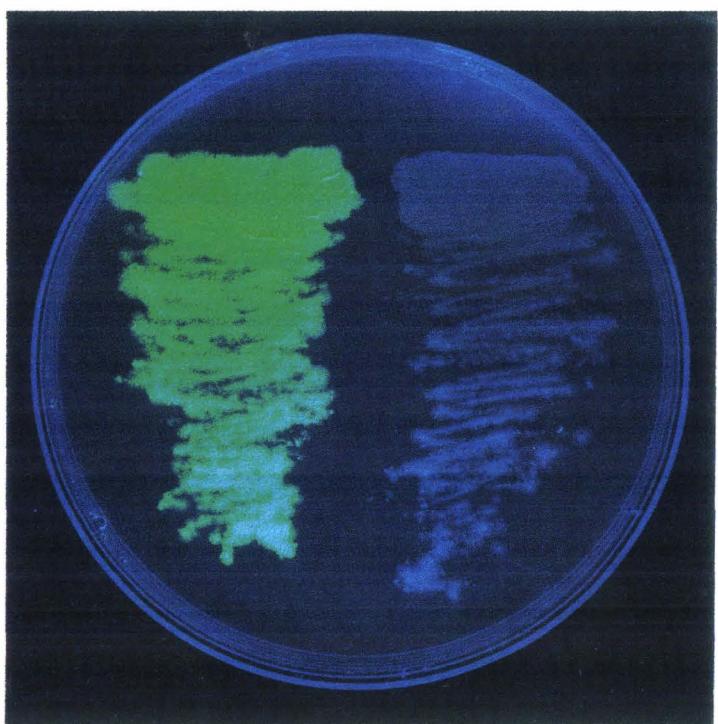
To test whether the *gfp*-expressing mycobacteria grown in microtitre plates might be useful for rapid drug-susceptibility testing, BCG(pGFM-11) were incubated in Sauton medium containing either one of the five drugs mentioned in Fig. 4. As shown in Fig. 4, fluorescence in the absence of drugs or in the presence of kanamycin increases steadily, at least over a period of 6 days. It was expected that the addition of kanamycin would not dramatically affect the growth of the recombinant BCG cultures because of the presence of the kanamycin-resistant gene in pGFM-11. In contrast, incubation with amikacin, clarythromycin or ethambutol inhibits mycobacterial growth, as evidenced by the slight decrease in fluorescence over time. Incubation in the presence of thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) resulted in a sharp decrease of fluorescence which was already apparent after 24 h of incubation. This illustrates that the mycobacterial *gfp*-expression system described here may be useful for rapid screening of new potential anti-mycobacterial drugs.

#### *Infection of macrophages by BCG(pGFM-11)*

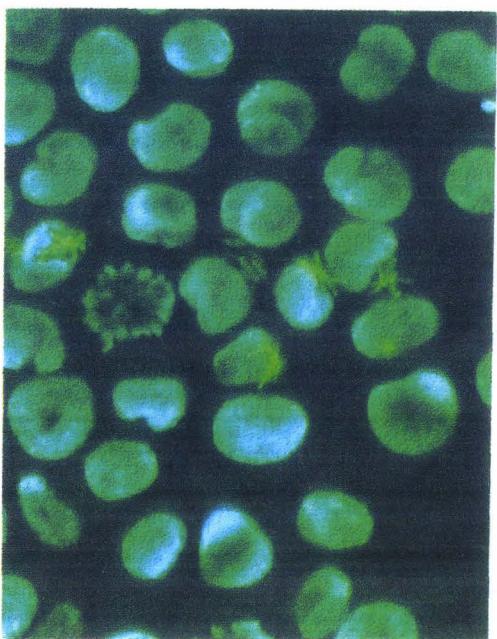
To investigate whether fluorescent mycobacteria can be directly detected in infected macrophages, J774A.1 macrophages were infected with BCG(pGFM-11) and then visualized by fluorescence microscopy. As shown in Fig. 2B, the green fluorescent BCG could be readily detected upon simple u.v. irradiation and were easy to distinguish from the Hoechst 33342-stained macrophage nuclei.

To determine whether the fluorescent BCG seen in

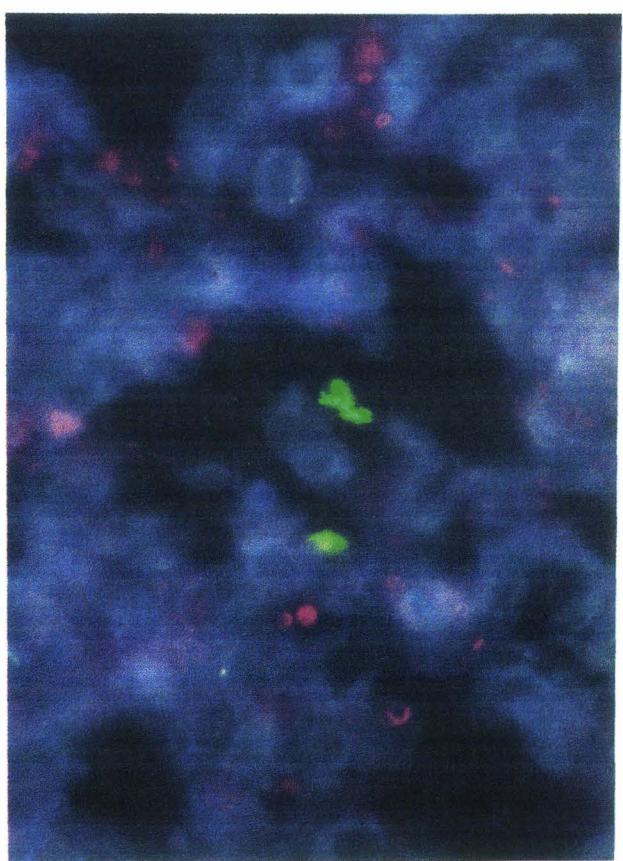
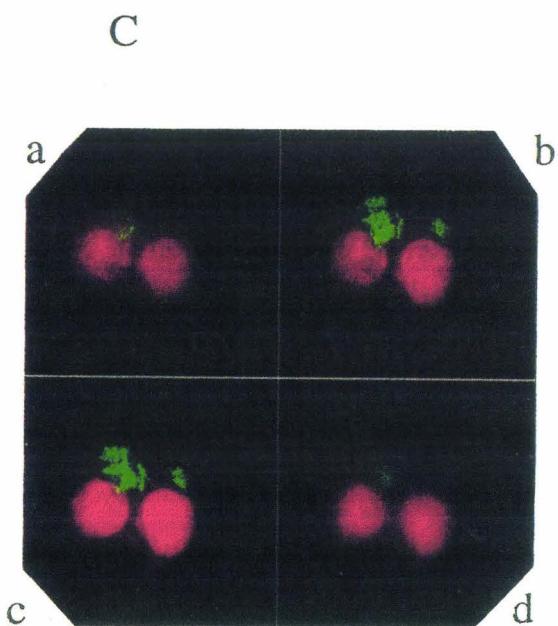
A

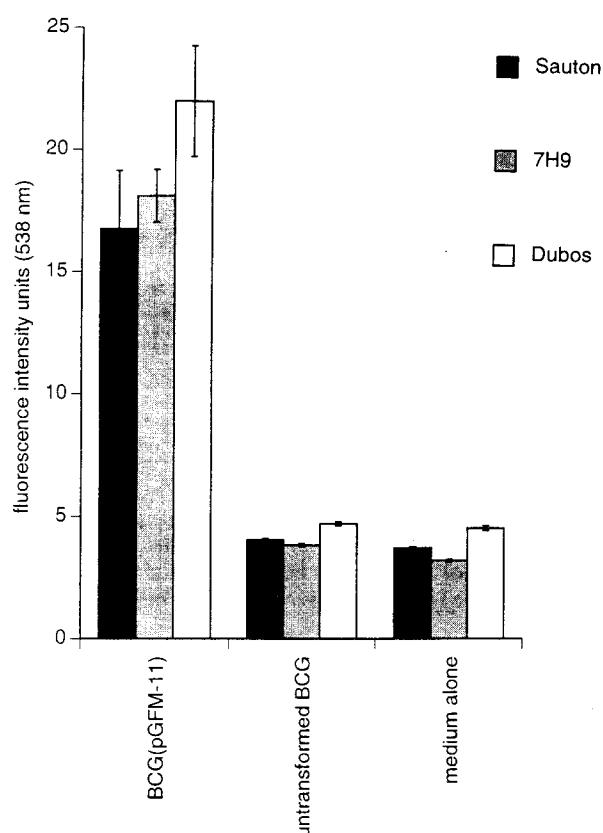


B



D





**Fig. 3.** The *gfp* expression levels of BCG(pGFM-11) and untransformed BCG in liquid Sauton, Middlebrook 7H9 or Dubos medium. Approximately  $10^7$  bacteria of each strain were incubated in the different media for 24 h in 96-well microtitre plates at 37°C. The fluorescence intensity of the inoculated (BCG(pGFM-11), and untransformed BCG), as well as the sterile (medium) wells was then measured at 538 nm using a spectrofluorimeter, and each result is presented as the mean of triplicate experiments including error bars.

Fig. 2B correspond to microorganisms that were internalized by the macrophages, or simply adhered to the surface of the cells, we employed confocal microscopy. A typical series is shown in Fig. 2C. The fluorescent mycobacteria become more and more visible as the sections

approach the cell centre, indicated by the propidium iodine-stained macrophage nuclei, whereas almost no fluorescent mycobacteria were detected on the surface of the cells, showing that BCG(pGFM-11) was internalized and that the *hsp60* promoter is active in internalized BCG.

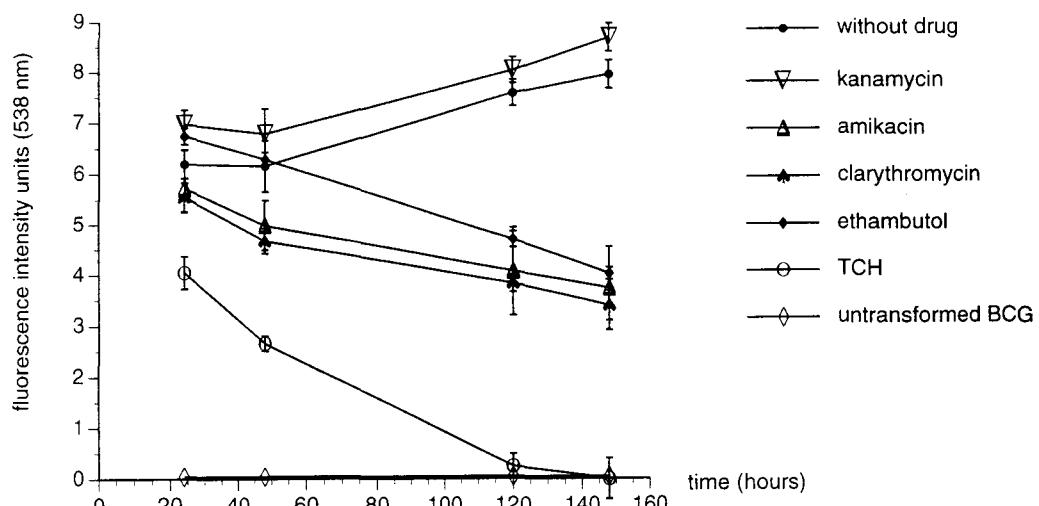
#### *Detection of fluorescent BCG by cytofluorimetry analysis*

As *gfp* gene expression could be easily detected in live recombinant mycobacteria, we assessed the possibility of analysing BCG(pGFM-11) by cytofluorimetry. BCG containing pGFM-11 exhibited a marked shift in fluorescence intensity, compared to the non-transformed BCG (not shown). In addition, this analysis indicated that within the mycobacterial population most, if not all BCG(pGFM-11) cells expressed the *gfp* gene. Therefore, cytofluorimetry analysis can be used to screen genes for their homogeneous or heterogeneous expression patterns within a given bacterial population, or in response to specific environmental signals.

As cytofluorimetry analysis can be used directly on live BCG(pGFM-11), we also investigated whether macrophages infected *in vitro* with fluorescent BCG could be separated from uninfected macrophages by cytofluorimetry analysis. Therefore, a J774A.1 macrophage monolayer was infected overnight at a 1:1 ratio with either non-recombinant BCG or BCG(pGFM-11) and then analysed by cytofluorimetry. Figure 5 clearly shows that flow-cytometry analysis was able to discriminate cells containing fluorescent BCG from non-infected cells or cells infected with untransformed BCG. As indicated by the quantitative cytofluorimetry analysis, approximately 10% of the macrophages were infected with the fluorescent mycobacteria after incubation of macrophages and microorganisms in a 1:1 ratio. These results indicate that BCG did not infect the cells homogeneously, and that a substantial fraction of the macrophages remained uninfected. Fluorescence and confocal microscopy (see Fig. 2, B and C) showed that those macrophages that were infected usually contained several mycobacteria

#### **Fig. 2. *In vitro* and *in vivo* expression of the *gfp* gene in BCG.**

- A. BCG containing pGFM-11 (left side) or pGFM-12 (right side) were inoculated onto Middlebrook 7H10 containing 25 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin and grown for 2 weeks at 37°C. The plate was then visualized using a hand-held 366 nm u.v. light source.
- B. Expression of *gfp* in BCG within infected macrophages. J774A.1 macrophages were infected *in vitro* with recombinant BCG and stained with Hoechst 33342. Fluorescence microscopy was used to distinguish the cell nuclei (stained in blue) from the fluorescent BCG (stained in green). Magnification,  $\times 651$ .
- C. Confocal microscopy of macrophages infected with BCG(pGFM-11). J774A.1 macrophages were infected *in vitro*, and the cell nuclei were stained in red with propidium iodine. A series of four consecutive confocal sections is shown starting from the bottom (a) to the top (d) of the cells. No bacteria were found on the cell surfaces (a and d), whereas the bacteria become strongly visible as green fluorescent bacilli in the central cell sections (b and c), indicating the intracellular location of the microorganisms. Magnification,  $\times 651$ .
- D. Histology section from a mouse lung infected with BCG(pGFM-11). A male Swiss mouse was infected intranasally with  $2 \times 10^8$  BCG(pGFM-11). Three days after infection, the mouse was sacrificed, and the lungs were removed and frozen. Cryosections were prepared and counterstained with haematoxylin prior to visualization with a fluorescence microscope (blue light). Green fluorescent BCG can be seen in the alveoli of the lungs. Magnification,  $\times 930$ .



**Fig. 4.** Drug-susceptibility assay. Approximately  $10^7$  recombinant BCG were incubated in the absence or in the presence of the indicated drugs in microtitre plates. The fluorescence intensity measured at 538 nm was monitored at the indicated times over a total incubation period of 6 d at 37°C. The results are presented as the means of triplicates minus the background values corresponding to the absorbance of medium alone. The fluorescence of untransformed BCG was identical to the background values regardless of the presence of the drugs tested.

within the same cell. This heterogeneous distribution of infected cells may at least partly be the result of bacterial aggregation. Nevertheless, this technology provides an efficient way to quantify and analyse subpopulations of infected and uninfected cells.

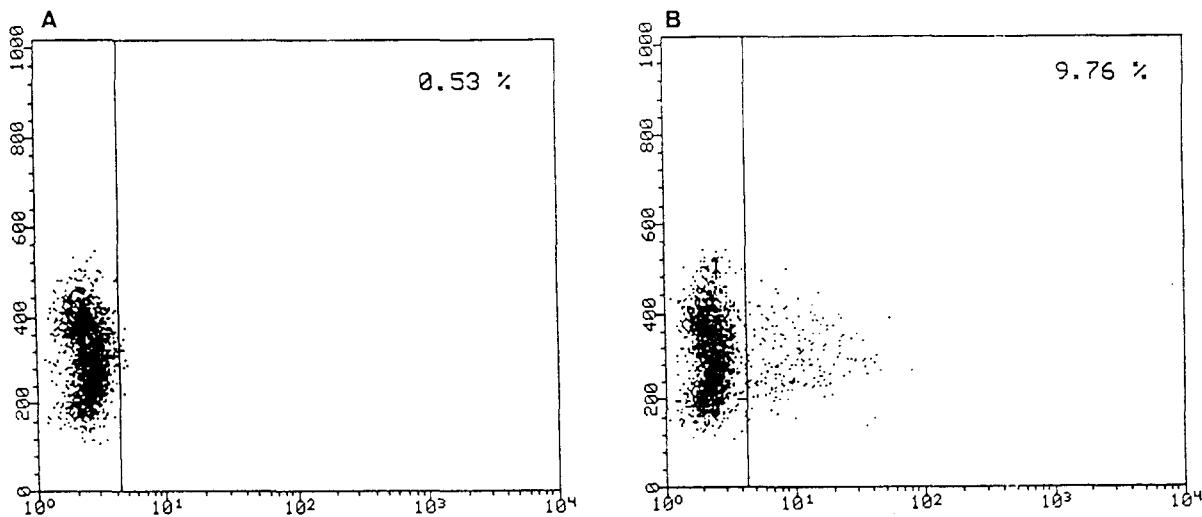
#### Detection of fluorescent BCG(pGFM-11) in infected mouse organs

To determine whether the *gfp* gene can be used to trace mycobacteria within an infected host, Swiss mice were infected intraperitoneally or intranasally with

BCG(pGFM-11). Three days after infection the mice were sacrificed, and the spleen, lungs and liver were removed and directly examined by fluorescence microscopy. Intraperitoneal infection resulted in a rapid spread of the fluorescent BCG in the spleen and the liver. In contrast, three days after intranasal infection, significantly less BCG were found in organs other than the lungs, whereas fluorescent BCG could readily be detected in the lung sections (Fig. 2D).

#### Discussion

In this study, we established the utility of the GFP as a



**Fig. 5.** Flow cytometric analysis of BCG-infected macrophages. The cytofluorimetry analysis was performed directly on 10 000 intact macrophages without any treatment. The results are shown as the relative amounts of macrophages against the  $\log_{10}$  of fluorescence. The results obtained with the macrophages infected with untransformed BCG are shown in (A) and those obtained with BCG(pGFM-11)-infected macrophages are shown in (B). The percentages indicate the proportions of fluorescent cells.

fluorescent indicator of gene expression in mycobacteria. Expression of the *gfp* gene under the control of the BCG *hsp60* promoter could be readily detected in *M. smegmatis* and BCG grown on solid medium or in liquid medium. Interestingly, no expression was detected in *E. coli*, although the BCG *hsp60* promoter fused to the *lacZ* gene allowed expression of *lacZ* in *E. coli*. The reason for this discrepancy is not known, but we have noticed on several occasions with other genes, that the BCG *hsp60* promoter does generally not allow heterologous gene expression in *E. coli*. In our hands, the *lacZ* gene appears, so far, to be the only exception (our unpublished work).

There are several intrinsic advantages that GFP can offer over other, previously used reporters. GFP is encoded by a small DNA sequence, thus facilitating manipulations and constructions of various fusions. In addition, even smaller peptide fragments of GFP might retain the activity, further facilitating its use as a fluorescent tag to perhaps allow protein-localization studies in living cells. The chromophore responsible for GFP fluorescence is entirely contained within the amino acid sequence of the protein and involves oxidative cyclization of the residues Ser-Tyr-Gly located at positions 65–67 (Heim *et al.*, 1994). Fluorescence therefore does not require the addition of exogenous substrates or co-factors. Thus, this allows direct detection of the *gfp* gene expression in both rapid- and slow-growing mycobacteria. This can be accomplished simply by irradiating transformed bacteria with long u.v. wavelengths, without the need of previously lysing the cells. This constitutes an important advantage over other reporter proteins, such as PhoA, which cannot be easily used for gene expression studies of slow-growing mycobacteria on indicator plates (Kremer *et al.*, 1995). Quantification of gene expression can also be easily achieved by irradiating liquid cultures and measuring fluorescence intensity using a spectrofluorimeter. This will allow the study of gene regulation in response to environmental signals including nutrient starvation, temperature shift, osmolarity and pH. Because GFP is relatively resistant to photobleaching when irradiated at 470 nm (Chalfie *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 1994), it will also be useful to study the kinetics of gene activation in real time. This cannot be achieved by conventional reporter genes.

Because of the direct fluorescence emission by irradiated GFP, its gene (*gfp*) can also be used as a reporter to identify promoters with interesting characteristics. Cytofluorimetry analysis may then be used to separate those mycobacteria which contain the *gfp* gene under the control of promoters possessing the desired characteristics, from other mycobacteria present in the same heterogeneous population. This may be particularly useful for the identification and study of genes that are responsible for specific phenotypes, such as the spreading colony

morphology, bacterial sectoring and others. Cytofluorimetry analysis on *in vitro*-infected macrophages is also useful to separate infected macrophages from uninfected cells or to isolate macrophages containing mycobacteria with the *gfp* gene under the control of promoters that are specifically active within the cells. Plasmids such as the promoterless *gfp*-based pGFM-12, will be particularly useful for identifying such promoters.

Macrophages can then be infected with the recombinant mycobacteria and directly sorted by cytofluorimetry to isolate active promoters within the infected cells. We are currently combining the *gfp*-expression system with cytofluorimetry analysis to identify such promoters. It has been shown with other intracellular pathogens (Mahan *et al.*, 1993) that genes specifically expressed within the host often are involved in virulence. Therefore, this technology may ultimately lead to the identification of mycobacterial virulence genes. As fluorescent BCG could readily be detected in the spleen, lungs and liver of infected mice, the *gfp* reporter gene is useful for the study of the *in vivo* expression of mycobacterial genes.

The separation of infected from uninfected cells by cytofluorimetry in a heterogeneous cell population may also be helpful to isolate subpopulations of cells that are particularly susceptible to mycobacterial infections, for example after experimental infection of animals with fluorescent mycobacteria. Using fluorescence microscopy it may also be possible to easily follow mycobacterial infections of cultured cells such as macrophages by video-microscopy over an extended period of time. This will allow visualization of the internalization and the intracellular fate of the microorganism. The *gfp* reporter gene may also help to study the susceptibility of different animal host strains at the cellular level. As shown in this study, the temporal dynamics of mycobacterial infections can also be investigated. Fluorescent mycobacteria can easily be traced within the infected animal, and the kinetics of mycobacterial spread throughout the body can be followed at various time points after initial inoculation at a defined site. We found that intraperitoneal inoculation caused a more rapid spread of BCG than intranasal inoculation.

