

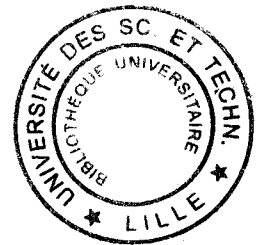
juin 2000 6695

**UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS**

N° d'ordre :

**Nathalie MIELCAREK**

**Thèse de Doctorat  
Sciences de la Vie et de la Santé  
(arrêté du 30 mars 1992)**



**DÉVELOPPEMENT DE *BORDETELLA PERTUSSIS*  
COMME VECTEUR VIVANT VACCINAL  
ADMINISTRABLE PAR VOIE NASALE :  
APPLICATION AU MODELE DE LA  
SCHISTOSOMIASE**

présentée le 20 décembre 1996 devant la commission d'examen:

<b>Président:</b>	<b>Pr. G. SPIK</b>
<b>Directeur de thèse:</b>	<b>Pr. A. CAPRON</b>
<b>Rapporteurs:</b>	<b>Dr. A. MERCENIER</b> <b>Dr. C. CZERKINSKY</b>
<b>Examineurs:</b>	<b>Dr. G. RIVEAU</b> <b>Dr. C. LOCHT</b> <b>Dr. R.J. PIERCE</b>

**Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille,  
en étroite collaboration entre le**

**Centre d'immunologie et de Biologie Parasitaire  
INSERM U167**

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

**et le**

**Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire  
INSERM U447**

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

*Je dédie cette thèse  
à mes parents,  
à mon frère, Jean-François, et à Hélène,  
à ma famille,  
à tous mes amis,  
Pour ce qu'ils représentent pour moi  
et pour l'amour que je leur porte*

A Monsieur le Professeur CAPRON

Vous m'avez chaleureusement accueillie dans votre laboratoire et vous m'avez permis d'y réaliser ce travail au sein d'un programme de recherche de grande qualité. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur SPIK

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

A Madame le Docteur MERCENIER

Vous avez accepté de juger ce travail. Je vous remercie sincèrement de l'intérêt porté à cette thèse ainsi que de votre présence dans ce jury.

A Monsieur le Docteur CZERKINSKY

Pour l'honneur que tu me fais de juger l'ensemble de ce travail et d'être présent dans ce jury, sois assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur PIERCE

Je te remercie Raymond de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire et pour tes conseils prodigués au cours de ces quatre années. Sois assuré de mon amitié sincère.

A Monsieur le Docteur LOCHT

Je te remercie Camille pour la collaboration fructueuse que nous avons développée. Ta disponibilité et tes compétences scientifiques ont été des plus précieuses dans l'élaboration de ce travail. Je te remercie sincèrement pour ton soutien et pour la gentillesse que tu m'as témoignée.

A Monsieur le Docteur RIVEAU

C'est avec grand plaisir Gilles que j'ai pu travailler avec toi au cours de ces trois années durant lesquelles tu m'as suivie avec compétence et enthousiasme. Je te remercie pour l'attention particulière que tu as portée au bon déroulement de ce travail. La confiance que tu m'as accordée et la gentillesse que tu m'as si souvent témoignée ont été pour moi les plus précieuses des motivations. Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié sincère et de ma reconnaissance.

J'adresse également mes plus vifs remerciements au Dr. Geneviève Renauld-Mongénie qui a été à l'origine de ce travail et dont les compétences et le dynamisme m'ont permis d'acquérir les connaissances nécessaires à la réalisation de cette thèse.

Je voudrais associer Jocelyne Cornette à ces remerciements pour sa collaboration technique fructueuse durant les deux premières années de cette thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'U167 et de l'U447 qui m'ont fait partager leur expérience et dont les conseils judicieux ont permis l'aboutissement de ce travail:

Au groupe IPV, pour leur accueil, leur soutien permanent et pour l'ensemble des discussions enrichissantes que nous avons pu avoir. Plus particulièrement, merci à Anne-Marie pour m'avoir fait partager son expérience et sa conscience professionnelle, à Odile pour sa patience et ses conseils, à Franck pour son aide mais surtout pour sa gentillesse et sa présence dans des moments plus difficiles, à Loïc, à Maxime, à Nathalie et à Mohammed pour leur amitié chaleureuse.