Several new versions of the GFP have recently been described. Heim *et al.* (1994) obtained a mutant analogue expressing blue fluorescence. Other recently described versions include the red-shifted excitation analogues (Delagrange *et al.*, 1995). The availability of these analogues will significantly extend the usefulness of GFPs in mycobacteria and will enable us to compare the ability of different mycobacterial strains to invade phagocytic cells or to infect model animals in co-infection experiments. For example, the expression of the *gfp* gene in a wild-type parent strain and the blue-fluorescent version in a mutant strain would allow one to compare the infection kinetics of the different mycobacterial strains in

co-infection experiments using isolated cell populations or animals.

In addition to the exciting new research possibilities which have been opened up by the use of GFP as a reporter for mycobacteria, there are also several useful technical applications. As shown for a limited amount of known anti-mycobacterial drugs in this study, the quantitative fluorescence assay provides a rapid method for screening antimicrobial agents. The increasing problem of drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* has heightened interest in the development of new antituberculosis agents. Ideally, the drugs should act on their mycobacterial targets throughout the entire growth cycle of the infecting microorganism, both inside and outside the host cell. Because *gfp*-expressing mycobacterial can readily be detected in infected macrophages, the GFP reporter system allows one, in principle, to test for molecules that are active inside infected cells.

In conclusion, this study describes the use, advantages and applications of the GFP in mycobacteria. This marker can be used very conveniently for the screening of interesting promoters. Moreover, fluorescent BCG can be detected directly within infected macrophages or in the tissues of infected animals. As the *gfp* expression in recombinant mycobacteria can be directly measured, convenient and easy-to-use drug-sensitivity tests can be developed to screen for novel anti-tuberculosis compounds. The use of this reporter can probably be extended to the genetic study of other intracellular microorganisms.

## Experimental procedures

### Plasmids and DNA manipulation

Plasmids pUC18, pBluescript and pUC4K were purchased from New England Biolabs, Stratagene, and Pharmacia LKB, respectively. The pUC18-derivative pNM480 containing promoterless *lacZY* genes (Minton, 1984) has been provided by P. Bertin. The streptomycin-resistance cassette was isolated from pH45Ω (Prentki and Krisch, 1984), which was kindly provided by K. Timmis. The *gfp* cDNA was isolated from pGFP10.1 (Chalfie et al., 1994), which was a generous gift from D. C. Prashert. The shuttle vector pRR3ΔKan has been described previously (Kremer et al., 1995).

Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, T4 DNA ligase, calf intestinal phosphatase, Taq polymerase and Klenow enzyme were purchased from Boehringer Mannheim, except for *Kpn*1 (Sigma). All DNA manipulations were performed under standard conditions, as described by Sambrook et al. (1989). Restriction analysis of plasmids from mycobacteria were carried out by electroporation into *E. coli*, as described by Baulard et al. (1992). Nucleotide sequences were determined from double-stranded DNA by the dideoxyribonucleotide chain-termination method, using [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP (1000 Ci mmol<sup>-1</sup>; Amersham) and the DNA T7 sequencing kit (Pharmacia LKB) as recommended by the supplier.

### Bacterial strains and growth conditions

All cloning steps were performed in *E. coli* XL1-blue (Stratagene). Expression studies were performed in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (Snapper et al., 1990), generously provided by T. Kieser, and in BCG (vaccine strain 1173P2, WHO Stockholm). All liquid cultures of BCG and *M. smegmatis* were grown in Sauton medium (Sauton, 1912) at 37°C using stationary tissue culture flasks. Transformation of mycobacteria was carried out as described previously (Kremer et al., 1995).

### Preparation of genomic DNA from BCG

Large-scale preparations of genomic DNA were obtained from 150 ml of a 10- to 20-days-old BCG culture. After centrifugation, the cells were resuspended in 1.2 ml of TE (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) containing 1.3 mg ml<sup>-1</sup> of lysozyme (Sigma). The suspension was incubated for 30 min at 37°C. The bacterial cell walls were disrupted by adding 3% SDS and 500 µg ml<sup>-1</sup> of proteinase K (Boehringer), and heating at 60°C for 45 min. NaCl (5 M; 4 ml) and of CTAB/NaCl (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in 0.7 M NaCl; 3.3 ml) were then added to the suspension which was mixed thoroughly and incubated for 30 min at 60°C. The aqueous phase was recovered after centrifugation at 9300 × g for 20 min at 4°C, extracted successively with an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol (49:1; v/v) and phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1; v/v/v). The DNA was precipitated with a 0.7 volume of isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in TE buffer.

### Construction of a shuttle plasmid expressing the *gfp* gene

The BCG *hsp60* promoter was used to drive the expression of *gfp*. The promoter was isolated by PCR from genomic BCG DNA, using two synthetic oligonucleotides (Eurogentec) with the following sequences: 5'-CCGGATCCGGATGCCGGTGTGCGCC-3' and 5'-TGGCCCATGGCGAAGTGATTCCCTCCG-3'. The first primer contained a *Bam*HI site (underlined) and the second contained a *Nco*I site (underlined) which includes the ATG initiation codon. The 406 bp PCR product which contains the *hsp60* promoter, the RBS and the start codon, was then ligated into pUC18 linearized by *Sma*I, thereby giving rise to pUC::*hsp60*. The *Bam*HI-*Nco*I insert (filled in at its *Nco*I site) was then ligated with the *Bam*HI-*Sal*I-restricted pNM480 (filled in at its *Sal*I end), thereby generating pGFM-1 such that the *hsp* ATG initiation codon was in frame with the *lacZ* gene. The 5.5 kb *Bam*HI-*Stu*I DNA fragment from pGFM-1 spanning the *hsp60* promoter, the RBS, the start codon and the *lacZY* coding sequences was then cloned into a *Bam*HI-*Sma*I-restricted pBluescript vector. This intermediate plasmid was named pGFM-2. An *Eco*RI fragment isolated from pUC4K and containing the kanamycin cassette, was inserted into the unique *Eco*RI site of pGFM-2 to yield pGFM-3. The shuttle vector pRR3ΔKan/Sm was obtained by inserting a filled in *Hind*III-fragment containing the streptomycin resistance gene from pH45Ω into the filled in *Pst*I site of pRR3ΔKan. To construct pGFM-4, the 6.7 kb *Xba*I-

*Asp718* (filled in at both ends) fragment from pGFM-3, which contains the promoter, the translational signals, the *lacZY* and kanamycin-resistance genes, was ligated into the unique *Sca*I site of pRR3ΔKan/Sm. The *gfp*-expressing vector pGFM-11 was constructed by removing the *lacZY*-coding sequences by *Pst*I restriction and substituting a 722 bp *Pst*I-fragment encoding the *gfp* gene for the 5 kb *Pst*I-fragment. The fragment containing the *gfp*-coding sequence without transcriptional and translational signals was amplified by PCR from pGFP10.1 using two oligonucleotides (Eurogentec) with the following sequences: 5'-CAGGAGTAAAGGAGAAC-3' and 5'-CAGTTTATTGTATAGTTCATCC-3'. *M. smegmatis* and BCG were transformed with pGFM-11 and transformants were selected on the basis of resistance to kanamycin.

#### Construction and use of a promoterless *gfp*-based vector for mycobacteria

A promoterless vector, designated pGFM-12, was derived from pGFM-11 by restriction with *Bam*H I and *Kpn*II, and treatment with Klenow fragment in order to fill in both ends of the plasmid. The vector was then religated, thereby creating a new *Bam*H site located next to the RBS. This promoterless vector lacks the *hsp60* promoter region while the *hsp60* RBS and start codon remain present. *M. smegmatis* and BCG were transformed with pGFM-12 and kanamycin-resistant transformants were selected for.

Total genomic BCG DNA was partially digested with *Sau*3A1 such that the sizes of the majority of the restriction fragments ranged from a few hundred bp to several kb. The pGFM-12 was digested with *Bam*H I and dephosphorylated using calf intestinal phosphatase as described (Sambrook *et al.*, 1989). The *Sau*3A1 fragments were then ligated into pGFM-12 and introduced into *E. coli* XL1-blue. After overnight growth at 37°C on LB agar with kanamycin, the recombinant *E. coli* (approximately 6000 clones) were pooled and incubated in liquid LB at 37°C for 2 h. Plasmid DNA was then extracted as described (Sambrook *et al.*, 1989) and used to transform *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. The recombinant mycobacteria were selected on LB agar containing kanamycin and visualized under u.v. light after 4 d of growth at 37°C.

#### Macrophage infection

J774A.1 macrophages (ATCC TIB67) were cultured in RPMI 1640 (GIBCO BRL) supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum (FCS; GIBCO BRL). For microscopic analysis, freshly-grown cells were seeded in eight-chamber culture slides (Lab-Tek; Nunc) at a density of 10<sup>4</sup> cells per chamber. The slides were incubated overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Just prior to infection, the adherent macrophage monolayer was washed with RPMI 1640. Infection was performed by adding a bacterial suspension of untransformed or recombinant BCG to obtain a multiplicity of infection of 1–5 bacteria per macrophage. After overnight incubation at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, the cells were washed three times with RPMI to remove possible extracellular microorganisms.

#### Infection of mice and histological studies

Eight-week-old male Swiss mice were infected intranasally or

intraperitoneally with 2 × 10<sup>8</sup> BCG(pGFM-11). After 3 d, the mice were sacrificed. The spleen, lungs and liver were recovered and processed for cryosection. Briefly, organs were fixed for one hour in 1% paraformaldehyde, then infiltrated overnight with 20% sucrose in PBS and subsequently frozen. Cryosections (7 µm) were left unstained or counterstained with haematoxylin and Evans Blue to minimize autofluorescence, and mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem). Fluorescence was viewed with either blue light (BP365, LP397 filters) or FITC optics (BP450, LP520 filters) using an epifluorescence microscope (Zeiss). Permission (No. 02291) for animal work was granted by the Ministère de l'Agriculture et de la Forêt.

#### Methods for GFP detection

**Detection by a hand-held long-wave u.v. source.** Direct *gfp* expression in mycobacteria was shown upon irradiation of the plates at 366 nm with a hand-held long-wave u.v. source. Green fluorescent clones could also be seen during illumination with a short-wave u.v. source (312 nm).

**Microscopical studies.** Recombinant BCG, as well as infected macrophages were visualized using a fluorescence microscope (Leica). The macrophage nuclei were visualized after incubation with Hoechst 33342 nuclear dye (bisBenzimide; 0.5 µg ml<sup>-1</sup>) for 5 min at room temperature. For confocal microscopy, the cells were incubated for 5 min at room temperature with 0.1 µg ml<sup>-1</sup> propidium iodine (Immunotech) to stain the cell nuclei. Slides were excited at 488 nm and visualized using the fluorescence microscope or using CLSM (Leica) confocal microscopy (×700).

**Flow cytometry of recombinant BCG expressing the *gfp* gene.** Untransformed or recombinant BCG were grown to mid-log phase, harvested by centrifugation, washed with PBS and resuspended in the same buffer. To disperse aggregated microorganisms, the bacterial suspensions were mildly sonicated with 3 × 10 sec pulses using a Branson sonicator 450 at minimal constant output. The bacterial suspensions were then analysed by flow cytometry (Epics Elite, Coulter Coultronics). About 50 000 individual events were excited at 488 nm prior to analysis. Alternatively, J774A.1 macrophages were infected with recombinant BCG at approximately 1 microorganism per macrophage, and the infected macrophage suspension was then analysed.

#### Fluorescence assay

Untransformed and recombinant BCG expressing the *gfp* gene were harvested from exponentially growing cultures. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS to a final concentration of 4 × 10<sup>8</sup> bacilli per ml. To test the *gfp*-expression level in three different growth media (Sauton, Dubos (Difco) and Middlebrook 7H9 (Difco)), 25 µl of bacterial suspensions were mixed with 175 µl of each medium in 96-well microdilution plates (Nunc). The plates were then incubated at 37°C. The intensity of fluorescence was measured after 24 and 48 h of incubation using a spectrofluorimeter (Labsystems)

with an excitation wavelength of 355 nm and emission at 538 nm. The results from experiments performed in triplicate were expressed in fluorescence intensity units at 538 nm.

For drug susceptibility testing, kanamycin (Sigma), amikacin (Laboratoires Bristol), clarythromycin (Abbott), ethambutol (Becton Dickinson) and TCH (Sigma) were dispensed at a final concentration of  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , into 96-well microdilution plates containing  $10^7$  BCG(pGFM-11) per well in Sauton medium. The plates were sealed with parafilm and incubated at 37°C. The fluorescence intensity units at 538 nm were measured in triplicate experiments for up to 6 d.

### Acknowledgements

We thank P. Bertin, D.C. Prashert, M. Chalfie, and K. Timmis for plasmids, and T. Kieser for *M. smegmatis*. We also thank J.-P. Kusnierz for help with the confocal microscopy, B. Quatannens for cytofluorimetry analysis, and V. Stone for critically reading the manuscript. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas-de-Calais, et Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and the EC Biotech programme. L.K. holds a fellowship from Région Nord-Pas-de-Calais, and J.E. holds a fellowship from ANRS.

### References

- Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A., and Locht, C. (1992) Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* **20**: 4105.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802–805.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212–1218.
- Curcic, R., Dhandayuthapani, S., and Deretic, V. (1994) Gene expression in mycobacteria: transcriptional fusions based on *xylE* and analysis of the promoter region of the response regulator *mtrA* from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **13**: 1057–1064.
- Das Gupta, S.K., Bashyam, M.D., and Tyagi, A.K. (1993) Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. *J Bacteriol* **175**: 5186–5192.
- Delagrange, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (1995) Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Bio/Technology* **13**: 151–154.
- Hatfull, G.F. (1993) Genetic transformation of mycobacteria. *Trends Microbiol* **1**: 310–314.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12501–12504.
- Jacobs, Jr, W.R., Kalpana, G.V., Cirillo, J.D., Pascopella, L., Snapper, S.B., Udani, R.A., Jones, W., Barletta, R.G., and Bloom, B.R. (1991) Genetic systems for mycobacteria. *Meth Enzymol* **204**: 537–555.
- Jacobs, Jr, W.R., Barletta, R.G., Udani, R.A., Chan, J., Kalkut, G., Sosone, G., Kieser, T., Sarkis, G.J., Hatfull, G.F., and Bloom, B.R. (1993) Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* **260**: 819–822.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A., and Locht, C. (1995) Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol* **177**: 642–653.
- Lim, M.E., Rauzier, J., Timm, J., Torrea, G., Murray, A., Gicquel, B., and Portnoi, D. (1995) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J Bacteriol* **177**: 59–65.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., and Mekalanos, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686–688.
- Minton, N.P. (1984) Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *Gene* **31**: 269–273.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229–233.
- Prentki, P., and Krisch, H. (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303–313.
- Ranes, M.G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. (1990) Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a 'mini' *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* **172**: 2793–2797.
- Raviglione, M.C., Snider, D.E., and Kochi, A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* **273**: 220–226.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauton, B. (1912) Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C R Hebdo Séances Acad Sci Paris* **155**: 860.
- Snapper, S.B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R.E., Kieser, T., Bloom, B.R., and Jacobs, Jr, W.R. (1988) Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6987–6991.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, Jr, W.R. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**: 1911–1919.
- Taylor, R.K., Manoil, C., and Mekalanos, J.J. (1989) Broad-host-range vectors for the delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **171**: 2583–2587.
- Thole, J.E.R., Keulen, W.J., Kolk, A.H.A., Groothuis, D.G., Berwald, L.G., Tiesjema, R.H., and van Embden, J.D.A. (1987) Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 1466–1475.
- Timm, J., Lim, E.M., and Gicquel, B. (1994) *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to *lacZ*: the pJEM Series. *J Bacteriol* **176**: 6749–6753.
- Wood, D.C. (1995) Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol* **6**: 50–58.
- Young, D.B., and Cole, S.T. (1993) Leprosy, tuberculosis, and the new genetics. *J Bacteriol* **175**: 1–6.

Sixième partie:

**INTEGRATION CHROMOSOMIQUE  
PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE**

Un autre aspect important dans l'élaboration d'un BCG recombinant consiste à stabiliser l'information exogène. Une stabilité de plusieurs années doit être envisagée pour la vaccination chez l'homme. Le maintien d'un plasmide au sein d'une bactérie requiert généralement une pression de sélection continue. Or, la pression de sélection ne pourra pas être maintenue après administration de la souche recombinante dans l'organisme. Le développement de techniques d'intégration de l'information exogène dans le chromosome mycobactérien a donc été abordé dans la dernière partie de ce mémoire. La stabilisation de l'information exogène dans le chromosome bactérien évite de devoir maintenir la pression de sélection.

Des gènes étrangers peuvent être intégrés dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue, transposition, recombinaison illégitime ou par des phages intégratifs. La transposition et la recombinaison illégitime insèrent l'information génétique de manière aléatoire dans le chromosome. Ces méthodes peuvent entraîner des modifications phénotypiques de la mycobactéries et des insertions instables. Des vecteurs suicides contenant les sites *attP* et le gène *int* du phage L5 permettent l'intégration de l'information exogène au niveau du site *attB* du BCG. Dès lors, cette méthode n'autorise que l'insertion d'un seul élément dans le chromosome mycobactérien. La recombinaison homologue permet, quant à elle, d'intégrer l'information de manière stable et contrôlée. Cette méthodologie permet également d'insérer de multiples fragments d'ADN dans différentes régions du chromosome. Cependant, elle est limitée par la

faible capacité que présentent certains microorganismes, dont les mycobactéries, à recombiner.

Dans un premier temps, nous avons évalué la fréquence des phénomènes de recombinaison homologue chez *M. smegmatis* et chez le BCG à l'aide de plasmides autoréplicatifs. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de mettre au point un système favorisant la recombinaison entre plasmides autoréplicatifs et le chromosome mycobactérien. Une stratégie simple, baptisée STORE pour "Selection Technique of Recombinant Events" a été conçue pour intégrer un plasmide autoréplicatif dans le locus *hsp* de *M. smegmatis* et du BCG par recombinaison homologue.

Cette technologie est décrite dans l'article "Highly efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria", qui a été soumis à "Journal of Bacteriology".

# Highly efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria

(Running title : Homologous recombination in mycobacteria)

(Key Words : *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG, intraplasmid recombination, chromosomal integration)

by Alain Baulard<sup>1</sup>, Laurent Kremer<sup>1,2</sup>, and Camille Locht<sup>1†</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM CJF9109,

<sup>2</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM 167-CNRS 624,  
Institut Pasteur, 1, Rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

<sup>†</sup>Corresponding author : Tel # (+33) 20.87.77.28

Fax # (+33) 20.87.79.06

## SUMMARY

Homologous recombination is one of the major mechanisms for DNA rearrangement in most living organisms. However, it has been difficult to detect in slow-growing mycobacteria by the classical suicide vector approach. Among the possible reasons for this are the low transformation efficiencies, the relatively high levels of illegitimate recombination, and the peculiar nature of the *recA* gene. Here, we present a highly efficient homologous recombination system based on the use of replicative plasmids. This approach offers the possibility to uncouple transformation efficiencies from recombination frequencies. It facilitates the detection of rare recombination events, because the proportion of recombined molecules increases over time. It increases the recombination frequencies, because recombination is likely to be coupled with replication. High levels of intra-plasmid homologous recombination have been observed in *Escherichia coli*, as well as in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. In addition, a technology has been developed that allows for high levels of homologous recombination in the chromosome of *M. smegmatis* and BCG. This technology was termed STORE (for Selection Technique Of Recombination Events) and is based on the use of one resistance marker for the selection of transformants and the use of another marker for the selection of homologous recombination. The latter is only expressed when integrated at the correct position in the bacterial chromosome. STORE yielded 100 % homologous recombinants among the selected clones. This principle should be applicable to all organisms for which homologous recombination has been difficult to bring to the fore, provided the target gene is expressed.

## INTRODUCTION

Homologous recombination is a powerful mechanism by which DNA fragments can be inserted, deleted or altered at specific sites in the genome. Slow-growing mycobacteria have notoriously been relatively refractory to homologous recombination (5). However, if such a mechanism could be efficiently used in slow-growing mycobacteria, it would help tremendously to understand the molecular mechanism of important diseases such as tuberculosis and leprosy. In addition, the recent development of *Mycobacterium bovis* BCG as a live vaccine vector for the presentation of heterologous antigens (19) would also benefit from the possibility of inserting foreign genes into the chromosome at precise positions to stabilize the genetic constructions.

Although successful with fast-growing mycobacteria such as *Mycobacterium smegmatis* (8), previous attempts to achieve homologous recombination by the selection methods used resulted only in the detection of illegitimate recombination in the slow-growing *M. bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* (9). In these studies non-replicating plasmids were used. A significant increase of transformation efficiency of linear DNA allowed for the detection of homologous recombination events in BCG (1). However, with this approach, only single homologous recombination events were observed, apparently resulting from an unclassical strand invasion mechanism. More recently, and while this paper was in preparation, Norman et al. (14) described a method for the replacement of a BCG target gene by homologous recombination, indicating that slow-growing mycobacteria are not completely refractory to homologous recombination.

The results of these studies suggest that the low transformation rate of slow-growing mycobacteria and the use of non-replicating DNA may have constituted major handicaps for the detection of homologous recombination in previous studies. We therefore decided to uncouple the recombination events from the transformation efficiencies by the use of replicative plasmids. Furthermore, recombination has been proposed to occur simultaneously with

DNA replication (20). Therefore, we reasoned that the use of replicative plasmids might significantly increase the recombination frequency. However, the use of replicating plasmids requires a recombination phenotype distinct from the transformation phenotype.

In this study we describe a powerful selection system for intra-plasmid and plasmid-chromosomal homologous recombination in mycobacteria. Using replicating plasmids very high levels of homologous recombination were obtained in fast- and slow-growing mycobacteria, and 100% of the selected clones had undergone homologous recombination.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** All cloning steps were performed in *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA). The mycobacterial strains used were *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2) and *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (18), an efficient plasmid transformation mutant of *M. smegmatis* mc<sup>6</sup> (generously provided by T. Kieser). Cultures of *M. bovis* BCG or *M. smegmatis* were grown in Sauton medium (17) at 37°C, supplemented with 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub>, 15 µg/ml streptomycin (Sm) or 20 µg/ml kanamycine (Km) when appropriate. Mycobacterial transformation was performed as previously described (10). After transformation the mycobacteria were plated onto Middlebrook 7H10 agar (Difco) supplemented with 15 µg/ml Sm, 20 µg/ml Km, or 12 µg/ml HgCl<sub>2</sub> as indicated.

**Plasmids and DNA manipulation.** pBluescript SKII<sup>+</sup> and pUC4K were purchased from Stratagene and Pharmacia LKB (Upsalla, Sweden), respectively. pHp45Ω (15) was kindly provided by H. Krisch. pRR3ΔKan was described previously (10), and pEN102 is described elsewhere (3). Restriction analyses of plasmids from mycobacteria were done after electroporation in *E. coli*, as described by Baulard et al. (2).

Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, polynucleotide kinase, Klenow fragment and other DNA modifying enzymes were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), Pharmacia LKB, and New England Biolabs (Beverly, MA). All DNA manipulations were performed under standard conditions, as described by Sambrook et al. (16).

**Plasmid constructions.** pRC016 was constructed as follows. A 0.7-kb *Hind*II-*Hind*III DNA fragment containing the 5' region of the Km-resistance (Km<sup>r</sup>) gene from pUC4K was cloned into the corresponding sites in pBluescript SKII<sup>+</sup> to generate pRC002. A 2-kb *Hind*III fragment isolated from pHp45Ω and containing the Sm-resistance (Sm<sup>r</sup>) gene was cloned into the unique *Hind*III site of pRC002. The resulting pRC003 was then cut with *Eco*RV and *Bam*HI, and

religated with a 0.9-kb *NruI-BamHI* fragment from pUC4K containing the 3' region of the *Km<sup>r</sup>* gene. This plasmid, named pRC007, was then cut by *HindII*, and the 3.6-kb fragment was cloned into the filled-in *BamHI* site of the mycobacteria/*E. coli* shuttle plasmid pEN102 containing the mercury-resistance ( $\text{HgCl}_2^r$ ) genes. The resulting shuttle vector pRC016 therefore contains a disrupted *Km<sup>r</sup>* gene with a duplicated central 463-bp region that constitutes the target site for intra- or inter-molecular homologous recombination.

The construction of pStore4 was as follows. The complete BCG *hsp60* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from chromosomal DNA extracted from BCG. The oligonucleotides used had the following sequences : 5'-ATTGCGGACGGCCAAACCTACG-3' and 5'-CTCGCCGGGTCAGAAATCCAT-3'. The amplified product was then cloned into the *SmaI* site of pBluescript SKII<sup>+</sup> to generate pStore1. The promoter region of the *Km<sup>r</sup>* gene from Tn903 was eliminated by PCR using an oligonucleotide overlapping the ribosomal binding site (5'-TTCAATAACAAGGGGTGTTATGAGC-3') and one corresponding to sequences behind the stop codon (5'-TTCGAGGGAGGCCACGGTTGATGAG-3'). A transcriptional fusion between the *hsp60* gene and the *Km<sup>r</sup>ΔP* fragment was then generated by cloning this PCR product, previously phosphorylated, self-ligated and then digested with *EcoRI*, into the *EcoRI* site of pStore1. The resulting plasmid, named pStore2, was then digested with *XbaI* and *EcoRV*, blunt ended with Klenow fragment and purified on agarose. The purified 3-kb fragment containing the *hsp60-Km<sup>r</sup>ΔP* fusion was then ligated into the unique *ScaI* site of pMR002 to yield pStore3. The pMR002 shuttle vector is a pRR3ΔKan derivative in which the 2-kb *SmaI* fragment isolated from pHp45Ω and containing the *Sm<sup>r</sup>* gene was cloned into the unique blunt-ended *PstI* site. The 0.65-kb *BamHI* fragment which contains the promoter and the 5' end of the *hsp60* gene was then deleted from pStore3 to yield pStore4. In contrast to pStore3 and as expected, pStore4 did not confer *Km<sup>r</sup>* to *E. coli*, *M. smegmatis* or BCG.

**Preparation of mycobacterial DNA.** The mycobacteria were grown to late log phase in Sauton medium and then harvested by centrifugation at 6,000 × g

for 5 min. The pellet was weighed, resuspended in 10 % glycerol (1 ml/200 mg), aliquoted in 1-ml fractions, and centrifuged again at 6,000  $\times g$  for 10 min. The semi-dried mycobacterial pellets of approximately 200 mg were then submitted to 3 consecutive 10 sec microwave heatings (900 Watts) and resuspended into 1 ml buffer 1 (3% SDS, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 200  $\mu$ g/ml proteinase K). After the addition of 200 mg white Fontainebleau sand (grain size 150-210  $\mu$ m, Rhône-Poulenc, France) the suspension was vigorously shaken for 10 min, incubated for 30 min at 56°C, and then shaken for an additional 15 min. The suspension was then centrifuged for 15 min at 14,000  $\times g$ , and the supernatant was adjusted to 2 mM EGTA (final concentration). The DNA was then precipitated by the addition of 0.8 volume of isopropanol and 0.3 M sodium acetate (final concentration), and resuspended in 0.5 ml TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA). After heating the DNA solution for 5 min at 68°C one volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (49/49/2) was added, and the solution was vigorously mixed and then centrifuged at 14,000  $\times g$  for 10 min. One volume of water-saturated ether was added to the aqueous phase, and after mixing, the solution was centrifuged again at 14,000  $\times g$  for 5 min. Finally, sodium acetate (0.3 M final concentration) and 2.5 vol. ethanol were added to the aqueous phase and incubated at 4°C for at least 10 min. After centrifugation for 30 min at 14,000  $\times g$  the DNA was air dried, resuspended into 50  $\mu$ l TE and stored at -20°C until further use.

**Nucleotide sequence determination.** Nucleotide sequences were determined from double-stranded DNA by the dideoxyribonucleotide chain-termination method, using [ $\alpha^{35}$ S]-dCTP (1,000 Ci/mmol; Amersham France, Les Ulis, France) and the DNA T7 sequencing kit (Pharmacia LKB), as recommended by the supplier.

## RESULTS

**Intra-plasmid homologous recombination in *E. coli*.** To test the use of replicating plasmids for the detection of intra- or inter-plasmid homologous recombination, pRC016 was constructed. This plasmid contains a disrupted Km<sup>r</sup> gene with a 463 bp DNA duplication, separated by a 2-kb DNA fragment which contains the Sm<sup>r</sup> gene (see Fig. 1). As in addition pRC016 contains the HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> genes, transformants can be selected using mercury. Homologous recombination can then subsequently be detected by the resistance to Km, which can only occur through intra- or inter-plasmid homologous recombination as illustrated in Fig. 1.

Since one of the reasons for the apparent low levels of homologous recombination detected in previous studies could be related to the unusual nature of the *recA* gene of the members of the *M. tuberculosis* complex (5), we first tested pRC016 in *E. coli* in a RecA<sup>-</sup> background. Therefore, pRC016 was introduced into *E. coli* XL1-Blue, and the transformation mix was first incubated in 1 ml 2YT liquid medium in the presence of 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub>. After 30 min incubation at 37°C the bacteria were spotted in serial 10-fold dilutions onto LB agar plates supplemented either with 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub> or with 20 µg/ml Km. After overnight incubation at 37°C approximately 10,000-fold more HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> colonies were detected than Km<sup>r</sup> colonies. Five independent HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> colonies were picked and incubated for 2 h at 37°C in 1 ml LB containing 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub>, then spotted in 10-fold serial dilutions onto LB agar with or without 20 µg/ml Km or 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub>. After overnight incubation at 37°C the colonies were counted, and the results shown in Table 1 indicate that the recombination rates were in the range of 10<sup>-3</sup> to 2.10<sup>-4</sup>.

Plasmid DNA of 8 independent clones was then isolated and used to retransform *E. coli* XL1-Blue. All transformants were resistant to Km and sensitive to Sm, suggesting that intra-plasmid homologous recombination had occurred. Plasmid DNA from one colony of each transformed group was then

isolated and digested with *Hind*III or *Eco*RI. As shown in Fig. 2A, digestion with *Eco*RI resulted in the appearance of three fragments of 2.85, 3.4, and 5.6 kb in size. The first and the third fragments were also found in the original pRC016, whereas the middle fragment had replaced the original 2.75-kb and 3.25-kb fragments of pRC016. Digestion with *Hind*III resulted in 3 fragments of 5.95, 4.9, and 1.1 kb. Two additional *Hind*III fragments of 2 and 0.5 kb were detected in the original pRC016. These fragments originally contained the Sm<sup>r</sup> gene and the duplicated region of the Km<sup>r</sup> gene. Therefore, these restriction analyses confirmed that intra-molecular homologous recombination had occurred.

**Intra-plasmid homologous recombination in mycobacteria.** Since introduction of pRC016 into *E. coli* XL1-Blue already resulted in a significant proportion of recombined pRC016 conferring resistance to Km, transformation of *M. smegmatis* or *M. bovis* BCG with pRC016 prepared from *E. coli* XL1-Blue generated a background of approximately 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> Km<sup>r</sup> mycobacteria. To avoid this interference, 4 independent HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> clones were selected after transformation of *M. smegmatis* and BCG with pRC016. These clones contained the original pRC016 that had not undergone homologous recombination yet as determined by the elecroduction method. After cultivating these clones in liquid medium containing 10 µg/ml HgCl<sub>2</sub> for 7 days (BCG), or for 2 days (*M. smegmatis*), recombination events were numerated by counting the CFUs on Km-, or HgCl<sub>2</sub>-supplemented plates. The results are shown in table 2 for BCG. For both species approximately the same proportions (10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup>) of Km<sup>r</sup> colonies among the HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> colonies were obtained. The plasmid DNA of four independent Km<sup>r</sup> BCG colonies for each of the four original clones (16 total) was analyzed after electroporation using *Eco*RI digestion. As shown in Fig. 2B, all clones featured the same restriction pattern, which was indistinguishable from that previously observed after intra-molecular recombination in *E. coli* XL1-Blue (compare to Fig. 2A). All Km<sup>r</sup> clones were sensitive to Sm, confirming intra-molecular recombination of pRC016 in both BCG and *M. smegmatis* (Fig 1 A). These results

show that, similar to *E. coli* XL1-Blue, both fast- and slow-growing mycobacteria can undergo homologous recombination at high frequency.

**Homologous recombination between replicative plasmids and the chromosome in fast-growing and slow-growing mycobacteria.** The high levels of homologous recombination detected in both fast-growing and slow-growing mycobacteria when replicative plasmids are used compared to previous studies, suggest that replication increases the frequency by which plasmid-plasmid recombination is detected in mycobacteria. This encouraged us to adapt the concept to plasmid-chromosome recombination.

Even if the rate of homologous recombination between the plasmid and the chromosome is significantly lower than the transformation rate, the use of replicative plasmids offers three advantages over non-replicating plasmids. (i) Plasmid copy numbers higher than 1 increase the probability of recombination. (ii) Replicative plasmids allow for uncoupling of the transformation efficiency from the recombination efficiency, and the continued presence of the plasmid in the bacterial cell allows to detect even very rare events of recombination. (iii) Since homologous recombination has been suggested to occur during replication (20), the use of replicative plasmids should increase the recombination rate.

Although the use of replicating plasmids represents these theoretical advantages for the detection of even rare recombination events, conventional assays to select for recombination via replicative plasmids cannot be used. In conventional homologous recombination assays using suicide vectors the recombined clones are simply selected by their resistance to a marker that is introduced into the chromosome via the non-replicating plasmid. In contrast, selection for recombination using a replicative plasmid requires a recombination phenotype distinct form the transformation phenotype. Therefore, a system was developed where resistance to one compound was used to select for transformation, and resistance to another compound could only be detected when homologous recombination had occurred. The principle is

illustrated in Fig. 3. The two third 3' part of the BCG *hsp60* gene without its promoter was cloned in a Sm<sup>r</sup> *E. coli*/mycobacteria shuttle plasmid. The promoter-less Km<sup>r</sup> gene was inserted after the stop codon of the mycobacterial *hsp60* gene. It is not expressed in the replicative form of this plasmid, named pStore4, but it should be expressed after recombination occurred between the *hsp60* region of pStore4 and the homologous allele in the mycobacterial chromosome (Fig. 3). Thus, homologous recombination can easily be selected by plating pStore4-transformed bacteria on a Km-supplemented medium. We named this method Selection Technique Of Recombination Events (STORE).

First, the STORE system was tested in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. After electrotransformation with pStore4, approximately 10% of the Sm<sup>r</sup> clones were also resistant to Km. Electroporation experiments of Km<sup>r</sup> clones produced several hundred Sm<sup>r</sup> *E. coli*, but no Km<sup>r</sup> colonies were detected. This result showed that the Km<sup>r</sup> phenotype in *M. smegmatis* was not conferred by the plasmid as an autonomous replicon. Individual Km<sup>r</sup> *M. smegmatis* clones were then picked, cultivated in the presence of Km, and submitted 5 days later to PCR analysis using primers that only yield amplification products after the plasmid has recombined at the *hsp60* locus (Fig. 4A). The first PCR oligonucleotide (O-1) corresponded to the *hsp60* 5' chromosomal region, while the second one (O-2) hybridized to the plasmid DNA, such that only insertion of the plasmid at the *hsp60* locus generates an amplification product. A DNA fragment of the expected size was amplified from Km<sup>r</sup> *M. smegmatis* and partially sequenced from both ends, as shown in Fig. 4B. The sequence revealed a composite *M. smegmatis*-BCG *hsp60* gene confirming that recombination had occurred at the *hsp60* locus.

When the same experiment was conducted with BCG, several hundred Sm<sup>r</sup> clones were obtained but no Km<sup>r</sup> clone could be detected immediately after transformation. Four Sm<sup>r</sup> clones were then grown in liquid medium supplemented with Sm for 10 days and then plated onto Km-containing medium. Two weeks later, several hundred Km<sup>r</sup> colonies were observed. One

$\text{Km}^r$  clone from each plate was then grown in liquid medium containing  $\text{Km}$  and analyzed by PCR using the primers described above. As shown in Fig. 5, a 1.6-kb DNA fragment was amplified from all 4 BCG clones tested. Both ends of this DNA fragment from one of the four clones was sequenced to confirm that it corresponds to the *hsp60* DNA. No PCR product could be detected when untransformed BCG chromosomal DNA was used as a negative control, indicating that homologous recombination had occurred in all 4 analyzed clones. These results clearly show that homologous recombination between plasmids and the chromosome can be obtained at high frequency in slow-growing as well as in rapid-growing mycobacteria when replicative vectors are used.

## DISCUSSION

The rearrangement of DNA is one of the fundamental properties of life and is of great biological significance. Several different mechanisms can underlie DNA rearrangements. Among those, recombination between homologous sequences is shared by virtually all living organisms. Yet, homologous recombination has been difficult to bring to the fore in the *M. tuberculosis* complex. As one of the reasons for the previous lack of detectable homologous recombination in these organisms the unusual nature of their *recA* gene has been suggested (5). The *M. tuberculosis* RecA protein contains an internal sequence named intein that is removed by a novel mechanism of protein splicing (6). The RecA proteins of all the species of the *M. tuberculosis* complex as well as that of *Mycobacterium leprae* contain inteins (7), whereas it is lacking in RecA of *M. smegmatis*, a species in which significant levels of homologous recombination have been observed (8).

However, not all mechanisms of recombination between homologous sequences are *recA*-dependent (4). Recombination between tandem duplications can occur by a *recA*-independent slipped strand mispairing mechanism (11) or by a sister-strand exchange mechanism (12). However, these mechanisms are linked to DNA replication, and could not have been detected in previous approaches that made use of non-replicative suicide DNA to uncover homologous recombination in slow-growing mycobacteria. This assumption is supported by the very recently described use of replicating plasmids to detect homologous recombination in *M. bovis* BCG (14).

Besides allowing for the detection of *recA*-independent recombination, the use of replicative plasmids also enables us to uncouple the recombination events from the transformation step. After transformation of the *E. coli* *recA* mutant XL1-Blue with pRC016, a plasmid containing a tandem duplication of 463 bp in the *aph* gene separated by an approximately 2-kb intervening sequence containing a *Sm<sup>r</sup>* gene, *Km<sup>r</sup>* clones could be recovered that contained rearranged

plasmids which had undergone homologous recombination. The frequency of these events was estimated to be in the range of  $10^3$  to  $2.10^4$ . Similar rates were found for *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG, and restriction analyses of the recombined plasmids indicated that the rearrangement in mycobacteria were indistinguishable of those found in *E. coli* XL1-Blue. All the analyzed plasmids had undergone intra-molecular recombination, no inter-plasmid recombination was detected. This is consistent with the findings by Matfield et al. (13) that intra-molecular recombination may in some cases be much less *recA*-dependent than inter-molecular plasmid recombination.

Homologous recombination between replicating plasmids and the mycobacterial chromosome was also detected at significantly high levels using the STORE technology described in this paper. This technology uses the replication of plasmids to increase the detection frequency of homologous recombination into the chromosome, which therefore becomes independent of the transformation yield and can be easily selected for, even when the recombination rate is very low. The probability to detect homologous recombination increases with each generation, and the culture is progressively enriched in recombinant clones.

This is best described by the following mathematical model. The model has been simplified in that it only applies to irreversible homologous recombination between the plasmid and the chromosome. This approximation is justified by the fact that in the case of rare recombination events, the reversible recombination becomes negligible. The first recombination event becomes detectable when the number of cells (*c*) equals the inverse of the recombination rate ( $1/T$ ). This number depends on the number of generations (*n*) starting from a single cell in the following equation :

$$n = \log c / \log 2$$

If  $R_n$  is the measurable proportion of recombined molecules after *n* generations, then

$$\begin{aligned}
 R_n &= T && (\text{at the } n\text{th generation}) \\
 R_{n+1} &= T + (1-T)T && (\text{at the } n+1\text{ generation}) \\
 &= 1-(1-T)^2 \\
 R_{n+2} &= 1-(1-T)^2 + \{1-[1-(1-T)^2]\}T && (\text{at the } n+2\text{ generation}) \\
 &= 1-(1-T)^3 && \text{and} \\
 R_{n+x} &= 1-(1-T)^x && (\text{at the } n+x\text{th generation}).
 \end{aligned}$$

Since  $0 < T < 1$ , it follows that  $R > T$

If  $T < 0.01$ , then  $R_{n+x} \approx T \cdot x$ . In that case,  $R$  thus increases proportionally with the number of generations. In addition,  $R$  also increases proportionally with the copy number of the plasmid ( $y$ ) :  $R_{n+x} \approx T \cdot x \cdot y$ . Thus, this model shows that for any given rate of irreversible homologous recombination events the detectable proportion of recombined molecules increases with each generation provided that the recombination rate remains constant over time. This was observed here for both slow-growing and fast-growing mycobacteria. Over a period of 2 weeks we have observed a gradual enrichment of the mycobacterial cultures with  $Km^r$  colonies (not shown), indicating that, as expected, the probability of recombination of the plasmid into the chromosome is significantly higher than that of the reverse recombination. This allows one to detect homologous recombination events even in organisms that are still more refractory to homologous recombination or transformation than the myobacteria studied here. Therefore, this technology can also in principle be adapted to any procaryotic or eucaryotic cell refractory to classical suicide gene disruption techniques.

The use of a recombination phenotype different from the transformation phenotype as described here decreases the probability to obtain illegitimate recombination, since the STORE technology requires the presence of a functional promoter upstream of the homologous region. This is best achieved

by homologous recombination as shown here. Although previous reports indicated that illegitimate recombination was far more frequent than homologous recombination in slow-growing mycobacteria (9), we found that, by using the STORE technology, all  $\text{Km}^r$  clones of both *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG had undergone homologous recombination. Since *hsp60* sequences of BCG could recombine with those of *M. smegmatis*, a sequence identity of 100% is apparently not required. Interestingly, the introduction of mismatches have been found to drastically reduce *recA*-dependent homologous recombination in *E. coli* (21).

One advantage of this method is that the use of the STORE technology allows to detect homologous recombination even when the plasmid is still present in the bacterial cell as an autonomous replicon. In contrast, the method described by Norman et al. (14) requires the elimination of the plasmid and can therefore only be used in mycobacterial strains that carry recessive chromosomal resistance determinants to antibiotics such as isoniazid. Although isoniazid-resistant derivatives can easily be selected for many mycobacterial species and strains, the fact that this antibiotic is one of the most widely used anti-tuberculosis drugs limits the applicability of this approach. In principle, the STORE technology can be readily applied to any mycobacterial strain.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Amouyel and L. Lepage for help with the mathematical model, H. Krisch for pH45Ω, and T. Kieser for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. A. B. and L. K. were recipients of fellowships from the Région Nord-Pas de Calais. This work was supported by INSERM, Région Nord-Pas de Calais, Institut Pasteur de Lille, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and by an EEC grant (BIO2-CT93-0238).

## REFERENCES

1. Aldovini, A., R. N. Husson, and R. A. Young. 1993. The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **175**: 7282-7289.
2. Baulard, A., C. Jourdan, A. Mercenier, and C. Locht. 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electroporation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4105.
3. Baulard, A., L. Kremer, P. Supply, D. Vidaud, J.-M. Bidart, D. Bellet, and C. Locht. 1995. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. Submitted.
4. Bi, X., and L. F. Liu. 1994. *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* **235**, 414-423.
5. Colston, M. J., and E. O. Davis. 1994. Homologous recombination, DNA repair, and mycobacterial *recA* genes, p. 217-226. In B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Davis, E. O., P. J. Jenner, P. C. Brooks, M. J. Colston, and S. G. Sedgwick. 1992. Protein splicing in the maturation of *M. tuberculosis* RecA protein : a mechanism for tolerating a novel class of intervening sequences. *Cell* **71**: 201-210.
7. Davis, E. O., H. S. Thangaraj, P. C. Brooks, and Colston, M. J. 1994. Evidence of selection for protein introns in the RecAs of pathogenic mycobacteria. *EMBO J.* **13**: 699-703.
8. Husson, R. N., B. E. James, and R. A. Young. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 519-524.
9. Kalpana, G. V., B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1991. Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5433-5437.

10. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht. 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol* **177**: 642-653.
11. Levison, S., and G. A. Gutman. 1987. Slipped strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 203-221.
12. Lovett, S. T., P. T. Drapkin, V. A. Sutera, and T. J. Gluckman-Peskind. 1993. A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* **135**: 631-642.
13. Matfield, M., R. Badawi, and W. J. Brammar. 1985. *Rec*-dependent and *Rec*-independent recombination of plasmid-borne duplications in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 518-523.
14. Norman, E., O. A. Dellagostin, J. McFadden, and J. W. Dale. 1995. Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol. Microbiol.* **16**: 755-760.
15. Prentki, P., and H. Krisch. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Sauton, B. 1912. Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *Comptes Rend. Hebdo. Séances Acad. Sci. Paris* **155**: 860.
18. Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1911-1919.
19. Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)* **351**: 456-460.
20. Viret, J.F., A. Bravo, and J. C. Alonso. 1991. Recombination-dependent concatemeric plasmid replication. *Microbiol. Rev.* **55**: 675-683.

21. Watt, V. M., C. J. Ingles, M. S. Urdea, and W. J. Rutter. 1985. Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4768-4772.

TABLE 1. Homologous recombination of pRC016 in *E. coli* XL1-Blue

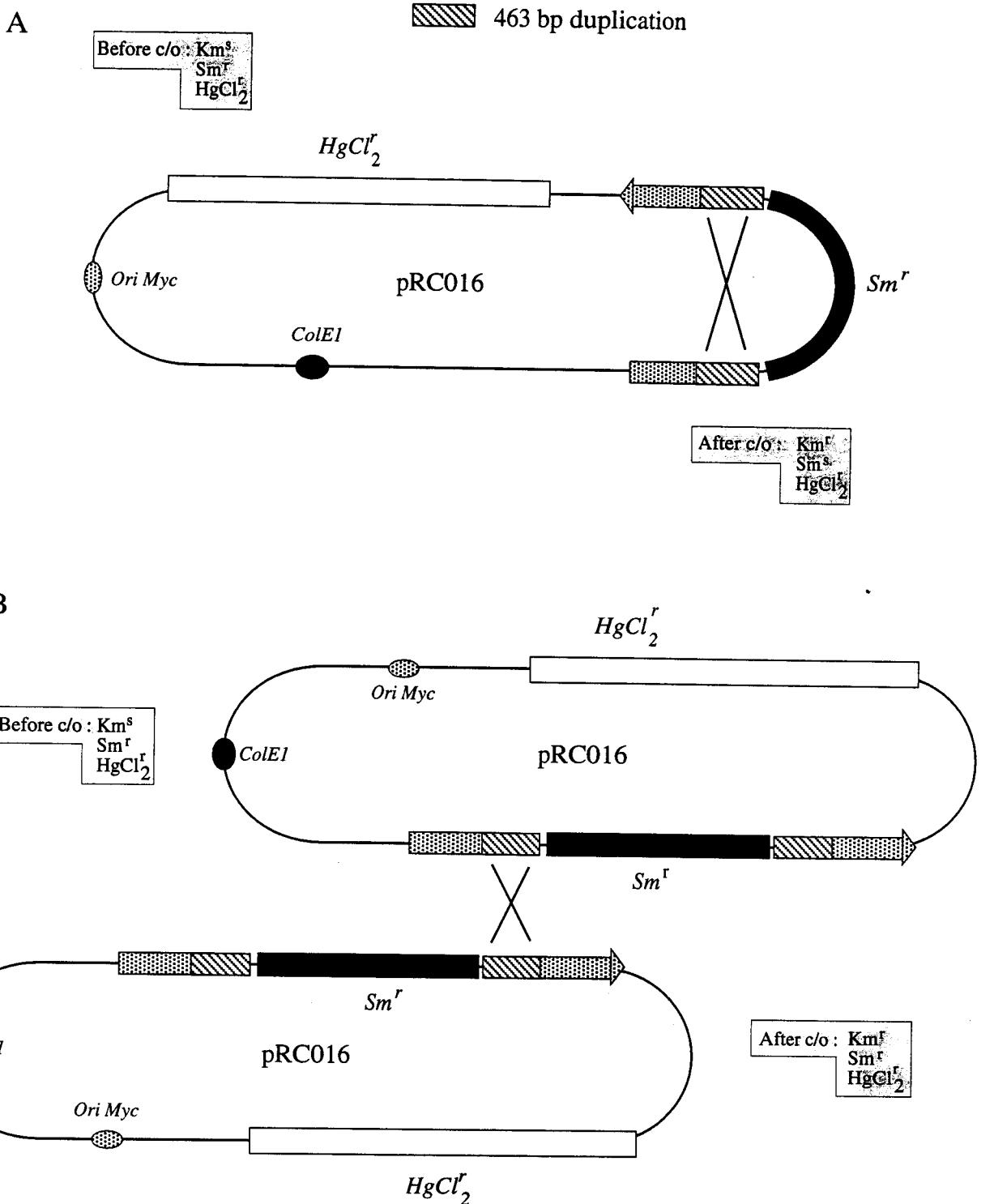
Medium	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
LB	$6 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$3.4 \cdot 10^5$	$2.2 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$
LB + HgCl <sub>2</sub>	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	$1.4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	$3.6 \cdot 10^5$
LB + Km	$6 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^2$	$1.4 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$

<sup>a</sup>Number of CFU in 1 µl of original culture.

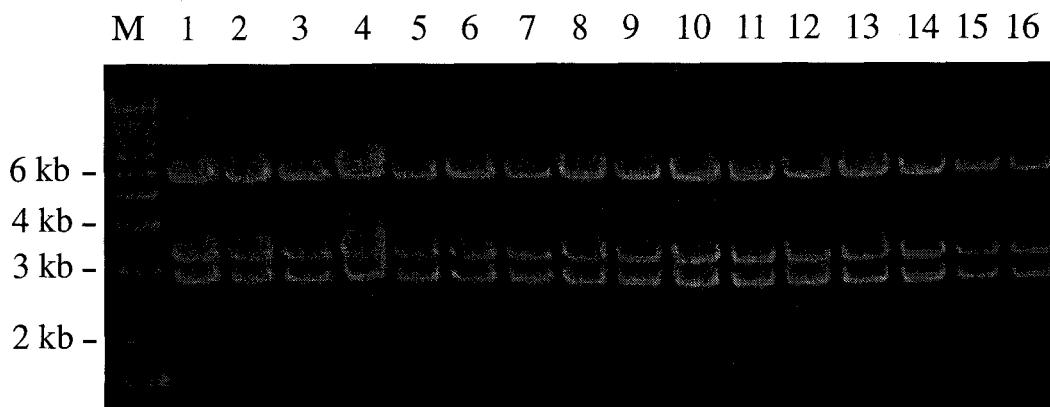
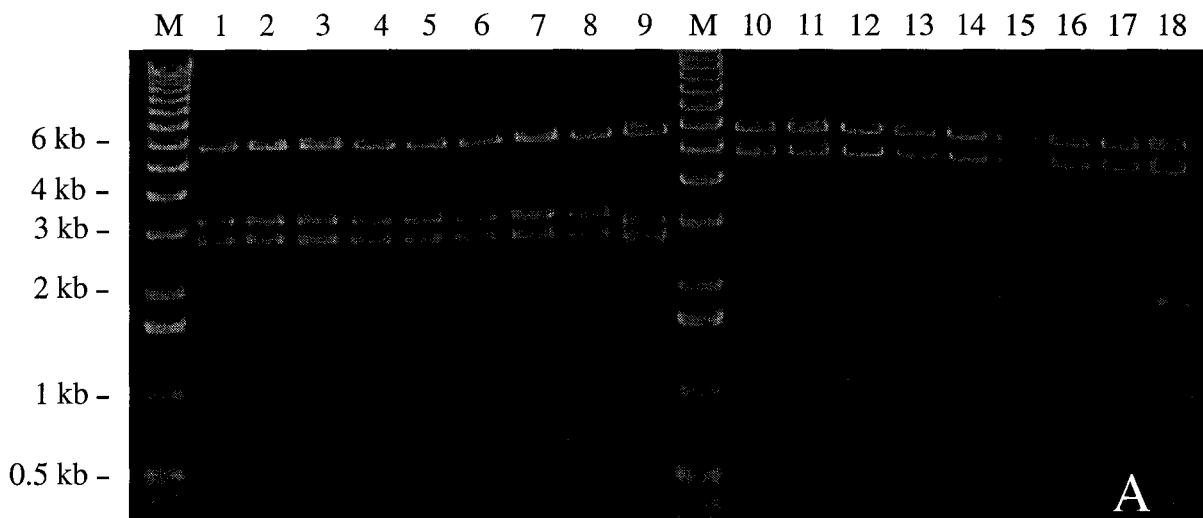
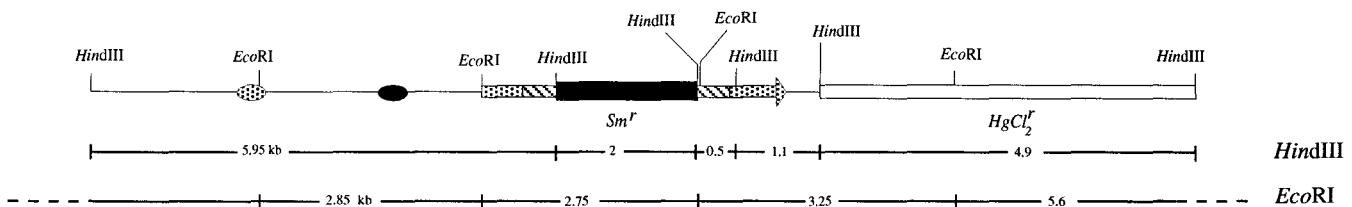
TABLE 2. Homologous recombination of pRC016 in BCG

Medium	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4
M7H10	$2.5 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$2.5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^5$
M7H10 + HgCl <sub>2</sub>	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$
M7H10 + Km	20	25	25	25

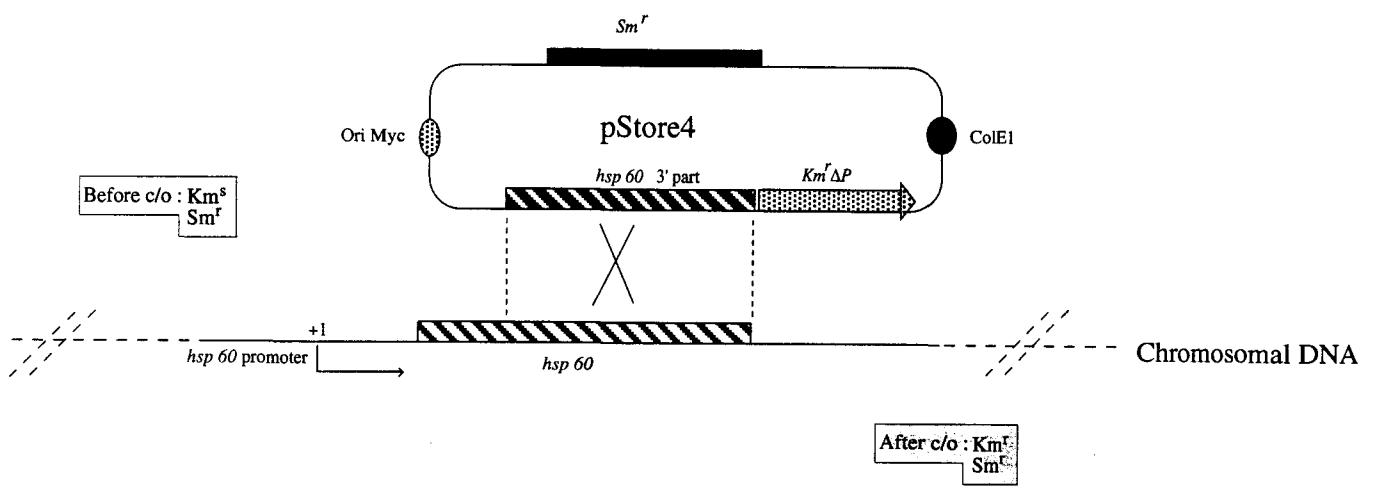
<sup>a</sup>Number of CFU in 1 µl of original culture.



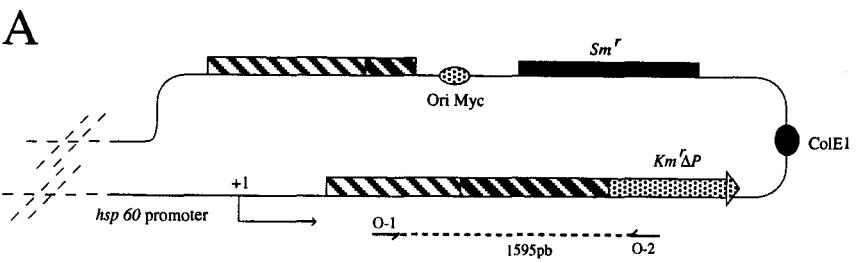
**FIG. 1.** Intra- and inter-plasmid homologous recombination. Two different recombination events can theoretically occur to create a functional Km<sup>r</sup> gene. Intra-molecular recombination of pRC016 (A) results in the loss of the Sm<sup>r</sup> gene, whereas inter-molecular recombination of pRC016 (B) retains the Sm<sup>r</sup> gene in the recombined plasmid. Both events maintain the HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> genes. The antibiotic-resistant and -sensitive phenotypes before and after recombination are indicated. The stippled arrow depicts the Km<sup>r</sup> gene containing 463 duplicated bp in the original plasmid shown by the hatched portion. The white box designates the HgCl<sub>2</sub><sup>r</sup> genes, and the black box the Sm<sup>r</sup> gene. The mycobacterial and ColE1 origins of replication are indicated by the stippled and black ovals, respectively.



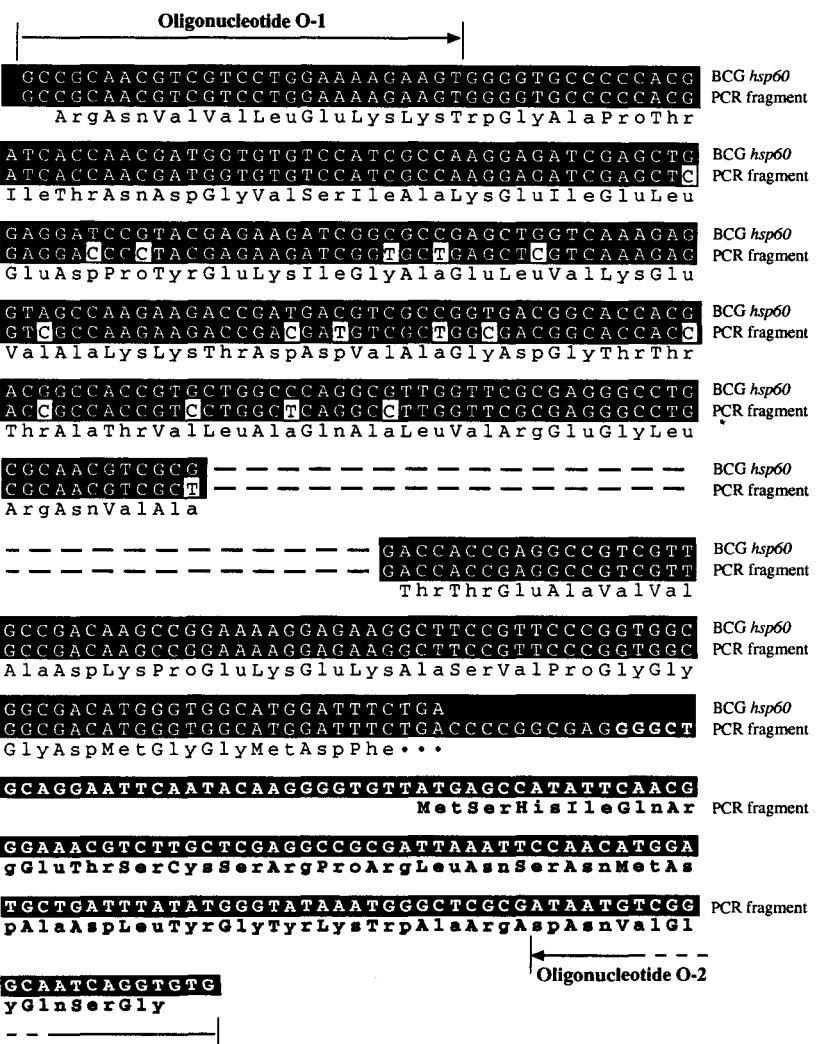
**FIG. 2.** Restriction analyses of recombined pRC016. The top drawing shows a linear restriction map of pRC016. Only *Hind*III and *Eco*RI sites are indicated. Symbols are as in Fig. 1. The numbers on the second and third lines represent the sizes of the DNA fragments expressed in kb and obtained after restriction of non-recombined pRC016 with *Hind*III and *Eco*RI, respectively. Panel A shows the *Eco*RI (lanes 1 to 8) and *Hind*III (lanes 10 to 17) restriction analyses of pRC016-derivatives that have recombined in *E. coli* XL1-Blue. Lanes 9 and 18 contain non-recombined pRC016 restricted with *Eco*RI and *Hind*III, respectively, and lanes M contain the size markers (1-kb ladder). Panel B shows the *Eco*RI restriction analyses of pRC016-derivatives that have recombined in BCG (lanes 1 to 16). Lane M contains the size markers (1-kb ladder).



**FIG. 3.** The STORE principle. The replicative form of pStore4 confers only *Sm*<sup>r</sup>. Homologous recombination between the 3' region of the *hsp60* gene on pStore4 (box hatched in black) with the homologous region in the chromosome (box hatched in white) will place the promoter-less *Km*<sup>r</sup> gene (*Km*<sup>r</sup>*ΔP*) under the control of the *hsp60* promoter in the chromosome. The antibiotic-resistant and -sensitive phenotypes before and after recombination are indicated. Symbols are as in Fig. 1.



**B**



**FIG. 4.** Integration of pStore4 into the *M. smegmatis* chromosome by homologous recombination. After integration of pStore4 into the *M. smegmatis* chromosome (A) the promoter-less *Km'* gene (*Km'ΔP*) is under the control of the *hsp60* promoter and therefore yields a *Km'* phenotype. After recombination had occurred a 1595-bp DNA fragment was amplified from the *M. smegmatis* chromosome using the oligonucleotides O-1 and O-2 as depicted by the respective small arrows.

These oligonucleotides had the following sequences : O-1, 5'-GCCGCAACGTCGCTGGAAAAGAAGT-3', and O-2, 5'-CACACCTGA-TTGCCCGACATTAT-3'. This DNA fragment could only be amplified after integration of pStore4 by homologous recombination. Symbols are as in Figs. 1 and 3. (B) Comparison of the partial sequence of the *M. smegmatis-M. bovis* *hsp60* hybrid gene obtained after PCR amplification with that of the *M. bovis* BCG *hsp60* gene. Both ends of the PCR-amplified 1595-bp DNA fragment were partially sequenced. The amino acid sequences are shown in the triple letter code. ... denotes the Stop codon. Nucleotide differences between the *M. smegmatis* and BCG *hsp60* genes are highlighted in white. All of them correspond to silent alterations. The bold letters correspond to the *Km'* gene fragment. The stippled line represents approximately 1.1 kb of unsequenced DNA. The position of the oligonucleotides O-1 and O-2 is indicated.

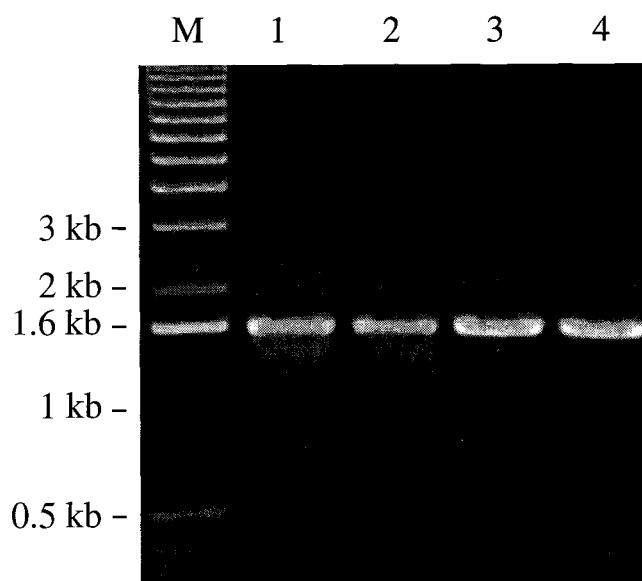


FIG. 5. PCR analysis of *M. bovis* BCG DNA after chromosomal integration of pStore4 by homologous recombination. PCR analysis was carried out on 4 independent Km<sup>r</sup> mycobacterial clones using the oligonucleotides depicted in Fig. 4 as O-1 and O-2. All four clones yielded an approximately 1.6-kb DNA fragment (lanes 1-4). Lane M contains the size markers (1-kb ladder).

Septième partie:

**DISCUSSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

Le BCG est aujourd'hui le vaccin le plus administré à l'échelle planétaire. Au vu des multiples avantages qu'il offre (Bloom, 1989), il constitue un vecteur vaccinal attrayant pour l'expression d'antigènes hétérologues afin de lutter contre divers pathogènes simultanément. Cependant, la manipulation génétique des mycobactéries requiert le développement d'outils moléculaires spécialement adaptés au genre *Mycobacterium*, particulièrement réfractaires aux techniques de biologie moléculaire.

Ces outils comprennent essentiellement des signaux d'expression, de sécrétion, des gènes rapporteurs adéquats, des marqueurs de résistance ne faisant pas appel aux antibiotiques et des systèmes d'intégration de l'information génétique exogène dans le chromosome bactérien.

Etant donné que la sécrétion de OspA chez le BCG a conduit à une réponse humorale anti-OspA plus importante que l'expression cytoplasmique de l'antigène (Stover *et al.*, 1993), nous avons opté, dans un premier temps, pour la sécrétion de la Sm28GST.

Cependant, peu de signaux d'expression et de sécrétion ont été étudiés chez les mycobactéries. Dès lors, nous avons entrepris la caractérisation et l'évaluation des signaux d'expression et d'exportation de l'antigène 85A de *M. tuberculosis* (Borremans *et al.*, 1989) pour exprimer et sécréter la Sm28GST chez le BCG.