A l'U447, pour leur collaboration enrichissante durant ces quatre années, notamment Manue pour son amitié, sa disponibilité et sa compétence technique et photographique, Juanita pour ses cours d'espagnol et pour tous les moments partagés que je n'oublierai pas, Rudy, Françoise, Franco et Larry pour leur gentillesse et leur collaboration précieuse, et toutes les autres personnes de l'unité pour leur amitié.

Au groupe SVH, Ricardo, Jocelyne, Thérèse, Didier, Camilla pour l'ensemble des instants partagés au cours de ces quatre années.

Au groupe BMIR, pour m'avoir toujours accueillie chaleureusement, Jamal pour sa gentillesse et sa disponibilité, et pour l'ensemble des discussions professionnelles et plus "philosophiques" que nous avons pu avoir, Claude pour son amitié et pour ses blagues, Christine, Cécile et Catherine pour les moments partagés.

Enfin, toutes les autres personnes qui m'ont accompagnée au cours de ces quatre années, notamment Josette pour sa disponibilité et pour m'avoir initiée aux joies des manipulations animales, Monique pour son aide au moment des perfusions et pour sa bonne humeur, Jean-lou pour son aide précieuse dans les interprétations

statistiques et les problèmes informatiques et tous les autres que je n'ai pas cité mais qui sont dans mon coeur.

J'ai également bénéficié de la gentillesse de Jean-Marc et d'Arnaud pour les illustrations de ce manuscrit. Je tiens également à remercier tout le personnel du secrétariat, et plus particulièrement Nadine.

Je voudrais terminer par remercier toutes les personnes grâce auxquelles cette thèse restera un merveilleux souvenir et qui resteront à tout jamais dans mon coeur:

Particulièrement P'tit Manu, Zou, Juanita, Franck, Rachid et Rodolfo. Vous allez terriblement me manquer.

Manue, Karine, Laurent, Vincent, Catherine, Estelle, Kader, Loïc, Esteban, Monica, Béa, Marina, Cécile, Pascal, Alexia et tous les autres..., votre amitié représente pour moi un magnifique cadeau, je ne vous oublierai pas.

Enfin, j'ai eu la chance au cours de cette thèse de rencontrer trois personnes qui ont pris une place énorme dans mon coeur. Christine, Hector et Ricardo, chacun d'entre vous sait à quel point je tiens à lui. Je veux juste vous dire que chaque instant partagé avec vous fut un réel bonheur. Je tiens à te remercier plus particulièrement, Christine, pour ton soutien constant, pour ta confiance, et plus simplement pour tout ce que tu m'as apporté. Peu de gens arrivent à associer compétence professionnelle et qualités humaines avec autant de réussite, et je suis très fière d'être l'amie d'une telle personne.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes:

1. Renauld-Mongénie, G., J. Cornette, **N. Mielcarek**, F.D. Menozzi, and C. Locht. 1996. Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Bacteriol.* 178:1053-1060.
2. Jacob-Dubuisson, F., C. Buisine, **N. Mielcarek**, E. Clément, F.D. Menozzi, and C. Locht. 1996. Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 19:65-78.
3. Renauld-Mongénie, G., **N. Mielcarek**, J. Cornette, A.M. Schacht, A. Capron, G. Riveau, and C. Locht. 1996. Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:7944-7949.
4. **Mielcarek, N.**, J. Cornette, A.M. Schacht, R. J. Pierce, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* Sous presse.
5. **Mielcarek, N.**, G. Riveau, F. Remoué, A. Capron, and C. Locht. Toxin deletion enhances immunogenicity of live attenuated *Bordetella pertussis* as homologous and heterologous vaccine. Soumis.
6. Remoué, F., O. Poulain-Godefroy, **N. Mielcarek**, R. Pierce, A. Capron, C. Locht, and G. Riveau. local transient production of inflammatory cytokines after intranasal administration with recombinant *Bordetella pertussis*. Soumis.
7. Poulain-Godefroy, O., **N. Mielcarek**, N. Ivanoff, F. Remoué, A.M. Schacht, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Enhancement of immunogenicity by mucosal antigen delivery using liposomes bearing *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. En préparation.

Brevet d'invention:

**N. Mielcarek**, C. Locht, G. Riveau, O. Poulain-Godefroy, A. Capron. 1996. Souche de *Bordetella* déficiente dans la production de toxine et exprimant une protéine hybride, liposomes comprenant de la FHA et leurs utilisations à titre de vaccins, et utilisation de la FHA pour la stimulation de réponses immunitaires. Institut National de la Propriété industrielle. Numéro:

Présentations lors de congrès internationaux:

**Mielcarek, N.**, J. Cornette, A.M. Schacht, R. Pierce, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Immune response to Sm28GST fused to FHA after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. 1994. E.C. Mucosal Immunity Biotechnology Project Meeting. Lille. France.

Buisine, C., F. Jacob-Dubuisson, E. Clément, **N. Mielcarek**, and C. Locht. Similarities between the homologous secretion systems of the *Bordetella pertussis* FHA and Ca<sup>++</sup>-independant hemolysins. 1995. A.S.M. Congres. U.S.A.

Riveau, G., R. Pierce, N. Ivanoff, **N. Mielcarek**, O. Poulain-Godefroy, L. Dupré, A.M. Schacht, C. Leportier, J. Cornette. Développement de nouvelles stratégies vaccinales: le modèle de la bilharziose. 1995. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles.

**Mielcarek, N.**, J. Cornette, A.M. Schacht, R. J. Pierce, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Protection against *Schistosoma mansoni* infection after nasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. Spring Meeting 1996. University of Wales, Bangor, United Kingdom.

**Mielcarek, N.**, J. Cornette, R.J. Pierce, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Use of recombinant *Bordetella pertussis* as a live vaccine vector by intranasal route: the schistosomiasis model. 1996. European Research Conference "Immunology of infections", Giens, France.

Locht, C., **N. Mielcarek.**, G. Renauld-Mongénie, L. Kremer, G. Riveau, and A. Capron. Attenuated respiratory pathogens as vectors. 1996. European Research Conference "Immunology of infections", Giens, France.



Poulain-Godefroy, O., N. Ivanoff, **N. Mielcarek.**, F. Remoué, A.M. Schacht, M. Mekranfar, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau. Immune response after intranasal administration of Sm28GST liposomes: enhancing effect of FHA. 1996. European Research Conference "Immunology of infections", Giens, France.

**Mielcarek, N.**, G. Riveau, A. Capron, and C. Locht. Protection and antibody responses against *Bordetella pertussis* antigens induced after infection with attenuated *B. pertussis* strains. 1996. European Research Conference "Respiratory tract infections", Obernai, France.

## Sommaire

Abréviations .....	p 11
Résumé .....	p 12
Introduction .....	p 13
La vaccination .....	p 14
<i>Bordetella pertussis</i> .....	p 34
La schistosomiase ou bilharziose .....	p 50
Cadre et Objectifs .....	p 67
Résultats .....	p 72
Discussion-Perspectives .....	p 238
Annexe technique .....	p 251
Références .....	p 258
Plan .....	p 289

## Abréviations:

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BALT</b>	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
<b>BCG</b>	Bacille de Calmette-Guérin
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CT</b>	Toxine de <i>Vibrio cholerae</i>
<b>CTB</b>	Sous-unité B de la toxine cholérique
<b>DNT</b>	Toxine dermonécrotique de <i>B. pertussis</i>
<b>EPI</b>	Programme Élargi d'Immunisation
<b>FHA</b>	Hémagglutinine filamenteuse de <i>B. pertussis</i>
<b>GALT</b>	Gut-Associated Lymphoid Tissue
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>LBA</b>	Lavage broncho-alvéolaire
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MALT</b>	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PTX</b>	Toxine de <i>Bordetella pertussis</i>
<b>PVD</b>	Pays en Voie de Développement
<b>PZQ</b>	Praziquantel
<b>SIDA</b>	Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise
<b>Sm28GST</b>	Glutathion S-transférase de 28 kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
<b>TCT</b>	cytotoxine trachéale de <i>B. pertussis</i>
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéfiance Humaine