## Expression de la Sm28GST sous contrôle des signaux de l'antigène 85A

### *Analyse du promoteur 85A*

L'antigène 85A est un des antigènes majeurs exportés chez les mycobactéries (Wiker and Harboe, 1992). Les patients tuberculeux ou lépreux ainsi que les souris vaccinées avec du BCG développent une réponse cellulaire et humorale dirigée contre les protéines du complexe 85. Par ailleurs, Lee and Horwitz (1995) ont montré par analyse sur gel à deux dimensions, que certains membres de la famille du complexe 85 étaient produits en grande quantité par *M. tuberculosis* internalisé dans le macrophage. Toutes ces évidences démontrent la fonctionnalité du promoteur 85A *in vivo* et *in vitro*.

Dans le but de pouvoir utiliser les signaux d'expression et de sécrétion de l'antigène 85A pour la production d'antigènes hétérologues chez le BCG, nous avons d'abord caractérisé ces signaux. Nous avons construit un vecteur d'expression/sécrétion dans lequel le gène codant la phosphatase alcaline d'*E. coli* (*phoA*) a été placé sous le contrôle des séquences du promoteur et du peptide signal 85A. Une cartographie fine du promoteur a été obtenue par délétions récurrentes de la région promotrice. Des réductions progressives d'activité PhoA ont pu être corrélées à ces délétions. La perte totale d'activité a été associée à des délétions dans une zone minimale nécessaire à l'activité promotrice. Cette zone comporte environ 70 pb situées en amont du nucléotide d'initiation de la transcription. Ce dernier a été identifié par la technique d'extension d'amorce. D'autre part, et de manière similaire à certains promoteurs de *Streptomyces*, des mutations d'insertion ou de délétion à l'intérieur même du promoteur indiquent que la position de la région -35 n'est pas critique pour l'obtention d'une transcription efficace. La séquence de la région -10 du promoteur 85A ne montre aucune similitude avec celle d'*E. coli*. C'est peut-être la raison pour laquelle ce promoteur n'est pas fonctionnel chez *E. coli*.

Les résultats obtenus montrent également qu'une fraction importante de PhoA n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire et reste associée à la paroi mycobactérienne. La même

observation a été faite par Wiker and Harboe (1992) concernant l'antigène 85A entier.

#### *Expression/sécrétion de la Sm28GST*

Dans un deuxième temps, les signaux de l'antigène 85A ont été utilisés pour permettre l'expression et l'exportation de la Sm28GST de *S. mansoni*.

Les résultats obtenus avec la Sm28GST montrent que la protéine peut être produite et sécrétée dans le milieu de culture. Toutefois, les niveaux d'expression et de sécrétion apparaissent être relativement faibles. Les expériences d'immunisation chez la souris avec la souche recombinante montrent qu'une réponse cellulaire spécifique mais de faible amplitude est obtenue. Seuls les protéines solubles de l'oeuf (SEA), la Sm28GST entière et le peptide 65-86, et sont capables de restimuler *in vitro* les cellules ganglionnaires. Par ailleurs, cette réponse semble être restreinte à l'haplotype H-2d. Aucune réponse n'a été observée dans les haplotypes H-2b et H-2k. D'autre part, aucune réponse humorale spécifique n'a pu être détectée chez les souris immunisées.

Deux raisons majeures pouvaient expliquer le faible taux de production de la Sm28GST par cette souche recombinante. La Sm28GST est une protéine à localisation intracellulaire chez le parasite et pourrait donc présenter des difficultés à être sécrétée chez le BCG, ce qui peut se traduire par une chute de son propre taux d'expression. En effet, chez les procaryotes, la traduction et l'exportation sont souvent couplées (Pugsley, 1993). D'autre part, même si cet antigène est un des composants majeurs exportés chez les mycobactéries, les signaux d'expression de l'antigène 85A ne sont pas efficaces pour produire suffisamment d'antigène. On ne peut cependant pas exclure que le fragment d'ADN cloné en amont du gène codant la Sm28GST ne contienne pas toute l'information nécessaire à une expression optimale *in vivo*.

Afin de savoir si le faible niveau d'expression de la Sm28GST pouvait être lié à sa difficulté intrinsèque à être sécrétée, nous avons évalué le taux d'expression et de sécrétion de la hCG $\beta$ , un antigène

tumoral humain naturellement sécrété (voir ci-dessous). Les résultats obtenus montrent que cet antigène est produit et sécrété à haut niveau chez le BCG. Ceci semble donc indiquer que le faible taux d'expression et de sécrétion est lié à la nature même de la Sm28GST.

L'étude réalisée avec la hCG $\beta$  montre non seulement que le faible niveau d'expression/exportation pourrait être lié à la nature de l'antigène, mais elle ouvre également une nouvelle voie immunothérapeutique, notamment pour le traitement du cancer de la vessie.

Les cancers de la vessie représentent la cinquième cause de cancer chez l'homme dans les populations occidentales. En France, 8 000 à 10 000 nouveaux cas par an sont diagnostiqués chaque année. Cette maladie atteint préférentiellement les sujets âgés de plus de 50 ans avec un pic de prévalence dans la tranche d'âge de 60-70 ans.

Au cours des dernières années, de nombreuses tentatives destinées à développer les défenses immunitaires de patients contre leur cancer ont été entreprises. Les essais ont été généralement décevants, conduisant le plus souvent à une réaction inflammatoire locale sans effet net sur le rejet de la tumeur. L'utilisation du BCG dans le traitement des tumeurs superficielles de la vessie s'est révélée être l'une des seules immunothérapies efficaces (Sharma and Prescott, 1994).

La hCG $\beta$  a récemment été identifiée comme antigène marqueur spécifiquement exprimé lors de la transformation maligne des cellules urothéliales. Cette molécule pourrait donc représenter un antigène cible pour une immunothérapie spécifique des tumeurs (Marcillac *et al.*, 1992).

Il a été montré que le BCG était capable d'être internalisé par les cellules tumorales de la vessie (Rouas *et al.*, 1992). De ce fait, le BCG recombinant exprimant la hCG $\beta$  devrait permettre l'expression de la hCG $\beta$  ou de peptides dans la cellule tumorale, amplifiant ainsi les mécanismes de présentation de ces antigènes aux lymphocytes T. Des tests de

cytotoxicité *in vitro*, réalisés en collaboration avec l'équipe du Professeur Bellet à l'Institut Gustave Roussy (France), sont actuellement en cours. Ils nous permettront de savoir si le BCG recombinant infectant des cellules tumorales est capable d'activer des cellules T cytotoxiques spécifiques de la hCG $\beta$  et d'engendrer un processus de lyse des cellules tumorales.

#### *Marqueurs de résistance au mercure*

L'instabilité naturelle de la plupart des répliques plasmidiques nécessite de maintenir une pression de sélection constante sur les bactéries transformées. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont fréquemment employés pour maintenir cette pression de sélection. Gormley *et al.* (1991) ont montré que la conjugaison pouvait être un mécanisme de transfert horizontal de gènes vers les mycobactéries. Ainsi, l'utilisation de gènes de résistance aux antibiotiques est à éviter pour le développement d'un BCG recombinant à usage vaccinal. Ce point est d'autant plus important que les mycobactéries sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques, ce qui restreint considérablement la gamme d'antibiotiques pour le traitement de la tuberculose.

Pour éviter d'avoir recours à des marqueurs de résistance aux antibiotiques, nous avons développé des marqueurs de résistance à des dérivés mercuriels. Ils permettent la sélection de souches mycobactériennes recombinantes et éliminent tout risque de dissémination de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. En collaboration avec l'équipe du Professeur Trees au Liverpool School Tropical Medicine (Grande-Bretagne), nous avons entamé une étude de stabilité des souches de BCG renfermant ces plasmides chez le mouton.

Hormis la résistance au mercure qu'ils confèrent, les trois plasmides mycobactériens construits contiennent les signaux d'expression et de sécrétion de l'antigène 85A. Ces trois constructions permettent un clonage rapide et en phase de gènes codant des protéines hétérologues pour leur expression et leur sécrétion chez les mycobactéries. De plus, ces vecteurs contiennent des sites de restriction

uniques permettant de substituer très aisément les cassettes contenant les signaux d'expression de l'antigène 85A par d'autres signaux d'expression.

L'usage de nouveaux marqueurs, tels que des marqueurs d'auxotrophie, pourraient également constituer une alternative intéressante. Une série de mutants auxotropes ont été obtenus récemment chez *M. smegmatis* à l'aide du transposon Tn610. (Guilhot *et al.*, 1994). Cependant, cette technologie est difficile à maîtriser chez les mycobactéries à croissance lente car elle nécessite la production d'un nombre important de mutants d'insertion, parmi lesquels des auxotropes devront être isolés. De plus, des nouveaux mutants auxotropes devront être recherchés pour le développement de chaque nouvelle souche mycobactérienne.

### Expression et immunogénicité de la Sm28GST sous contrôle du promoteur *hsp60*

#### *Formes sécrétée et cytoplasmique de la Sm28GST*

Afin de confirmer la difficulté de sécrétion de la Sm28GST chez le BCG et de son impact sur le niveau d'expression, nous avons développé un autre système d'expression. Dans cette seconde série de constructions, destinée à augmenter l'immunogénicité du BCG recombinant exprimant la Sm28GST, nous avons développé deux souches de BCG exprimant l'antigène parasitaire sous le contrôle du promoteur *hsp60*, en présence ou en absence du peptide signal 85A. Le taux d'expression de l'antigène est très élevé lorsque celui-ci est produit dans le compartiment cytoplasmique du BCG. Par contre, le taux d'expression de la Sm28GST chez le BCG chute drastiquement lorsqu'on force la sécrétion de l'antigène. Ces résultats confirment donc l'hypothèse précédente selon laquelle la sécrétion de la Sm28GST diminue son propre taux d'expression. Par ailleurs, il a été montré que la Sm28GST était systématiquement réfractaire à la sécrétion chez le virus de la vaccine recombinant (R. Pierce, communication personnelle) ou chez une souche de *Bordetella pertussis* recombinante (Renauld *et al.*, 1995). Ceci n'est pas sans précédent. En effet, d'autres protéines à localisation cytoplasmique, telle que la  $\beta$ -galactosidase, présentent également des difficultés à être sécrétées. Moreno *et al.* (1980) ont

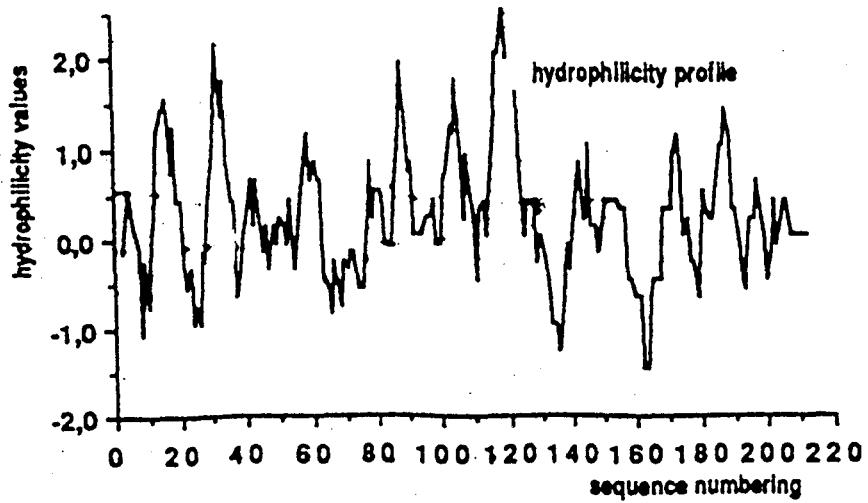


Figure 5: Profil d'hydrophilicité de la Sm28GST. D'après Auriault *et al.* (1988).

montré que le peptide signal de la protéine lamB ne parvient pas à exporter la  $\beta$ -galactosidase chez *E. coli*.

Des méthodes de prédition de structure ont permis d'établir des profils de mobilité, d'accessibilité et d'hydrophilicité de la Sm28GST (Auriault *et al.*, 1988). La Figure 5 montre le profil d'hydrophilicité de la protéine. Hormis la présence de régions hydrophiles, dont les séquences ont été choisies pour la synthèse des peptides correspondants, la Sm28GST renferme plusieurs régions hydrophobes. Ces zones hydrophobes pourraient fonctionner comme éléments d'arrêt de translocation membranaire et empêcher l'exportation de l'antigène à travers la paroi mycobactérienne.

La nécessité d'avoir un site actif fonctionnel constitue un élément très important pour générer la production d'anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST. Les travaux de Xu *et al.*, (1991) ont permis de relier l'inhibition de l'activité GST à une réduction de la ponte et de la viabilité des oeufs. Afin de savoir si la protéine recombinante produite chez le BCG est enzymatiquement active, la Sm28GST a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une matrice de glutathion-agarose, puis utilisée dans un test enzymatique. Les résultats obtenus montrent que la protéine produite par le BCG est enzymatiquement identique à celle produite dans la levure. Ils indiquent également que la protéine conserve sa structure tridimensionnelle dans le BCG, du moins dans la région impliquée dans la catalyse enzymatique. Au contraire, la Sm28GST produite sous la forme d'une fusion avec TetC (Khan *et al.*, 1994a) n'est pas enzymatiquement active, peut-être à cause de l'encombrement stérique procuré par TetC.

#### *Analyse de la réponse humorale*

Afin d'établir la voie d'immunisation la plus appropriée à induire une réponse humorale neutralisante, des souris ont été immunisées et soumises à un rappel par différentes voies (i.v., i.p., s.c., et i.n.) avec le BCG recombinant exprimant la Sm28GST sous forme cytoplasmique. L'analyse des sérum par immunoempreinte et par ELISA a

montré qu'une seule administration de BCG est suffisante pour induire une réponse humorale anti-Sm28GST, tout particulièrement après immunisation par voie i.v. ou i.p. Le rappel avec la même souche recombinante s'accompagne d'une importante augmentation de la réponse humorale contre l'antigène parasitaire. Par ailleurs, la réponse s'avère être très stable dans le temps, pendant au moins un an après la première immunisation. De plus, les anticorps présents dans ces sérum reconnaissent la protéine native dans les extraits bruts du parasite. Il est également intéressant de noter que la voie i.n. génère la plus faible réponse anti-Sm28GST, mais elle induit la plus forte réponse dirigée contre les antigènes du BCG.

D'autre part, la qualité idiotypique de la réponse contre les antigènes de BCG varie significativement en fonction des voies d'immunisation. Des études de colonisation de la souche recombinante ont montré qu'après administration nasale le BCG se retrouve majoritairement au niveau des poumons, tandis qu'après administration par voie i.p., il se retrouve essentiellement au niveau hépatique et splénique. Ces différentes compartmentalisations pourraient expliquer les différences idiotypiques générées contre les antigènes du BCG. La diversité de ce répertoire pourrait également être liée au type cellulaire infecté par la mycobactéries. Un macrophage alvéolaire ne présente peut-être pas les antigènes mycobactériens ou la Sm28GST de la même manière qu'un monocyte circulant.

Les différentes voies d'immunisation génèrent également des profils isotyptiques distincts contre la Sm28GST. Les immunisations i.n. ou i.v. mènent à une production initiale importante d'IgG2a et peu d'IgG1 et d'IgG2b, c'est à dire à profil de type Th1. Au contraire, les voies i.p. et s.c. mènent plutôt une réponse mixte caractérisée par la co-induction d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b. Ce type de réponse est particulièrement recherché puisqu'une protection efficace contre la schistosomiase requiert à la fois les composantes cellulaire (Th1) et les composantes humorale (Th2) du système immunitaire (voir introduction générale). Par ailleurs, des niveaux comparables d'IgA sériques sont obtenus quelque soit le mode d'administration utilisé. L'induction d'anticorps de

type IgA est particulièrement intéressante dans la mesure où une étroite corrélation entre le taux d'IgA et l'acquisition d'une résistance à la réinfection a été montrée dans la schistosomiase humaine (Grzych *et al.*, 1993).

De plus, des souris immunisées et soumises à un rappel par voie i.p. avec le BCG recombinant développent des anticorps capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST *in vitro*. Au contraire, la souche de *S. typhimurium* exprimant la protéine de fusion TetC/Sm28GST n'est pas capable d'induire la production d'anticorps neutralisants contre la Sm28GST. De plus, la protection liée à l'utilisation de cette souche de *S. typhimurium* ne s'accompagne que d'une réduction de la charge parasitaire mais pas d'un effet anti-fécondité des vers femelles. La propriété d'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST présente un intérêt considérable car Grzych *et al.* (1993) ont montré que des anticorps neutralisants réduisaient significativement la fécondité des vers femelles ainsi que la viabilité des oeufs dans la schistosomiase humaine. Ainsi, par sa capacité à induire une réponse neutralisante après son administration dans les souris, le BCG recombinant pourrait avoir un effet sur la fécondité des vers et sur la viabilité des oeufs. Des expériences de protection réalisées chez la souris sont actuellement en cours et nous permettront de valider cette hypothèse. Si tel est le cas, le BCG recombinant présenterait un avantage certain sur la Salmonelle recombinante.

Les courbes de numération du germe chez des souris immunisées avec une seule dose de BCG recombinant indiquent que le microorganisme persiste pendant environ 16 semaines dans l'organisme. Cette durée de vie prolongée, due à sa faculté d'adaptation et de survie chez l'hôte, permet sans doute de délivrer régulièrement l'antigène recombinant et donc de stimuler en permanence le système immunitaire. Cette stimulation continue est sans doute à l'origine de la stabilité de la réponse observée.

#### *Immunité mucosale*

Dans plusieurs pays, le BCG est administré par voie intradermique dès la naissance. Cependant, les premières vaccinations

ont été réalisées par voie orale. Du fait de la sensibilité du BCG au pH acide de l'estomac (Gaudier et Gernez-Rieux, 1962), la vaccination orale nécessite des doses 10 à 100 fois supérieures par rapport à celles nécessaires à la vaccination intradermique. Ces doses massives de BCG ont été responsables d'un nombre inacceptable de cas d'adénites, ayant pour conséquence l'abandon de la vaccination orale en 1976 (Barletta *et al.*, 1990). L'immunisation orale de souris avec un BCG recombinant exprimant *lacZ* a conduit à une importante réponse IgA anti- $\beta$ -galactosidase dans les sécrétions intestinales (Lagranderie *et al.*, 1993b). Ces résultats indiquent qu'une immunisation par voie orale peut induire une réponse mucosale spécifique dirigée contre l'antigène hétérologue. Des expériences d'immunisation par voie orale avec le BCG exprimant la Sm28GST n'ont cependant donné lieu à aucune réponse, ni sérique, ni mucosale (résultats non publiés). L'absence même d'une réponse sérique dirigée contre les antigènes du BCG suggère que celui-ci n'a pas eu le temps de stimuler le système immunitaire avant d'être éliminé par l'organisme, probablement à cause de la grande sensibilité du BCG aux attaques acides de l'estomac. De nouvelles méthodes d'encapsidation des préparations vaccinales pourraient être développées pour délivrer le BCG de manière optimale au niveau du système digestif. Des approches génétiques destinées à développer des souches résistantes à un pH acide pourraient également être entreprises.

La voie d'administration nasale peut constituer une alternative intéressante à la voie orale. Langermann *et al.* (1994a) ont montré que l'immunisation par voie i.n. de BCG recombinant exprimant OspA induit chez la souris une importante réponse mucosale anti-OspA au niveau des sécrétions alvéolaires. Une immunisation par voie i.n. de BCG recombinant exprimant la Sm28GST est associée à une forte charge bactérienne au niveau des poumons. Pour cette raison, la voie i.n. a été utilisée pour mettre en évidence la présence d'IgA anti-Sm28GST dans les sécrétions alvéolaires. Des résultats préliminaires ont montré la présence d'une quantité significative d'IgA dirigés contre la Sm28GST dans ces sécrétions après une immunisation par voie nasale. Par contre, aucune réponse similaire n'a été observée après une immunisation par voie i.v. La voie i.n. paraît donc être particulièrement efficace pour induire des réponses mucosales au niveau pulmonaire.

Un BCG recombinant administré par voie i.n. pourrait être utile pour lutter contre des agents infectieux pénétrant dans l'organisme par voie aérienne. De plus, la formulation intranasale du BCG recombinant permet d'éviter l'usage de seringues (souvent sources de contaminations) et faciliterait grandement les campagnes de vaccination, notamment dans les PVD (Barletta *et al.*, 1990).

L'ensemble de ces résultats démontre la capacité du BCG à induire une réponse spécifique et prolongée dirigée contre la Sm28GST, à la fois systémique et locale. Il montre également que l'intensité et la qualité de la réponse immunitaire dépendent non seulement du protocole d'immunisation mais également du mode de présentation de l'antigène (sécrété ou produit sous forme cytoplasmique) et sans doute du système d'expression utilisé (force du promoteur). Tous ces éléments sont à prendre en compte pour chaque nouvel antigène à tester, puisqu'ils dépendent étroitement de la nature de l'antigène. Pour améliorer l'immunogénicité du système ou pour cibler un type de réponse immunitaire spécifique, d'autres approches peuvent également être abordées. La recherche de promoteurs mycobactériens inductibles *in vivo* dans l'hôte infecté constitue probablement une approche de choix. De tels promoteurs inductibles *in vivo* ont déjà prouvé leur efficacité chez *S. typhimurium* (Hohmann *et al.*, 1995) (voir ci-après).

### **Intégration d'ADN dans le chromosome mycobactérien par recombinaison homologue**

L'administration à la souris de souches de BCG renfermant des plasmides autoréplicatifs indique que ces derniers peuvent être maintenus suffisamment longtemps dans le BCG pour induire une forte réponse immune, même en l'absence de pression de sélection. Cependant, une stabilisation définitive de l'information exogène dans le chromosome mycobactérien constituerait une alternative préférable à l'usage de ces répliques.