L'un des objectifs prioritaires des prochaines décennies dans le domaine de la vaccinologie réside dans le développement de nouvelles stratégies exploitant le système immunitaire muqueux. Cependant, très peu de travaux ont été entrepris sur l'exploitation des muqueuses du tractus respiratoire comme tissu cible pour des vecteurs recombinants vivants.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à évaluer le potentiel de *Bordetella pertussis*, agent étiologique de la coqueluche, comme vecteur vivant vaccinal administrable par voie nasale. Pour cela, nous avons tiré avantage des propriétés (présentation à la surface et sous forme sécrétée, immunogénicité) de l'adhésine majeure de cette bactérie, l'hémagglutinine filamenteuse ou FHA. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au mécanisme de sécrétion de cette protéine afin de déterminer les régions dans lesquelles une protéine étrangère pouvait être insérée sans altérer la biogenèse ni modifier les propriétés intrinsèques de la FHA.

L'antigène hétérologue choisi est une glutathion *S*-transférase de 28 kDa exprimée par le parasite *Schistosoma mansoni* (Sm28GST). La capacité de cette protéine à induire une immunité protectrice dans de nombreux modèles animaux en fait un antigène vaccinal très prometteur.

Nous avons montré que l'administration nasale d'une souche recombinante de *B. pertussis* exprimant une protéine hybride FHA-Sm28GST était capable de stimuler la production d'IgA sécrétoires au niveau des muqueuses du tractus respiratoire et d'induire une mémoire immune spécifique de la protéine parasitaire.

L'atténuation de cette souche recombinante nous a permis de réduire la pathogénicité de ce vecteur tout en augmentant la réponse anticorps contre la FHA et la Sm28GST. De plus, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de notre protocole d'immunisation dans les conditions défavorables que sont une primo-vaccination contre la coqueluche ou une primo-infection par *B. pertussis* sauvage.

L'administration nasale d'une souche recombinante atténuée de *B. pertussis* exprimant la Sm28GST en fusion avec la FHA est donc capable de protéger les souris contre une infection par *B. pertussis* et contre l'infection hétérologue par *S. mansoni*. Cette protection peut d'ailleurs être obtenue chez des sujets déjà infectés par le parasite.

L'ensemble de ce travail a donc montré l'efficacité de *B. pertussis* comme vecteur vivant atténué exprimant une protéine hybride FHA-antigène hétérologue. Son administration par voie nasale induit la production d'anticorps au niveau des muqueuses du tractus respiratoire ainsi qu'au niveau sérique, et protège les souris contre une infection homologe et hétérologue. *B. pertussis* atténué représente donc un outil de choix pour le développement de nouveaux vaccins administrables par voie nasale.

# ***Introduction***

# *Chapitre I*

## La vaccination

### **I. De Jenner à nos jours.**

Il y a 200 ans, l'anglais Edward Jenner réalisa l'expérience qui allait être à l'origine de l'intérêt du monde entier pour la vaccination (Brines. 1996).

Pendant très longtemps, le *réflexe de la fuite* fut le seul remède adopté contre les maladies infectieuses. Cependant, dès 430 avant Jésus-Christ, le concept d'*immunité protectrice* induite suite à un premier contact avec la maladie fut développé par le philosophe grec Thucydides qui, décrivant une épidémie de peste à Athènes nota: "... personne ne fut touché deux fois par la maladie, ou s'il le fut, la seconde attaque ne fut jamais fatale."

La variolisation, première connue de toutes les méthodes d'immunisation, fut découverte dès l'antiquité en Inde et en Chine. Cette technique préventive par administration nasale de croûtes de pustules desséchées était d'usage courant en Extrême-Orient près de 800 ans avant la découverte de Jenner. Mais c'est au cours du 18<sup>ème</sup> siècle qu'elle se répandit en Angleterre puis dans le reste de l'Europe.

Le 14 mai 1796, E. Jenner, après de longs travaux sur le "cow-pox", encore appelé variole bovine ou vaccine, préleva le contenu d'une pustule sur la main d'une servante de ferme et l'inocula chez un jeune enfant. Six semaines plus tard, Jenner surinfecta l'enfant par la variole humaine; celui-ci ne déclencha aucune maladie et survécut à une nouvelle surinfection expérimentale quelques mois plus tard.

L'ère de la *vaccination* venait de commencer.