Une intégration stable de l'information dans le chromosome peut être générée chez de nombreux microorganismes par recombinaison homologue. Malheureusement, la recombinaison homologue a constitué jusqu'à très récemment un objectif quasiment insurmontable chez les mycobactéries à croissance lente. L'utilisation de vecteurs suicides pour intégrer de l'ADN au sein du chromosome des mycobactéries à croissance lente donne des résultats peu satisfaisants (Aldovini *et al.*, 1993). Norman *et al.* (1995) ont récemment décrit une méthode d'intégration par recombinaison homologue en utilisant des plasmides autoréplicatifs. Cependant, cette approche requiert l'usage de souches réceptrices résistantes à l'isoniazide. Elle présente donc peu d'intérêt pour la construction de vecteurs de vaccination vivants.

Une première partie de notre travail a consisté à évaluer la fréquence des phénomènes de recombinaison homologue chez le BCG et chez *M. smegmatis*. Dans ce but, nous avons utilisé les molécules autoréplicatives comme substrat. Les résultats obtenus indiquent qu'un taux relativement élevé de recombinaison homologue peut être obtenu chez ces deux espèces mycobactériennes. La seconde partie de ce travail a consisté à mettre en place un système destiné à favoriser la recombinaison entre un plasmide et le chromosome mycobactérien. Généralement, les plasmides autoréplicatifs ne sont pas employés pour intégrer de l'information exogène dans le chromosome d'un microorganisme. La stratégie STORE développée dans ce travail permet par un mécanisme de simple sélection de différencier les formes autoréplicative et intégrée d'un plasmide. En outre, cette technologie nous a permis d'intégrer un plasmide dans le locus *hsp* de *M. smegmatis* et du BCG.

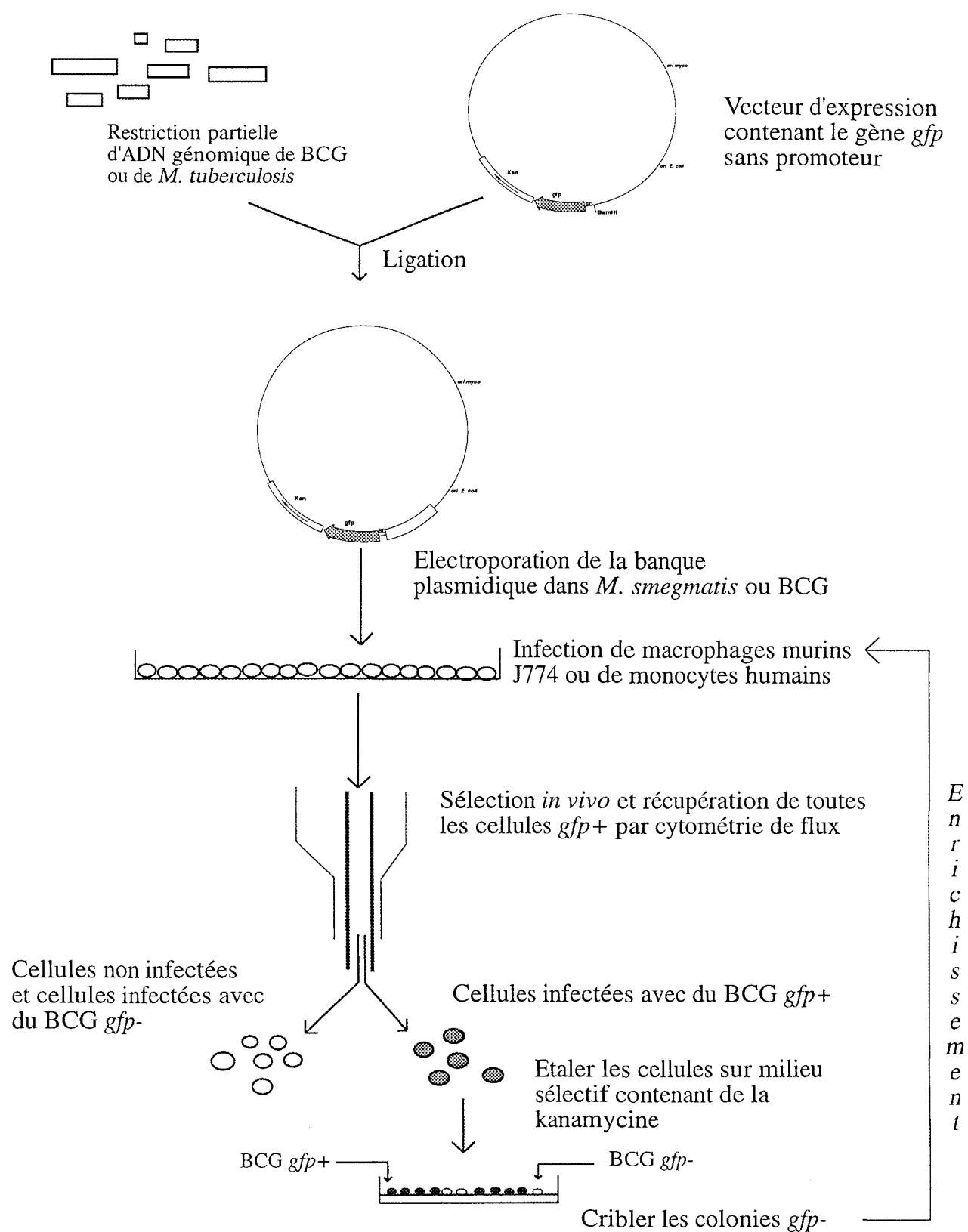
L'avantage supplémentaire offert par STORE est que l'expression d'un gène d'intérêt vaccinal peut être activée au moment de l'événement de recombinaison. En effet, il n'est plus nécessaire de munir le gène d'intérêt de signaux de transcriptions propres, puisque la transcription se fait au départ du promoteur du gène chromosomique cible de la recombinaison.

Enfin, la technologie STORE constitue un outil puissant pour interrompre des gènes directement dans le chromosome des mycobactéries. L'interruption de gènes mycobactériens est particulièrement utile pour aider à déterminer la fonction de certains gènes. STORE pourrait également servir à inactiver des gènes de virulence potentiels identifiés par exemple à l'aide du système utilisant la GFP (voir ci-après) et ainsi apporter une aide très précieuse à la compréhension des mécanismes de la virulence et de la pathogénie mycobactérienne. Par ailleurs, en inactivant un ou plusieurs gènes particuliers, cette méthode pourrait aboutir à la création de nouvelles souches mycobactériennes atténuées, plus efficaces que le BCG, pour vacciner contre la tuberculose.

### **La GFP et ses applications en mycobactériologie**

L'identification de nouveaux promoteurs et l'étude des mécanismes de la régulation génétique ont bénéficié considérablement de l'aide apportée par les gènes rapporteurs. Chez les mycobactéries, plusieurs gènes rapporteurs ont déjà été documentés, dont *lacZ* (Timm *et al.*, 1994), le gène *cat* codant la chloramphénicol acétyltransférase (Das Gupta *et al.*, 1993), le gène *phoA* codant la phosphatase alcaline d'*E. coli* (voir article 1, et Lim *et al.*, 1995), le gène *lux* codant la luciférase (Jacobs *et al.*, 1993) et le gène *xylE* de *Pseudomonas putida* codant une catéchol 2, 3-dioxygénase (Curcic *et al.*, 1994). Notre travail apporte un élément nouveau à la liste des outils moléculaires utilisés en mycobactériologie. Il est basé sur l'utilisation de la "Green Fluorescent Protein" (GFP). Ce marqueur est particulièrement intéressant dans la mesure où sa détection ne nécessite ni substrat ni cofacteur exogènes. Notre étude décrit l'expression de la GFP sous contrôle du promoteur *hsp60*, et son utilisation chez *M. smegmatis* et chez le BCG. L'expression du phénotype fluorescent dans les bacilles est très facilement visualisable sur milieu solide.

Par ailleurs, les mycobactéries recombinantes internalisées dans des macrophages sont aisément visualisées par microscopie à fluorescence dans les cellules, dans des coupes histologiques de poumons, de rate ou de foie provenant de souris infectées. Enfin, des macrophages infectés ou des



**Figure 6:** Sélection de gènes mycobactériens spécifiquement induits *in vivo*.

mycobactéries en suspension peuvent également être détectées et analysées par cytométrie de flux.

Ce marqueur constitue un outil de premier ordre pour la recherche de nouveaux promoteurs différents des promoteurs 85A et *hsp60*. A ce titre, deux types de promoteurs peuvent être intéressants: (i) des promoteurs constitutifs homologues dont la force est supérieure à celle du promoteur *hsp60*, ou (ii) des promoteurs inductibles *in vivo* lorsque le BCG est internalisé dans les macrophages. Ce deuxième cas de figure est particulièrement intéressant, puisque des travaux de Hohmann *et al.* (1995) réalisés chez *S. typhimurium* ont montré qu'il y avait une augmentation significative de l'immunogénicité de la souche recombinante lorsque le gène codant la protéine d'intérêt était placé sous contrôle d'un promoteur inductible *in vivo* dans le macrophage. De tels promoteurs inductibles chez les mycobactéries pourraient constituer une alternative intéressante pour le contrôle de l'expression d'antigènes vaccinaux *in vivo*.

Les avantages offerts par la GFP nous ont permis d'envisager une stratégie permettant l'identification de gènes mycobactériens induits dans la cellule hôte au cours de l'infection. Elle est basée sur l'utilisation couplée de ce marqueur chez les mycobactéries et l'analyse par cytométrie de flux de macrophages infectés avec ces mycobactéries. La Figure 6 présente les principales étapes de cette stratégie dont les premières ont déjà été réalisées.

Dans un premier temps, le vecteur d'expression pGFM-11 exprimant la GFP a été délégué du promoteur *hsp60*, tout en conservant les signaux traductionnels du gène *hsp60*. Le plasmide a également été construit de façon à générer un site *Bam*HI unique situé juste en amont de ces signaux traductionnels. Ce site peut être utilisé pour y cloner des fragments d'ADN génomique de BCG ou de *M. tuberculosis* obtenu par restriction *Sau*3AI partielle. Les vecteurs contenant des fragments de taille variable en amont du gène *gfp* peuvent alors être introduits dans le BCG. Des macrophages murins ou des monocytes humains en cultures peuvent alors être infectés avec cette banque de mycobactéries recombinantes. Après internalisation des bactéries, les cellules seront triées par cytométrie de flux. Les cellules renfermant des bactéries fluorescentes (phénotype *gfp+*) seront alors

recueillies. Afin d'isoler les BCG recombinants qui s'y trouvent, les cellules seront alors étaillées sur un milieu gélosé sélectif. Les macrophages meurent, libérant les BCG qui apparaîtront sur boîte. Au bout de 2 à 3 semaines, l'analyse phénotypique des mycobactéries recombinantes pourra être réalisée par simple irradiation aux rayons ultraviolets. Les colonies intéressantes seront celles qui étaient fluorescentes (*gfp+*) dans le macrophage et qui perdent leur fluorescence sur boîte (*gfp-*). Les séquences régulant l'expression du gène *gfp* dans ces bactéries sont donc inductibles *in vivo*.

Ces promoteurs conditionnels pourraient être avantageux pour produire certains antigènes particuliers chez le BCG. La gp120 du VIH1, par exemple, ne peut être produite chez le BCG uniquement que si son gène est intégré dans le chromosome bactérien et donc présent en une seule copie (Stover *et al.*, 1991). Ceci suggère que cet antigène est toxique pour le BCG. Le développement de promoteurs inductibles *in vivo* pourrait peut-être subvenir à ce genre de problèmes.

Outre l'intérêt que représentent ces promoteurs pour l'expression d'antigènes hétérologues chez le BCG, les gènes inductibles *in vivo* pourraient également être d'un intérêt capital pour étudier les mécanismes de la pathogénie mycobactérienne. Un des aspects-clés de la virulence des mycobactéries pathogènes réside dans leur capacité à survivre et se répliquer dans la cellule hôte phagocytaire qui représente, pour la plupart des autres microorganismes, un environnement extrêmement hostile. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette faculté d'adaptation des mycobactéries: (i) la résistance à la flambée oxydative et aux radicaux nitrés intermédiaires (ii) l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome, (iii) la sécrétion d'inhibiteurs des agents bactéricides et, (iv) la sortie de la bactérie du phagosome vers le cytoplasme. La compréhension de certains de ces mécanismes pourrait se faire grâce à l'identification et à l'étude de la régulation des gènes induits *in vivo*, ces gènes étant souvent associés à des phénotypes de virulence. Chez *S. typhimurium*, par exemple, un grand nombre de gènes induits *in vivo* contribuent à la virulence du microorganisme (Mahan *et al.*, 1993; Mahan *et al.*, 1995). La technologie STORE décrite ci-dessus peut alors être utilisée pour interrompre ces gènes induits *in vivo* et confirmer leur rôle dans la pathogénie de la bactérie.

Par ailleurs, une étude réalisée chez *Campylobacter jejuni* suggère qu'un certain nombre de protéines spécifiquement exprimées durant la croissance *in vivo* de l'organisme induisent une forte réponse immune chez l'homme (Panigrahi *et al.*, 1992). Les produits des gènes induits *in vivo* chez le BCG ou *M. tuberculosis* pourraient représenter des candidats potentiellement intéressants d'un point de vue vaccinal contre la tuberculose sous la forme d'un vaccin sous-unitaire. Un certain nombre d'études ont montré qu'une protection efficace contre une épreuve avec le bacille tuberculeux n'est induite qu'après vaccination avec du BCG vivant et pas avec le BCG inactivé. Ceci suggère que le BCG vivant est capable de produire des antigènes qui sont absents lorsque le BCG est inactivé à la chaleur (Orme, 1988). Il est donc tentant de spéculer que des protéines spécifiquement exprimées par le bacille résistant et se multipliant dans le macrophage soient immunogènes et inductrices d'une réponse protectrice. L'identification et la caractérisation de ces gènes ainsi que leur produits de traduction présentent alors un intérêt évident en tant que cibles thérapeutiques ou molécules potentiellement vaccinales pour lutter contre la tuberculose.

D'autre part, la fluorescence émise par le BCG exprimant la GFP peut être directement quantifiée en culture liquide par spectrofluorimétrie. Cette quantification peut être un moyen d'évaluation rapide de la force de promoteurs mycobactériens. Le dosage spectrofluorimétrique offre également des perspectives d'application tels que le criblage et la recherche de nouvelles molécules antimycobactériennes à usage thérapeutique. Dans cette optique, des mycobactéries exprimant la GFP peuvent être incubées en présence de divers composés. Des mesures spectrofluorimétriques sont alors réalisées pour sélectionner des composés entraînant une diminution de l'intensité de fluorescence au cours du temps, correspondant donc à des composés antimycobactériens.

## **REFERENCES**

## **BIBLIOGRAPHIQUES**

Abdelhak, S., Louzir, H., Timm, J., Blel, L., Benlasfar, Z., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., Dellagi, K., and Gicquel, B. 1995. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiol* **141**: 1585-1592.

Abe, T., Forbes, J.T., and Colley, D.G. 1983. Natural killer activity during murine schistosomiasis *mansonii*. *J Parasitol* **69**: 1001-1005.

Abou-Zeid, C., Ratliff, T.L., Wiker, H.G., Harboe, M., Bennedsen, J., and Rook, A.W. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **56**: 3046-3051.

Abou-Zeid, C., Garbe, T., Lathigra, R., Wiker, H., Harboe, M., Rook, G.A.W., and Young, D.B. 1991. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect Immun* **59**: 2712-2718.

Aldovini, A., and Young, R.A. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* **351**: 479-482.

Aldovini, A., Husson, R.N., and Young, R.A. 1993. The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **175**: 7282-7289.

Andersen A.B, Worsaae, A., and Chaparas, S.D. 1988. Isolation and characterization of recombinant lambda gt11 bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. *Infect Immun* **56**: 1344-1351.

Andersen A.B, Ljungqvist, L., and Olsen , M. 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol* **136**: 477-480.

Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., and Heron, I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* **59**: 1905-1910.

Andersen P., Askgaard, D., Gottshau, A., Bennedsen J., Nagai, S., and Heron, I., 1992. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* **36**: 823-831.

Andersen A.B., and Hansen, E.B. 1993. Cloning of the *lysA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* **124**: 105-109.

Andersen, A.B., and Brennan, P. 1994. Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, pp. 307-332. Ed. by Barry Bloom. American Society for Microbiology, Washington, DC.

ASM News. 1990. WHO reports decry neglect of world health problems. **56**: 358-359.

Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Alouf, J.E., Boquet, P., Rivaille, P., and Siffert, O. 1981. Active immunization by a diphtheria toxin oligopeptide. *Nature* **289**: 593-594.

Auriault, C., Balloul, J.M., Pierce, R.J., Dammonneville, M., Sondermeyer, P., and Capron, A. 1987. Helper T cells induced by a purified 28 kDa antigen of *Schistosoma mansoni* protects rats against infection. *Infect Immun* **55**: 1163-1169.

Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Neyrinck, J.L., Drobecq, H., Tartar, A., and Capron, A. 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J Immunol* **55**: 1687-1694.

Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R.J., Butterworth, A.E., Wolowczuk, I., Capron, M., Ouma, J.H., Balloul, J.M., Khalife, J., Neyrinck, J.L., Tartar, A., Koech, D., and Capron, A. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J Clin Microbiol* **28**: 1918-1924.

Baird, P. N., Hall, L.M.C., and Coates, A.R.M. 1989. Cloning and sequence analysis of the 10-kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* **135**: 931-939.

Balloul, J.M., Pierce, R.J., Grzych, J.M., and Capron, A. 1985. *In vitro* synthesis of a 28-Kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* **17**: 105-114.

Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., and Capron, A. 1987a. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J Immunol* **138**: 3448-3453.

Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. 1987b. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**: 149-153.

Balloul, J.M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. 1987c. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *Schistosoma mansoni* expressed in *Escherichia coli*. In Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites. Ed. A.J. McInnes, p. 77-84. Alan R. Liss, Inc., New-York.

Barletta, R.G., Snapper, B., Cirillo, J.D., Connell, N.D., Kim, D.D., Jacobs, W.R., and Bloom, B.R. 1990. Recombinant BCG as a candidate oral vaccine vector. *Ann Inst Pasteur* **141**: 931-939.

Bergquist, N.R. 1995. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? *Parasitol Today* **11**: 191-193.

Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D.A. 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* **345**: 175-176.

Bloom, B.R. 1989. Vaccines for the Third World. *Nature* **342**: 115-120

Bloom, B.R., and Murray, C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**: 1055-1063.

Bloom, B.R., and Fine, P.E.M. 1994. The BCG experience: implications for the future vaccines against tuberculosis. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* (B.R. Bloom, ed.), pp.531-557. ASM, 1325 Massachussets Avenue, N.W., Wahington, DC 20005.

Boesen, H., Nybo Jensen, B., Wilcke, T., and Andersen, P. 1995. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 1491-1497.

Borremans, M., DeWit, L., Volckaert, G., Ooms, J., De Bruyn, J., Huygen, K., Van Vooren, J.P., Stelandre, M., Verhofstadt, R., and Content, J. 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **57**: 3123-3130.

Bottiger, M. 1981. Experiences of vaccination with inactivated poliovirus vaccine in Sweden. *Dev Biol Stand* **47**: 227-232.

Boulanger, D., Reid, G.D., Sturrock, I., Wolowczuck, I., Balloul, J.M., Grezel., D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., Grimaud, J.A., Butterworth, A.E., and Capron, A. 1991. Immunization of mice and baboons with the

recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* **13**: 473-490.

Boulanger, D., Trottein, F., Mauny, F., Bremond, P., Couret, D., Pierce, R. J., Kadri, S., Godin, C., Sellin , E., Lecocq, J.P., Sellin , B., and Capron, A. 1994. Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol***16**: 399-406.

Boulanger, D., Warter, A., Trottein, F., Mauny, F., Brémond, P., Audibert, F., Couret, D., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Pierce, R.J., Lecocq, J.P., Sellin, B., and Capron, A. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol* **17**: 361-369.

Bourée, P. 1993. Symptômes et évolution de l'infestation à *Schistosoma mansoni*. *Rev Prat* **43**: 424-427.

Bout, D., Dupas, H., Carlier, Y., Afchain, D., and Capron, A. (1977). High resistance induced by young live bacillus Calmette-Guérin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* **128c**: 811-816

Bout, D., Joseph, M., David, J.R., and Capron, A. 1981. *In vitro* killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *J Immunol* **127**: 1-10.

Bout, D., Joseph, M., Pontet, M., Vorng, H., Deslee, D., and Capron, A. 1986. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* **231**: 153-157.

Boyland, E., and Chasseaud, L.F. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferase in merapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol* **32**: 173-219.

Brennan, P.J. and Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63.

Brochier, B., Kieny, M.P., Costy, F., Coppens, P., Bauduin, B., Lecocq, J.P., Languet, B., Chappuis, G., Desmettre, P., Afiademanyo, K., Libois, R., Pastoret, P.P. 1991. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* **354**: 520-522.

Brophy, P.M. and Barrett, J. 1990. Glutathione transferase in helminths. *Parasitol* **100**: 345-349.

Brown, F., Dougan, G., Hoey, E.M., Martin, S.J., Rima, B.K., and Trudgett, A. 1993. Vaccine design. *Molecular Medical Science Series*. 1-6.

Brozna, J.P., Horan, M., Rademacher, J.M., Pabst, K.A., and Pabst, M.J. 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infect Immun* **59**: 2542-2548.

Buiting, A.M.J., van Rooijen, N., and Claassen, E. 1992. Liposomes as antigen carriers and adjuvants *in vivo*. *Res Immunol* **143**: 541-548.

Bushara, H.O., Bashir M.E.N., Malik, K.H.E., Mukhtar, M.M., Trottein, F., Capron, A., and Taylor, M.G. 1993. Suppression of *S. bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol*. **15**: 383-390.

Butterworth, A.E. 1992. Vaccines against schistosomiasis: where do we stand? *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **86**: 1-2.

Calmette, A., et Guérin, C. 1911. Recherches expérimentales sur la défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Ann Inst Pasteur* **25**: 625-641.

Calmette, A. 1927. La vaccination préventive contre la tuberculose par le BCG avec la collaboration de C. Guérin, A. Boquet et L. Negre. pp.250. Masson et Cie., Paris.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Bazin, H. 1975. Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* **253**: 274-275.