Quelques 90 ans plus tard, Pasteur s'attaque à une épidémie qui dévaste alors l'agriculture: le "charbon", maladie du mouton qui atteint également les bovins, les chevaux et même l'homme. Il produit alors le premier *vaccin atténué*. Après croissance à 42-43°C, une souche virulente de *Bacillus anthracis* perd sa capacité de sporuler et sa virulence pour l'animal mais conserve un pouvoir protecteur (Mackett and Williamson. 1995.)

Durant cette même période, Pasteur s'est engagé dans la course contre la rage. Le 6 juillet 1885, il fait injecter au jeune Joseph Meister, mordu par un chien enragé, de la moelle épinière desséchée prélevée sur des lapins auxquels il avait inoculé le virus rabique. Cette tentative fut concluante. La méthode développée par Pasteur reposait sur un principe plus général que celle de Jenner: un agent infectieux, ici un virus, dont la virulence a été artificiellement atténuée, a perdu son pouvoir nocif, mais conserve la propriété de stimuler la résistance de l'organisme qui le reçoit en produisant une réponse immunitaire.

Par la suite, Pasteur et Roux constatèrent que certaines manifestations pathologiques sont moins le fait des microorganismes eux-mêmes que des toxines qu'ils sécrètent. En 1922, Ramon introduisit le processus d'inactivation de la toxine diphtérique puis tétanique par le formaldéhyde sans perte de son immunogénicité. Ces *anatoxines* constituèrent alors une nouvelle classe de vaccins (Brown *et al.* 1993).

A la même époque, le bacille de Calmette et Guérin (BCG) fut obtenu à l'Institut Pasteur de Lille après 140 passages successifs d'une souche virulente de *Mycobacterium bovis*, agent étiologique de la tuberculose bovine (Calmette et Guérin. 1911). Son administration à un nouveau-né démontra son efficacité dans la protection contre la tuberculose (Calmette 1927).

C'est également dans les années 1920 que les premiers essais d'immunisation contre la coqueluche furent entrepris par utilisation de la bactérie virulente *Bordetella pertussis* inactivée chimiquement ou par la chaleur (Madsen *et al.* 1933). La vaccination contre la coqueluche sera abordée plus en détail dans la suite de notre mémoire.

Un vaccin contre la grippe a été préparé dès 1937 ainsi qu'un vaccin contre la fièvre jaune. Depuis lors, plusieurs vaccins ont été mis au point, mais il faut attendre 1949, avec la culture du virus sur cellules d'origine simienne ou humaine par Enders, Weller et Robbins, pour que l'espoir d'une prophylaxie antivirale prenne forme.

En 1955, Salk publia les résultats obtenus avec son premier vaccin à base de virus inactivés au formaldéhyde contre la poliomyélite et, en 1957, Sabin administre pour la première fois un vaccin par voie orale, constitué de virus atténué par passages successifs sur des cellules en culture (Mackett et Williamson. 1995).

Ces dernières années, de nombreuses découvertes fondamentales scientifiques et technologiques présentant un intérêt immédiat pour l'élaboration de nouveaux vaccins ou le perfectionnement de vaccins déjà existants ont été acquises. La préparation de vaccins par génie génétique est aujourd'hui une technique largement utilisée. Deux vaccins recombinants contre l'hépatite B sont ainsi commercialisés en France; l'un préparé à partir de la protéine de surface S produite chez la levure, l'autre préparé sur cellules (CHO) dérivées d'ovaires d'hamster chinois et qui contient à la fois les antigènes S et pré-S2 (Devillier et Saliou. 1991). De nombreux autres vaccins recombinants dirigés contre des infections virales (herpès, rotavirus, dengue, SIDA, etc...) ou bactériennes (coqueluche acellulaire, choléra, maladie de Lyme, etc...) sont actuellement en cours de développement (Leclerc. 1995). D'autre part, l'élargissement des connaissances en immunologie parasitaire a contribué au développement de stratégies vaccinales dirigées contre des parasitoses animales telles que les coccidioses (Kazanji *et al.* 1994) ou la schistosomiase bovine (Bushara *et al.* 1993) ainsi qu'à la production de vaccins anti-parasitaires, à l'état de recherche ou en cours d'essais, chez l'homme. Ces derniers concernent des maladies comme le paludisme (Hommel. 1995), la schistosomiase ou bilharziose (Riveau and Capron. 1996) ou encore les trypanosomiasés. L'état actuel des recherches entreprises dans le cadre du développement d'une stratégie vaccinale contre la bilharziose sera abordé ultérieurement.

Récemment, une importante découverte dans le domaine de la vaccinologie a été réalisée. Elle consiste en la possibilité d'immuniser directement avec de l'ADN nu, une technique où le gène codant pour une protéine vaccinale est injecté dans les tissus et est ainsi capable d'être exprimé par les cellules de l'hôte. Les premiers résultats de cette forme de vaccination contre certaines maladies parasitaires montrent l'obtention d'une réponse immune spécifique pouvant conduire à une protection dans le cas du paludisme (Sedegha *et al.* 1994) ou de la bilharziose (Dupré *et al.* soumis).

Les recherches concernant les données de base de la microbiologie, de la pharmacologie et de l'immunologie fondamentale ont permis, ces dernières années, le développement de nos connaissances en matière de vaccination, ainsi que le changement radical de l'épidémiologie de certaines maladies infectieuses et de leur contrôle dans les pays où une large couverture vaccinale est assurée (Kurstak *et al.* 1994). D'autre part, bien que souvent difficilement applicables, les campagnes de vaccination s'étendent dans les pays du Tiers-Monde sous l'impulsion de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) qui a lancé le Programme Élargi d'Immunsation (E.P.I.) depuis maintenant 18 ans (W.H.O. 1993).

Durant les trois dernières décennies, le nombre des maladies qui peuvent être prévenues par la vaccination a considérablement augmenté, passant de 15 en 1960 à 33 en 1990 (Nat. Inst. Allergy and Infectious diseases. 1992). Cependant, malgré ces résultats encourageants, des millions de personnes meurent encore chaque année de maladies



infectieuses, phénomène aujourd'hui amplifié par l'extension de certaines maladies meurtrières comme le SIDA ou certaines infections parasitaires.

## **II. La vaccination en 1996: Définition générale du problème.**

Les maladies infectieuses, d'origine bactérienne, virale ou parasitaire restent, avec la malnutrition à laquelle elles sont souvent associées, l'une des causes majeures de mortalité et de morbidité dans le monde.

Bien que de nombreux traitements chimiothérapeutiques aient actuellement prouvé leur efficacité dans nombre de maladies infectieuses, ce principe thérapeutique semble peu adapté aux pays en voie de développement (PVD). En effet, le coût des médicaments est, dans la plupart des cas, trop élevé pour un traitement suivi par la population locale et la distribution des substances pharmaceutiques y est bien souvent limitée. D'autre part, l'interruption brutale d'une médication, ou au contraire l'utilisation prolongée d'une chimiothérapie, peut être à l'origine de phénomènes de résistance chez l'agent infectieux ce qui ne fait qu'accentuer le problème. Enfin, une modification du statut sanitaire, considérée comme un facteur majeur de prévention de certaines maladies, est souvent fortement limitée par des barrières culturelles, sociales ou économiques.

Dans ce contexte, il est reconnu que la prévention des maladies par la vaccination serait extrêmement bénéfique, non seulement en terme de réduction de la mortalité, de la morbidité ou de la souffrance associées aux maladies, mais également pour la diminution du coût direct et indirect liés à une thérapie. Cependant, de nombreux problèmes limitent encore l'impact potentiel de ces immunisations.

### **A. Manque de quelques vaccins essentiels.**

Il est évident que seules les maladies pour lesquelles il existe déjà un vaccin efficace peuvent être prévenues et, malheureusement, la plupart des efforts dans le domaine du développement de nouveaux vaccins ont été, dans un premier temps, orientés uniquement vers la prévention de maladies affectant les populations vivant dans les pays industrialisés.

L'enjeu des prochaines décennies concerne, lui, la mise au point de vaccins contre les maladies transmissibles touchant principalement les PVD. En effet, il n'existe encore aucun vaccin capable de protéger contre des affections virales comme les affections respiratoires aiguës ou le SIDA, contre certaines affections bactériennes, et contre toutes les maladies

parasitaires. Ainsi, bien que ces dernières touchent plusieurs centaines de millions de personnes dans le monde et qu'elles représentent un obstacle important à la productivité et au développement dans de nombreux pays, aucun vaccin parasitaire efficace n'a pu être élaboré à ce jour.