Capron, M., Bazin, H., Joseph, M., Capron, A. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. *J Immunol* **126**: 1764-1768.

Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S.K., Bazin, H., Joseph, M., and Phillips, S.M. 1983. Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. *J Immunol* **131**: 1475-1480.

Capron, A., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Grzych, J.M., Dissous, C., Sondermeyer, P., and Lecocq, J.P. 1987a. Protective antigens in experimental schistosomiasis. *Acta Tropica* **44**: 63-69.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Ouma, J.H., and Butterworth, A.E. 1987b. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* **238**: 1065-1072.

Capron, A. 1992. Immunity to schistosomes. *Curr Opin Immunol* **4**: 419-424.

Capron, A. 1995. Le langage moléculaire des parasites. *Médecine Sciences* **11**: 431-439.

Chan, J., Fan X.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J., and Bloom, B.R. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* **59**: 1755-1761.

Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S., and Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *M. tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates, produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**: 1111-1122.

Chan, J., Tanaka, K., Carroll, D., Flynn, J., and Bloom, B.R. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 736-740.

Chang, Z., Choudhary, A., Lathigra, R., and Quiocho, A. F. 1994. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 1956-1958.

Chaparas, S.D. 1982. Immunity in tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization* **60**: 447.

Chatfield, S.N., Fairweather, N., Charles, I., Pickard, D., Levine, M., Hone, D., Posada, M., Strugnell, R.A., and Dougan, G. 1992. Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 *aroA*, *aroC* mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine* **10**: 53-60.

Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., and Archer, S. 1993. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol Today* **9**: 162-166.

Cirillo, J.D., Stover, C.K., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., and Barletta, R.G. 1995. Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guérin. *Clin Infect Dis* **20**: 1001-1009.

Cohen, I.R., and Young, D.B. 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* **12**: 105-110.

Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., and Mosteller, F. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**: 698-702.

Collins, D.M., Kawakami, R.P., De Lisle, G.W., Pascopella, L., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R.Jr. 1995. Mutation of the principal  $\sigma$  factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8036-8040.

Comstock, G.W. 1988. Identification of an effective vaccine against tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **138**: 479-480.

Connell, N.D., Medina-Acosta, E., McMaster W.R., Bloom, B.R. and Russell, D.G. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant Bacille Calmette-Guérin expressing the leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11473-11437.

Content, J., de la Cuvellerie, A., de Wit, L., Vincent Levy-Frébault, V., Ooms, J., de Bruyn, J. 1991. The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect Immun* **59**: 3205-3212.

Coon, M.J., and Vaz, A.D.N. 1988. Role of cytochrome P-450 in hydrocarbon formation from xenobiotic and lipid hydroperoxide. *Prog Clin Biol Res* **274**: 497-507.

Cooper, A.M., Roberts, A.D., Rhoades, E.R., Callahan, J.E., Getzy, D.M., and Orme, I.M. 1995. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol* **84**: 423-432.

Cordeiro da Silva, A., LePresle, T., Capron, A., and Pierce, R.J. 1992. Molecular cloning of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* **52**: 275-278.

Coulaud, J.P., Charmot, G. 1993. Le traitement des bilharzioses. *Rev Prat* **43**: 453-456.

Cryz, S.J. 1991. Bacterial vaccines. In *Immunotherapy and vaccines* (S.J. Cryz, ed.) pp.13-45.

Curcic, R., Dhandayuthapani, S., and Deretic, V. 1994. Gene expression in mycobacteria: transcriptional fusions based on *xylE* and analysis of the promoter region of the response regulator *mtrA* from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **13**: 1057-1064.

Damonneville, M., Pancré, V., Capron, A., and Auriault, C. 1990. Protection of rats against *Schistosoma mansoni* infection induced by platelets stimulated with the murine recombinant tumor necrosis factor alpha. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **92**: 361-363.

D'Arcy Hart, P., Young, M.R., Gordon, A.H., and Sullivan, K.H. 1987. Inhibition of phagosome-lysosome fusions in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J Exp Med* **166**: 933-946.

Das Gupta, S.K., Bashyam, M.D., and Tyagi, A.K. 1993. Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. *J Bacteriol* **175**: 5186-5192.

De Bruyn, J., Huygen, J., Bosmans, R., Fauville, M., Lippens, R., Van Vooren, J.P., P. Falmagne, P., Weckx, M., Wiker, H.G., Harboe, M., and Turneer, M. 1987. Purification, characterization and identification of a 32 kDa protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb Pathog* **2**: 351-366.

De Wit, L., Da la Cuvellerie, A., Ooms, J., and Content, J. 1990. Nucleotide sequence of the 32 kDa-protein gene (antigen 85 A) of *Mycobacterium bovis* BCG. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3995.

Diaw, O.T., Vassiliadès, G., and Sarr, Y. 1990. Prolifération de mollusques après la construction du barrage de Diama au Sénégal. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* **8**:772.

Dissous, C., Gryzch, J.M., and Capron, A. 1986. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* **323**: 443-445.

Donnelly-Wu, M.K., Jacobs, W.R.Jr., and Hatfull, G. 1993. Superinfection immunity of mycobacteriophage L5: applications for genetic transformation of mycobacteria. *Mol Microbiol* **7**: 407-417.

Drapier, J.C., Hirling, H., Wietzerbin, J., Kaldy, P., and Kuhn, L.C. 1993. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* **12**: 3643-3649.

Drobniewski, F.A., Pozniak, A.L., and Uttley, A.H.C. 1995. Tuberculosis and AIDS. *J Med Microbiol* **43**: 85-91.

Duvaux-Miret, O., Stefano, G.B., Smith, E.M., Dissous, C., and Capron, A. 1992. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 778-781.

Espitia, C., Elinos, M., Hernandez-Pando, and Mancilla, R. 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun* **60**: 2998-3001.

Everest, P., Griffiths, P., and Dougan, G. 1995. Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals* **23**: 119-124.

Faden, H. 1991. Results of a clinical study of polio vaccine: the Buffalo experience. *Pediatr Infect Dis J* **10**: 15-20.

Fallon, P.G., Smith, P., Nicholls, T., Modha, J., Doenhoff, M.J. 1994. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase-drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. *Parasite Immunol* **16**: 529-535.

Farrar, G.H., Bull, J.R., and Greenaway, P.J. 1986. Prospects for the clinical management of human cytomegalovirus infections. *Vaccine* **4**: 217-224.

Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., Jezek, Z., and Ladnyi, I.D. 1988. Smallpox and its eradication pp. 1460. World Health Organization, Geneva.  
Fine, P. E. M., and Rodrigues, L.C. 1990. Modern vaccines: mycobacterial diseases. *Lancet* **335**: 1016-1020.

Flesch, I.E.A., and Kaufmann, S.H.E. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon- $\gamma$ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **138**: 4408-4413.

Flynn, J.L., Weiss, W.R., Norris, K.A., Seifert, H.S., Kumar, S., and So, M. 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol Microbiol* **4**: 2111-2118.

Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B., and Bloom, B.R. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12013-12017.

Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., and Bloom, B.R. 1993. An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to *M. tuberculosis*. *J Exp Med* **178**: 2249-2254.

Fok, J.S., Ho, R.S., Arora, P.K., Harding, G.E., and Smith, D.W. 1976. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. V. Lack of hematogenous dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* to the lungs in animals vaccinated with Bacille Calmette-Guérin. *J Infect Dis* **133**: 137-144.

Fulginiti, V.A. 1984. Pertussis disease, vaccine, and controversy. *JAMA* **328**: 521-526.

Gallichan, W.S., Johnson, D.C., Graham, F.L., and Rosenthal, K.L. 1993. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. *J Infect Dis* **168**: 622-629.

Garbe, T., Jones, C., Charles, I., Dougan G., Young D. 1990. Cloning and characterization of the *aroA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **172**: 6774-6782.

Garcia-Sastre, A., and Palese, P. 1995. Influenza virus vectors. *Biologicals* **23**: 171-178.

Gaudier, B., and Gernez-Rieux, C. 1962. Etude expérimentale de la vitalité du BCG au cours de la traversée gastro-intestinale chez des enfants non allergiques vaccinés par voie digestive. *Ann Inst Pasteur Lille* **13**: 77-87.

Gavioli, R., Spinasi, S., Giuliani, A., and Traniello, S. 1987. Protein kinase C mediates human neutrophil cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 1290-1294.

Gentilini, M. et Duflo, Danis, M., et Richard-Lenoble, D. 1982. *Médecine Tropicale*. Flammarion Médecine-Sciences.

Germanier, R. 1972. Immunity in experimental salmonellosis. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **5**: 792-797.

Germanier, R., and Fürer, E. 1975. Isolation and characterization of galE mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* **131**: 553-558.

Gicquel, B. 1995. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* **23**: 113-118.

Girard, M., Altmeyer, R., van der Werf, S., Wychowski, C., and Martin, A. 1995. The use of picornaviruses as vectors for the engineering of live recombinant vaccines. *Biologicals* **23**: 165-169.

Golvan, Y.J. 1978. *Eléments de Parasitologie Médicale*. 3<sup>e</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences.

Gonzalez, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztein, M.B., Heppner, D.G.,

Fouts, T.R., Isibasi,A., and Levine, M.M. 1994. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsprozoïte protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis* **169**: 927-931.

Goossens, P., Montixi, C., Saron, M.F., Rodriguez, M., Zavala, F., and Milon, G. 1995. *Listeria monocytogenes*: a live vector able to deliver heterologous protein within the cytosol and to drive a CD8 dependent T cell response. *Biologicals* **23**: 135-143.

Gordon, A.H.P., D'Arcy Hart, P., and Young, M.R. 1980. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* **286**: 79-81.

Goren, M.B., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., and Armstrong, J.A. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2510-2514.

Gormley, E.P., and Davies, J. 1991. Transfer of plasmid RSF1010 by conjugaison from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **173**: 6705-6708.

Granström, M., 1991. Viral vaccines. In Immunotherapy and vaccines (S. J., Cryz, ed.), p. 47-76.

Greenwood, M. 1928. Professor Calmette's statistical study of BCG vaccination. *Br Med J* **1**: 793-795.

Grezel, D. 1992. Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes effecteurs de défense contre le schistosome au cours d'infection expérimentale. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille II, Septembre 1992.

Grezel, D., Capron M., Grzych, J.M., Fontaine, J., Lecocq, J.P., and Capron A. (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol* **23**:454-460.

Grzych, J.M., Capron, M., Bazin, H., and Capron, A. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J Immunol* **129**: 2739-2743.

Grzych, J.M., Capron, M., Lambert, P.H., Dissous, C., Torres, S., and Capron, A. 1985. An anti-idiotype vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* **316**: 74-76.

Grzych, J.M., Capron, A., Dissous, C., Capron, M., and Lambert, P.H. 1987. A protective carbohydrate epitope of major immunogen is expressed in keyhole limpet hemocyanin (KLH). *J Exp Med* **165**: 527-535.

Grzych J. M., Pearce, E.J., Cheever, A., Claulada, Z.A., Caspar, P., Hieny, S., Lewis, F.A., and Sher, A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansonii*. *J Immunol* **146**: 1322-1327.

Grzych, J.M., Grezel, D., Xu, C.B., Neyrinck, J.L., Capron, M., Ouma, J.H., Butterworth, A.E., and Capron, A. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis mansoni. *J Immunol* **150**: 527-535.

Guilhot, C., Otal, I., van Rompaey, I., Martin, C., Gicquel, B., 1994. Efficient transposition in Mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional libraries. *J Bacteriol* **176**: 535-539.

Gupta, R.K., and Siber, G.R. 1995. Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1276.

Haeseleer, F., Pollet, J.F., Haumont, M., Bollen, A., and Jacobs, P. 1993. Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. *Mol Biochem Parasitol* **57**: 117-126.

Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunne, D., Simpson, A.J.G., and Wilkins, H.A. 1991. Human IgE, IgG4, and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* **349**: 243-245.

Harding, C.V. 1995. Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. *Trends in Cell Biology* **5**: 105-109.

Harnett, W. (1988). The antihelminthic action of praziquantel. *Parasitol Today* **4**: 144-146.

Haslov, K., Andersen, A.B., Ljungqvist, L., and Bentzon, M.W. 1990. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in seven inbred guinea pig strains. The 38-kDa antigen is immunodominant. *Scand J Immunol* **31**: 503-514.

Hatfull, G.F., and Jacobs, W.R.Jr. 1994. Mycobacteriophages: cornerstones of mycobacterial research. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* (B.R. Bloom, ed.), pp. 165-183. ASM, 1325 Massachussets Avenue, N.W., Wahington, DC 20005.

Henderson, G.S., Conary, J.T., Summar, M., McCurley, T.L., and Colley, D.G. 1991. *In vivo* molecular analysis of lymphokines involved in the murine response during *Schistosoma mansoni* infection. IL-4 mRNA, not IL-2 mRNA, is abundant in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens of infected mice. *J Immunol* **147**: 992-997.

Heym, B. et Cole, S.T. 1995. Mécanismes de résistance aux antituberculeux. *Médecine Thérapeutique* **1**: 31-37.

Hirschfield, G.R., McNeil, M., and Brennan, P.J., 1990. Peptidoglycan-associated polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **172**: 1005-1013.

Hohmann, E., Oletta, C.A., Loomis, W.P., and Miller, S.I. 1995. Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2904-2908.

Hoiseth, S.K., and Stocker B.A.D., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are nonvirulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.

Hopkins, S. Kraehenbuhl,J.P., Schödel, F., Potts, A., Peterson, D., De Grandi, P., and Nardelli-Haefliger, D. 1995. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* **63**: 3279-3286.

Hughes, H.A. 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol Today* **4**: 340-347.

Huygen, K., van Vooren, J.P., Turneer, M., Bosmans, R., Dierckx, P., and de Bruyn, J., 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand J Immunol* **27**: 187-194.

Ingram, C.W., Tanner, D.C., Durack, D.T., Kernodle, G.W., and Corey, G.R. 1993. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* **16**: 463-471.

Jacobs, W.R., Kalpana, G.V., Cirillo, J.D., Pascopella, L., Snapper, S., Udani, R.A., Jones,W., Barletta, R.G., and Bloom, B.R. 1991. Genetic systems for mycobacteria. *Methods Enzymol* **204**: 537-555.

Jacobs, W.R.Jr., Barletta, R.G., Udani, R.A., Chan, J., Kalkut, G., Sosone, G., Kieser, T., Sarkis, G.J., Hatfull, G.F., and Bloom, B.R. 1993. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* **260**: 819-822.

Jacobs, W.R., and Bloom, B.R. 1994. Molecular genetic strategies for identifying virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* (B.R. Bloom, ed.), pp. 253-271. ASM, 1325 Massachussets Avenue, N.W., Wahington, DC 20005.

James, S.L., and Sher, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. (Springer-Verlag., ed). **15**: 21-31 Berlin.

Jarlier, V., and Nikaido, H. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Lett* **123**: 11-18.

Joseph, M., Tonnel, A.B., Capron, A., and Voisin, C. 1980. Enzyme release and superoxyde anion production by human alveolar macrophages stimulated with Immunoglobulin E. *Clin Exp Parasitol* **40**: 416-422.

Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H., and Viens, P., 1983. A new function for platelets: IgE-depedent killing of schistosomes. *Nature* **303**: 810-811.

Kale, A.B., Kiessling, R., van Embden, J.D.A., Thole, J.E.R., Kumararatne, D.S., Pisa, P., Wondimu, A., and Ottenhoff, T.H.M. 1990. Induction of antigen-specific CD4+ HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as non-specific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65-kDa heat-shock protein *Eur J Immunol* **20**: 369-377.

Kameoka, M., Nishino, Y., Matsuo, K., Ohara, N., Kimura, T., Yamazaki, A., Yamada, T., Ikuta, K. 1994. Cytotoxic T lymphocyte response in mice induced by a recombinant BCG vaccination which produces an extracellular  $\alpha$  antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. *Vaccine* **12**: 153-158.

Kaper, J.B., Lockman, H., Baldini, M.M., and Levine, M.M. 1989. Recombinant nontoxigenic *Vibrio cholera* strains as attenuated cholera candidates. *Nature* **308**: 655-658.

Kaufmann, S.H.E., and Young, D.B. 1992. Vaccination against tuberculosis and leprosy. *Immunobiol* **184**: 208-229.

Kaufmann, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**: 129-163.

Kaufmann, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**: 129-163.

Kazanji, M., Laurent, F., and Péry, P. 1994. Immune responses and protective effect in mice vaccinated orally with surface sporozoite protein of *Eimeria falciformis* in ISCOMs. *Vaccine* **12**: 798-804.

Ketterer, B., Meyer, D.J., and Clark, A.G. 1988. Soluble glutathione transferase isoenzymes. In: *Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H., and Ketterer, B., eds.), pp. 73-135. Academic Press, London.

Khan, C.M.A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Riveau, G., Hormaeche, R.D., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche C.E. (1994a) Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanos toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11261-11265.

Khan, C.M.A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Hormaeche, R.D., McNeill, H., Ali, T., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche C.E. (1994b). Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanos toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J Immunol* **153**: 5634-5642.

Kindler, V., Sappino, A.P., Grau, G.E., Piguet, P.F., and Vassali, P. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**: 731-740.

King, C.H., Lett, R.R., Nanduri, J., El Ibiary, S., Peters, P.A., Olds, R.G., and Mahmoud, A.A.F. 1988. Isolation and characterization of a protective antigen from adjuvant-free immunization against *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **139**: 4218-4224.

King, C.H. , Mundayoor, S., Crawford, J.T. and Shinnick, T. 1993. Expression of contact-dependent cytolytic activity by *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the genomic locus that encodes the activity. *Infect Immun* **61**: 2708-2712.

Kishi, F. 1994. Isolation and characterization of human NRAMP cDNA. *Biochem Biophys Res Comm* **204**: 1074-1080.

Klugman, K.P., Gilbertson, I.T., Koornhof, H.J., Robbins, J.B., Schneerson, R., Schulz, D., Cadoz, M., and Armand, J. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* **2**: 1165-1169.

Knopf, P.M., Cioli, D., Mangold, B.L., and Dean, D.A. 1986. Migration of *Schistosoma mansoni* in normal and passively immunized laboratory rats. *Am J Trop Med Hyg* **35**: 1173-1184.

Koch, R. 1891. Weitere Mitteilung über das Tuberkulin. *Dtsch Med Wochenschr* **17**: 1189-1192.

Koch, R., 1897. Über neue Tuberkulinpräparate. *Dtsch Med Wochenschr* **23**: 209-213.

Kuhl, S.J., and Rosen, H. 1995. Killing of microorganisms by "professional phagocytes". *Current Opin Infect Dis* **8**: 181-185.

Lagranderie, M., Ravisse, P., Marchal, G., Gheorghiu, M., Balasubramanian, V., Weigeshaus, E.H., and Smith, D.W. 1993a. BCG induced protection in guinea pigs vaccinated and challenged via the respiratory route. *Tuberc Lung Dis* **74**: 38-46.

Lagranderie, M., Murray, A., Gicquel, B., Leclerc, C., and Gheorghiu, M. 1993b. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine* **11**: 1283-1290.

Landsperger, W.J., Stirewalt, M.A., and Dresden, M.H., 1982. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem J* **201**: 137-146.

Langermann, S., Palaszynski, S., Sadziene, A., Stover, C.K. and Koenig S. 1994a. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **372**: 552-555.

Langermann, S., Palaszynski, S.R., Burlein, J. E., Koenig, S., Hanson, M.S., Briles, D.E., and Stover, K. 1994b. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant Bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med* **180**: 2277-2286.

Laqueyrerie, A., Militzer, P., Romain, F., Eiglemeier, K., Cole, S., and Marchal, G. 1995. Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-Kilodalton secreted antigen complex. *Infect Immun* **63**: 4003-4010.

Larivière, M. 1993. Epidémiologie des bilharzioses humaines. *Rev Prat* **43**: 417-423.

Lawson, J.R., and Wilson, R.A. 1980. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilisation. *Parasitology* **81**: 337-348.

Leao, S.C., Rocha, C.L., Murillo, L.A., Parra, C.A., and Patarroyo, M.E. 1995. A species-specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 4301-4306.

Leclerc, C. 1995. Le bel avenir des vaccins. *La Recherche* **276**: 548-555.

Lee, M.H., Pascopella, L., Jacobs, W.R. and Hatfull, G.F. 1991. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and Bacille Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3111-3115.

Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. 1995. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* **96**: 245-249.

Levine, M.M., Ferreccio, C., Black, R.E., and Germanier, R. 1987. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* **1**: 1049-1052.

Lim, M.E., Rauzier, J., Timm, J., Torrea, G., Murray, A., Gicquel, B., and Portnoï, D. 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J Bacteriol* **177**: 59-65.

Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J.M., Lemoine, Y., Lecocq, J.P. 1989. High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **5**: 497-507.

Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Colston, M.J., and Silva, C.L. 1994. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* **12**: 1537-1540.

Mackett, M., and Williamson, J.D. 1995. Human vaccines and vaccination. Bios Scientific Publishers.

Mahan, M.J., Slauch, J.M., and Mekalanos, J.J. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686-688.

Mahan, M.J., Tobias, J.W., Slauch, J.M., Hanna, P.C., Collier, R.J., and Mekalanos, J.J. 1995. Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 669-673.

- Marchal, G. 1993. Le réveil de la tuberculose. *La Recherche* **253**: 380-388.
- Marchal, G., 1995. La réponse immunitaire au cours de la tuberculose. *Médecine Thérapeutique* **1**: 19-29.
- Marcillac, I., Troalen F., Bidart, J.M., Ghillani, P., Ribrag, V., Escudier, B., Malassagne, B., Droz, J.P., Lhommé, C., Rougier, P., Duvillard, P., Prade, M., Lugagne, P.M., Richard, F., Poinnard, T., Bohuon, C., Wands, J., and Bellet, D. 1992. Free human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. *Cancer Res* **542**: 3901-3907.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., and Yamada, T. 1988. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular  $\alpha$  antigen. *J Bacteriol* **170**: 3847-3854.
- McDonough, K.A., Kress, Y., and Bloom, B.R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* **61**: 2763-2773.
- McMurray, D.N., Mintzer, C.L., Tetzlaff, C.L., and Carlomagno, M.A. 1986. The influence of dietary protein on the protective effect of BCG in guinea pigs. *Tubercl* **67**: 31-39.
- McNair, A.T., Dissous, C., Duvaux-Miret, O., and Capron, A. 1993. Cloning and characterization of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* **124**: 245-249.
- McTigue, M.A., Williams, D.R., and Tainer, J.A. 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol* **246**: 21-27.
- Medaglini, D., Pozzi, G., King, T.P., and Fischetti, V.A. 1995. Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordinii* after oral colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6868-6872.
- Meiklejohn, G. 1983. Viral respiratory disease at Lowry Air Force Base in Denver, 1952-1982. *J Infect Dis* **148**: 775-784.
- Michel, M.L., Pontisso, P., Sobczak, E., Malpiece, Y., Streeck, R.E., and Tiollais, P. 1984. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7708-7712.