## **B. Nécessité de vaccins réellement adaptés aux besoins spécifiques des pays en voie de développement.**

Il est difficile de réaliser une couverture vaccinale totale de la population à risque, notamment dans les PVD. De plus, il est maintenant reconnu que plusieurs vaccins hautement efficaces dans les pays industrialisés ne sont pas adaptés aux conditions rencontrées dans les PVD.

Ainsi, certains vaccins, comme celui contre la poliomyélite, ne sont pas d'utilisation optimale dans les PVD du fait de facteurs spécifiques du vaccin, tels que le manque de stabilité à des températures relativement élevées et les problèmes de conservation lors des transports. D'autre part, le coût de vaccins existant, par exemple contre l'hépatite ou l'encéphalite virale, peut empêcher leurs utilisations systématiques dans les PVD.

Le vaccin contre la rougeole est également représentatif du problème. Son administration chez les enfants âgés de 1 an a permis le déclin considérable de l'incidence de la maladie dans les pays industrialisés. Cependant, dans la plupart des PVD, la rougeole apparaît fréquemment chez des enfants âgés de moins de 9 mois, qui est l'âge recommandé par l'EPI pour leur immunisation (Kurstak. 1993). Il existe donc un besoin urgent pour un nouveau vaccin administrable à 4 mois. La situation est très similaire pour les vaccins contre les méningites bactériennes dont l'efficacité est relative chez les enfants de moins de 2 ans qui sont le plus susceptibles aux méningites létales.

Nombre de vaccins nécessitent plusieurs administrations avant d'obtenir une protection efficace (par exemple contre le tétanos, la diphtérie, l'hépatite B ou la poliomyélite). Cette exigence représente un des facteurs limitants de la couverture vaccinale dans les PVD. Un exemple frappant est celui du tétanos: environ 800 000 nouveau-nés meurent encore chaque année de cette maladie dans les PVD. Ce nombre pourrait être fortement diminué en immunisant toutes les femmes enceintes ou en âge de l'être. Cependant, cette vaccination nécessite au moins deux injections. Il est évident qu'une prévention efficace de cette maladie pourrait être obtenue à l'aide d'un vaccin administrable en une seule prise.

D'autre part, la nécessité d'administrer la plupart des vaccins par injection à travers la peau est un problème constant pour les services de santé et représente un obstacle pour une couverture vaccinale de toute la population. Une mauvaise utilisation des aiguilles ou seringues crée un risque de transmission de certaines maladies telles que le SIDA ou l'hépatite.

Pour toutes ces raisons, il est urgent de trouver des systèmes permettant une administration plus facile des vaccins. L'administration par voie mucosale, orale ou nasale, paraît être une alternative très prometteuse.

De plus, il est encore difficile de contrôler certaines infections provoquées par des microorganismes qui entrent chez l'homme en traversant les barrières muqueuses. L'induction d'une immunité protectrice au site d'entrée, c'est-à-dire au niveau des surfaces muqueuses apparaît alors essentielle. Il existe donc un réel besoin de développement de cette nouvelle classe de vaccins induisant une immunité mucosale.

Un autre problème fréquemment rencontré, notamment chez les candidats vaccinaux à base de peptides synthétiques ou de polysaccharides purifiés, est leur manque d'immunogénicité. Nos connaissances sont encore limitées quant aux "carriers" (protéines ou peptides porteurs) optimaux à utiliser comme conjugués avec les sous-unités vaccinales afin d'obtenir des réponses immunes suffisantes et ce, sur une longue période.

De nouvelles formulations doivent également être développées. L'efficacité relative de nouveaux adjuvants comme potentiateurs de la réponse immune après incorporation dans les préparations vaccinales n'est pas encore totalement établie. De plus, certains virus (vaccine, adénovirus, etc.) ou bactéries (*Salmonella*, BCG, *B. pertussis*, etc.) peuvent maintenant être modifiés génétiquement afin de servir de vecteurs vivants capables d'exprimer un antigène hétérologue à potentiel vaccinal contre une autre maladie.