Milstien, J. B., and Gibson, J.J. 1989. Quality control on BCG vaccines by the World Health Organization: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. Publication WHO/EPI/Gen/89.1. World Health Organization, Geneva.

Moloney, N.A., Hinchcliffe, P., and Webbe, G. 1987. Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 81: 247-254.

Moreno, F., Fowler, A.V., Hall, M., Silhavy, T.J., Zabin, I., and Schwartz, M. 1980. A signal sequence is not sufficient to lead  $\beta$ -galactosidase out of the cytoplasm. *Nature* 286: 356-359.

Munk, M.E., Shinnick, T.M., and Kaufmann, S.H.E. 1990. Epitopes of the mycobacterial heat shock protein 65 for human T cells comprise different structures. *Immunobiol* 180: 272-277.

Murray, A., Winter, N., Lagranderie, M., Hill, D.F., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Moriarty, K.M., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol Microbiol* 6: 3331-3342.

Murray, P.J., and Young, R.A. 1992. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. *J Bacteriol* 174: 4193-4196.

Nagai, S., Wiker, H.G., Harboe, M., and Kinomoto, M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59: 372-382.

Norman, E., Dellagostin, O.A., McFadden, J., and Dale, J.W. 1995. Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol* 16: 755-760.

North, R.J., and Izzo, A.A. 1993. Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster *in vivo* doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity *J Exp Med* 177: 1723-1733.

O'Brien, L., Carmichael, J., Lowrie, D.B., and Andrew, P.W. 1994. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates *in vitro*. *Infect Immun* 62: 5187-5190.

O'Callaghan, D. Maskell, D., Liew, F.Y., Easmon, C.S.F., and Dougan, G. 1988. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in Balb/c mice. *Infect Immun* **56**: 419-423.

O'Leary, K.A., and Tracy, J.W. 1991. *Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase-catalyzed detoxification of dichlorvos. *Exp Parasitol* **72**: 355-361.

Orme, I.M., and Collins, F.M. 1984. Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis* infected lung: dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immun* **84**: 113-120.

Orme, I.M. 1988. Induction of non-specific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance, in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect Immun* **56**: 3310-3312.

Osborn, T.W. 1983. Changes in BCG strains. *Tubercle* **64**: 1-132.

Ottesen, E.A., Stanley, A.M., Gelfand, J.A., Gadek, J.E., Frank, M.M., Nash, T.E, and Cheever, A.W. 1977. Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomules. *Am J Trop Med Hyg* **26**: 134-147.

Oyston, P.C.F., Williamson, E.D., Leary, S.E.C., Eley, S.M., Griffin, K.F., and Titball, R.W. 1995. Immunization with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* producing F1 antigen protects against plague. *Infect Immun* **63**: 563-568.

Palmer, C.E., and Long, M.W. 1966. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* **94**: 553-568.

Pancré, V., Monté, A. delanoye, A., Capron, A., and Auriault, C. 1990. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *S. mansoni*. *Eur Cytokine Net* **1**: 15-19.

Pancré, V., Wolowczuk,I., Guerret, S., Copin, M.C., Delanoye, A., Capron, A., and Auriault, C. 1994. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infect Immun* **62**: 3723-3730.

Panigrahi, P., Losonsky, G., DeTolla, L.J., and Morris, J.G.Jr. 1992. Human immune response to *Campylobacter jejuni* proteins expressed *in vivo*. *Infect Immun* **60**: 4938-4944.

Pascopella, L., Collins, F.M., Martin, J.M., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Stover, C.K., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R.Jr. 1994. Use of *in vivo* complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. *Infect Immun* **62**: 1313-1319.

Peake, P., Basten, A., Britton, W.J. 1991. Characterization and functional properties of the 70-kDa protein of *Mycobacterium bovis*. *J Biol Chem* **266**: 20828-20832.

Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D., and Sher, A. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non-surface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5678-5682.

Phalipon, A., and Sansonetti, P. 1995. Live attenuated *Shigella flexneri* mutants as vaccine candidates against shigellosis and vectors for antigen delivery. *Biologicals* **23**: 125-134.

Phillips, S.M., and Lammie, P.J. 1986. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitol Today* **2**: 296-301.

Picot, H. 1993. La lutte contre les schistosomiases. *Rev Prat* **43**: 462-465.

Pierce, R.J., Khalife, J., Williams, D.L., Kanno, R., Trottein, F., LePresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T., and Capron, A. 1994. *Schistosoma mansoni*: characterization of sequence variants of the 28-kDa glutathione S-transferase. *Exp Parasitol* **79**: 81-84.

Pincus, S., Tartaglia, J., and Paoletti, E. 1995. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals* **23**: 159-164.

Plum, G., and Clark-Curtiss, J.E. 1994. Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect Immun* **62**: 476-483.

Polla, B.S. 1988. A role for heat shock proteins in inflammation? *Immunol Today*, **9**: 134-137.

Porchet, E., McNair, A., Caron, A., Kusnierz, J.P., Zemzoumi, K., and Capron, A. 1994. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitol* **109**: 565-572.

Precious, W.Y., and Barrett, J., 1989. The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem Biophys Acta* **992**: 215-222.

Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.

Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology* 5: 85-87.

Rambukkana, A., Das, P.K., Chand, A., Baas, J.G., Groothuis, D.G., and Kolk, A.H.J. 1991. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* proteins in the 30-kDa region: identification and localization of 29/33-kDa doublet proteins on mycobacterial cell wall. *Scand J Immunol* 33: 763-775.

Randrianarison-Jewtoukoff, V., and Perricaudet, M. 1995. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* 23: 145-157.

Ratliff, T.L., Palmer, J.O., Mc Garr, J., and Brown, E.J. 1987. Intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Res* 47: 1762-1766.

Raviglione, M. C., Snider, D. E., and Kochi, A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis: Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 273: 220-226.

Renauld, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.M., Capron, A., Riveau, G., and Locht, C. 1995. Induction of mucosal immune response against a heterologous antigen fused to Filamentous Hemagglutinin. submitted.

Roche, C., Williams, D.L., Khalife, J., LePresle, T., Capron, A., and Pierce, R.J. 1994. Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. *Gene* 138: 149-152.

Roche, P.W., Triccas, J.A., and Winter, N. 1995. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Trends in Microbiol* 3: 397-401.

Rodrigues, L.C., Diwan, V.K., and Wheeler, J. 1993. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 22: 1154-1158.

Romain, F., Augier, J., Pescher, P., and Marchal, G. 1993a. Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5322-5326.

Romain, F., Laqueyrerie, A., Militzer, P., Pescher, P., Chavarot, P., Lagranderie, M., Auregan, G., Gheorghiu, M., and Marchal, G. 1993b. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-Kilodalton antigen response after immunization with living bacteria. *Infect Immun* 61: 742-750.

Rouas, N., Christophe, S., Bellet, D., Troalen, F., Guillet, J.G., and Bidart, J.M. 1992. Immune recognition of a molecule naturally presented as a monomeric or an oligomeric structure: the model of the human chorionic gonadotropin  $\alpha$  subunit. *Mol Immunol* **29**: 883-8936.

Salo, W.L., Aufderheide, A.C., Buikstra, J., and Holcomb, T.A. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2091-2094.

Salyers, A.A., and Whitt, D. 1994. *Bacterial Pathogenesis*: a molecular approach. *Tuberculosis*. pp. 307-321. ASM Press, 1325 Massachusetts Avenue, N.W., Washington DC 20005.

Sansonetti, P.J., Ryer, A., Clerc, P., Maurelli, A.T., and Mounier, J. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within Hela cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysin. *Infect Immun* **51**: 461-469.

Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., and Horwitz, M.A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* **144**: 2771-2780.

Schlesinger, L.S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* **150**: 2920-2930.

Seibert, F.B., and Munday, B. 1932. The chemical compositions of the active principles of tuberculin. XV. A precipitated purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standard tuberculin. *Am Rev Tuberc* **23**: 724-737.

Sharma, N., and Prescott, S. 1994. BCG vaccine in superficial bladder cancer: the most effective form of immunotherapy for solid tumours is still poorly understood. *Br Med J* **308**: 801-802.

Sher, A. 1976. Complement-dependent adherence of schistosomula to mast cells. *Nature* **263**: 334-335.

Shinnick, T.M., Krat, C., and Schadow, S. 1987. Isolation and restriction site maps of the genes encoding five *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Infect Immun* **55**: 1718-1721.

Shinnick, T.M., and Good, R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect D* **13**: 884-901.

Shinnick, T.M., King, C.H., Quinn, F.D. 1995. Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. *Am J Med Sci* **309**: 92-98

- Short, R.B. 1983. Sex and the single schistosome. *J Parasitol* **69**: 4-22.
- Shurr, E., Malo, D., Radzioch, D., Buschman, E., Morgan, K., Gros, P., and Skamene, E. 1991. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. *Immunol Today* **12**: 42-45.
- Sibley, L.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J., and Krahenbuhl, J.L. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* **56**: 1232-1236.
- Simpson, L.L. 1986. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **26**: 427-453.
- Singh, M., Andersen, A.B., McCarthy, J.E.G., Rohde, M., Schütte, H., Sanders, E., and Timmis, K.N. 1992. The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen: overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Gene* **117**: 53-60.
- Smith, M.A., and Clegg, J.A. 1985. Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. *Science* **227**: 535-537.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W.R.Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**: 1911-1919.
- Sory, M.P., and Cornelis, G.R. 1990. Delivery of cholera toxin B subunit by using a recombinant *Yersinia enterocolitica* strain as a live oral carrier. *Res Microbiol* **141**: 921-929.
- Stirewalt, M.A., Kuntz, R.E., and Evans, A.S. 1974. *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomula. *Adv Parasitol* **12**: 115-125.
- Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, W.R., and Bloom, B.R. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456-460.
- Stover, C. K., V. F. de la Cruz, G. P. Bansal, M. S. Hanson, T. R. Fuerst, W. R. Jacobs, and B. R. Bloom. 1992. Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. In *Genetically Engineered Vaccines*, J. E. Ciardi, J. R. McGhee, and J. M. Keith, eds. Plenum Press, New-York, p. 175-182.

Stover, C. K., Bansal G.P., Hanson, M. S., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Young, J.F., Koenig, S., Young, D. B., Sadziene, A., and Barbour A.G. 1993. Protective immunity elicited by recombinant Bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate lyme didease vaccine. *J Exp Med* 178: 197-209.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., Russel, D.G. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-681.

Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R., and Levine, M.M. 1992. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 10: 443-446.

Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.C., Cox, W.I., Davis, S.W., Van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., and Paoletti, E.R. 1992. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188: 217-232.

Tartaglia, J., Jarrett, O., Neil, J.C., Desmettre P., Paoletti, E. 1993. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with canarypox virus recombinant ALVAC-FL. *J Virol* 67: 2370-2375.

Taylor, M.G., and Bickle, Q.D. 1986. Towards a schistosomiasis vaccine: irradiated schistosomes vaccines. *Parasitol Today* 2: 132-134.

Taylor, J.B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D., Roitsch, J., Balloul, J.M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J.P., Capron, A., and Ketterer, B. 1988. The glutathione S-transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J* 7: 465-472.

Thole, J.E.R., Keulen, W.J., Kolk, A.H.J., Groothuis, D.G., Berwald, L.G., Tiesjema, R.H., and van Embden, J.D.A. 1987. Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect Immun* 55: 1466-1475.

Timm, J., Lim, E.M., and Gicquel, B. 1994 *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM Series. *J Bacteriol* 176: 6749-6753.

Trias , J., Jarlier, V., and Benz, R. 1992. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* 258: 1479-1481.

Trias, J., and Benz, R. 1993. Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. Demonstration of voltage gating and of negative point charges at the channel mouth. *J Biol Chem* **268**: 6234-6240.

Trottein, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Schmitt, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. 1990. Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* **41**: 35-44.

Trottein, F., Godin, C., Pierce, R.J., Sellin, B., Taylor, M.G., Gorillot, I., Sampaio, S.M., Lecocq, J.P., and Capron, A. 1992. Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol Biochem Parasitol* **54**: 63-72.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D., and Liu, M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**: 1745-1749.

van Embden, J.D.A., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M., and Small, P.M. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommandations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **31**: 406-409.

van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., ven der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A., and Moormann, R. 1991. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* **65**: 2761-2765.

Verhoef, J. 1994. The BCG controversy. *Int J Antimicrobiol Agents* **4**: 291-295.

Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG. *Cell* **73**: 469-485.

Wayne, L.G., and Kubica, G.P. 1986. *The mycobacteria*. In Bergey's manual of systematic bacteriology (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, ed.), pp. 1436-1457. Williams & Wilkins, Baltimore.

Walker, R.I. 1994. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* **12**: 387-400.

Weiss, G., Goossen, B., Doppler, W., Fuchs, D., Pantopoulos, K., Werner-Felmayer, G., Wachter, H., and Hentze, M.W. 1993. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *EMBO J* **12**: 3651-3657.

WHO. 1966. Expert Committee on Biological Standardization. Technical report series no. 329. World Health Organization, Geneva.

WHO. 1991. Research and development in the field of vaccines. World Health Organization, Geneva.

WHO. 1992. Expanded Program for Immunization. Program Report. World Health Organization, Geneva.

Wiker, H.G., Harboe, M., and Lea, T.E. 1986. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogenous BCG 85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **81**: 298-306.

Wiker, H.G., and Harboe, M. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* **56**: 648-661.

Winter, N., Lagranderie, M., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Guy, B., Kieny, M.P., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. 1991. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* **109**: 47-54.

Winter, N., Lagranderie, M., Gangloff, S., Leclerc, C., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. 1995. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251 nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* **13**: 471-478.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A., and Capron, A., 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J Immunol* **142**: 1342-1350.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Vendeville, C., Tartar, A., and Capron, A., 1990. T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **93**: 350-358.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R.J., Grezel, D., Reid, G.D., Tartar, A., and Capron, A., 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28GST antigen in rat, mouse and monkey. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J Immunol* **146**: 1987-1995.

Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Poindexter, R.W., Caspar, P., Lewis, F.A., Sher, A. 1995. An IL-12 based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* **376**: 594-596.

Xie, Q.W., Whisnant, R., and Nathan, C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independant nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **177**: 1779-1784.

Xu, C.B., Verwaerde, C., Grzych, J.M., Fontaine, J., and Capron, A. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol* **21**: 1801-1807.

Xu, C.B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartare, A., and Capron, A. 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability: role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Immunol* **150**: 940-949.

Yasutomi, Y., Koenig, S., Haun, S.S., Stover, C.K., Jackson, R.K., Conrad, P., Conley, A.J., Emini, E.A., Fuerst, T.R., and Letvin, N.L. 1993. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J Immunol* **150**: 3101-3107.

Young, D., R., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., and Young, R. A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:4267-4270.

Young, D.B., and Garbe, T.R. 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **142**: 55-65.

Young, D.B., and Cole, S.T. 1993. Leprosy, tuberculosis, end the new genetics. *J Bacteriol* **175**: 1-6.

Zhang, Y., Lathigra, R., Garbe, T., Catty, D., and Young, D. 1991. Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**: 381-391.

Zwingenberger, K., Richter, J., Siqueira Vergetti, J.G., and Feldmeier, H. 1990. Praziquantel in the treatment of hepatosplenic schistosomiasis: biochemical disease markers indicate deceleration of fibrogenesis and diminution of portal flow obstruction. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 84: 252-256.

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	1
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	2
<b><u>PREMIERE PARTIE:</u></b>	
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	4
<b>Chapitre 1: La vaccination: généralités</b>	5
1-Un bref rappel historique	5
2-Les maladies transmissibles	7
3-Les grandes stratégies vaccinales	9
3-1 Les vaccins inactivés	9
3-2 Les vaccins sous-unitaires	10
3-3 Les vaccins vivants atténués	11
3-3-1 Les virus atténués	11
3-3-2 Les bactéries atténuées	12
3-3-2-1 La salmonelle atténuée	12
3-3-2-2 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	13
4-Les vaccins vivants recombinants	15
4-1 Vaccins viraux recombinants	16
4-1-1 Les poxvirus recombinants	16
4-1-2 Autres virus à ADN	16
4-1-3 Les virus à ARN	17
4-2 Les vaccins bactériens recombinants	18
4-2-1 Les salmonelles recombinantes	18
4-2-2 Le BCG recombinant	19
4-3 Principe de la réponse immunitaire basée sur l'utilisation d'un vecteur vivant	20
<b>Chapitre 2: Les mycobactéries</b>	22
1-Taxonomie et nomenclature des mycobactéries	22
1-1 Les mycobactéries à croissance lente	23
1-2 Les mycobactéries à croissance rapide	23
1-3 Les mycobactéries pathogènes	24
1-3-1 Lèpre et tuberculose	24
1-3-2 Pathogénie de la tuberculose	25

2-Structure de la paroi mycobactérienne	26
3-Protéines et antigènes mycobactériens	27
3-1 La tuberculine	27
3-2 Protéines cytoplasmiques	28
3-2-1 Enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés	28
3-2-2 Les protéines de stress	29
3-3 Protéines exportées	30
3-3-1 Protéines associées à l'enveloppe mycobactérienne	31
3-3-2 Protéines sécrétées	32
4-Mécanismes de persistance des mycobactéries dans la cellule hôte	33
4-1 Les phagocytes professionnels et leur défense anti-microbienne	33
4-1-1 Les composés oxydants	34
4-1-2 Les radicaux azotés	35
4-2 L'inhibition de la fusion phago-lysosomiale	36
4-3 Mécanismes d'échappement du phagosome	37
4-4 Mécanismes d'adaptation et de croissance intra-macrophagiques	37
4-5 Bases génétiques de la survie dans les macrophages	38
4-5-1 Gènes sélectivement exprimés dans les macrophages	38
4-5-2 Différences génétiques entre souches virulentes et avirulentes	39
5- <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	40
5-1 Le BCG de nos jours	40
5-2 Efficacité du BCG	40
5-2-1 Différences entre les souches vaccinales utilisées	41
5-2-2 Différences dans la virulence des souches de <i>M. tuberculosis</i>	41
5-2-3 Protection contre la réactivation ou l'infection primaire	41
5-2-4 Incidence de facteurs environnementaux	42
5-2-5 Déterminants génétiques contrôlant la résistance ou la susceptibilité à l'infection mycobactérienne	42
5-2-6 Infections par les mycobactéries environnementales	43
6-Mécanismes de la pathogénie et de la protection	44
<b>Chapitre 3: La bilharziose et le schistosome</b>	47
1-Notions générales	47
1-1 La répartition géographique	48
1-2 Le parasite	48
1-3 Le cycle évolutif des schistosomes	50

1-3-1 Le miracidium	50
1-3-2 Le sporocyste	50
1-3-3 La cercaire	50
1-3-4 Le schistosomule et le ver adulte	51
1-4 La pathologie	52
1-5 Le diagnostic	52
1-6 Le traitement	53
2-La réponse immune contre <i>Schistosoma mansoni</i>	55
2-1 Les composantes de la réponse immune	55
2-1-1 Mécanismes effecteurs non spécifiques	55
2-1-2 Mécanismes effecteurs spécifiques	56
2-2 Régulation de la réponse immune vis-à-vis de <i>S. mansoni</i>	57
3-Stratégies vaccinales contre les bilharzioses	58
3-1 Larves atténuées	58
3-2 Vaccins non-vivants	59
3-2-1 Extraits parasitaires	59
3-2-2 Utilisation combinée d'oeufs et d'IL-12	59
3-2-3 Antigènes purifiés	59
<b>Chapitre 4: La Sm28GST</b>	62
1-Identification et fonction de la Sm28GST	62
2-La famille des GSTs chez les schistosomes	64
2-1 Les différentes formes de GST chez le schistosome	64
2-2 Sites d'expression de la Sm28GST	65
3-Pouvoir protecteur de la Sm28GST et son effet sur la ponte	66
4-Utilisation d'anticorps monoclonaux	67
5-La réponse T	68
6-Identification des épitopes majeurs	68
6-1 Chez le rat	68
6-2 Chez la souris	69
6-3 Chez l'homme	69

**DEUXIEME PARTIE:****CADRE ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE**

71

**TROISIEME PARTIE:**

<b>DEVELOPPEMENT DE VECTEURS D'EXPRESSION CHEZ LE BCG</b>	76
1-Construction d'un BCG recombinant sécrétant la Sm28GST	77
1-1 Analyse de la région promotrice du gène codant l'antigène 85A de <i>M. tuberculosis</i>	78
1-2 Construction et immunogénicité d'une souche de BCG exprimant et sécrétant la Sm28GST sous contrôle des signaux de l'antigène 85A	78
2-Marqueurs de résistance au mercure	80
3-Vecteurs d'expression et de sécrétion adaptés à l'usage vaccinal	82

**QUATRIEME PARTIE:**

<b>CONSTRUCTION D'UNE SOUCHE IMMUNOGENE DE BCG EXPRIMANT LA SM28GST SOUS FORME CYTOPLASMIQUE</b>	84
--	----

**CINQUIEME PARTIE:**

<b>LA "GREEN FLUORESCENT PROTEIN" (GFP): UN NOUVEAU MARQUEUR D'EXPRESSION CHEZ LES MYCOBACTERIES</b>	86
--	----

**SIXIEME PARTIE:**

<b>INTEGRATION CHROMOSOMIQUE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE</b>	89
--	----

**SEPTIEME PARTIE:**

<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	92
--	----

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	109
------------------------------------	-----