### **III. Exigences concernant le développement d'un vaccin.**

L'administration d'un nouveau vaccin nécessite qu'il soit efficace et sans danger d'utilisation. Une facilité de production, un prix modéré, une stabilité et une facilité d'administration représentent également des atouts majeurs.

## **A . L'innocuité du vaccin.**

L'innocuité est déterminée par deux paramètres: la mortalité et la morbidité. De nombreux facteurs entrent en jeu pour déterminer le taux accepté pour chacun de ces paramètres, notamment la sévérité de la maladie combattue. Cependant, il est peu probable qu'un nouveau vaccin soit accepté si la mortalité provoquée par son administration est supérieur à  $1/10^6$  chez les personnes vaccinées (WHO. 1993).

Dans la plupart des cas, le développement de nouveaux vaccins requiert la manipulation d'organismes pathogènes ce qui pose des problèmes évidents pour le développement, la production et l'utilisation de ces vaccins. Dans ce contexte, l'utilisation des nouvelles techniques de biologie moléculaire a ouvert une nouvelle voie en vaccinologie en offrant de nombreux avantages par rapport aux approches traditionnelles. L'introduction des techniques de recombinaison génétique permet ainsi d'atténuer des pathogènes virulents; ou encore d'utiliser d'autres vecteurs afin d'exprimer des peptides immunogéniques soit dans le but uniquement de les produire en tant que sous-unité immunogénique bien caractérisée et facilement purifiable soit comme vaccin chimérique.

Les vaccins basés sur ces vecteurs recombinants, viraux ou bactériens, sont beaucoup plus controversés et leur utilisation potentielle a été discutée lors d'une réunion de l'O.M.S (WHO. 1990). Idéalement, le vecteur vivant doit être à l'origine de très peu d'effets secondaires et son administration ne doit pas provoquer de problèmes chez les personnes immunodéprimées. Une grande attention doit être apportée à la fidélité et la stabilité d'expression du gène introduit. D'autre part, l'utilisation de ce vecteur ne doit pas être accompagnée par l'intégration de l'ADN dans le génome de l'hôte.

## **B. L'efficacité.**

L'objectif visé dans le cadre du développement d'un nouveau vaccin correspond à l'induction d'une immunité effectrice et à l'obtention d'une protection à long terme chez au moins 90% des personnes vaccinées. Le vecteur devrait stimuler idéalement une réponse lymphocytaire T et B spécifiques et générer un large ensemble de cellules mémoires. Ces propriétés sont plus facilement obtenues par l'accumulation et la persistance de l'antigène au niveau des sites inducteurs de la réponse immune.

## IV. Les principales stratégies vaccinales.

Les vaccins actuels peuvent être divisés en deux grandes classes: les vaccins cellulaires entiers et les sous-unités vaccinales. Un nouveau mode de vaccination fait actuellement l'objet de beaucoup d'attention. Il correspond à l'administration d'ADN nu.

### A. Les sous-unités vaccinales.

Ce premier type de vaccin est constitué uniquement de quelques composants du pathogène. Actuellement, grâce aux techniques de biologie moléculaire, la plupart des antigènes d'intérêt de nature protéique peuvent être produits chez des bactéries, des levures ou des cellules eucaryotes hétérologues. Les vaccins sous-unitaires peuvent également être constitués de polysaccharides, comme le vaccin contre la typhoïde (Klugman *et al.* 1987) ou encore de molécules synthétisées chimiquement (Audibert *et al.* 1981; Riveau *et al.* 1989).

Idéalement, ces antigènes doivent être facilement purifiables et fortement immunogéniques. Malheureusement, cette dernière caractéristique est bien souvent perdue après purification. L'implication pratique de cette baisse d'immunogénicité est la nécessité d'administrer plusieurs doses de vaccins à des concentrations élevées afin d'obtenir une immunité protectrice durable (Cirillo *et al.* 1995). Une conséquence de cette situation est l'utilisation d'adjuvants, capables d'augmenter l'intensité de la réponse immune spécifique, dans la préparation vaccinale ce qui diminue la quantité d'antigène nécessaire, réduisant ainsi les coûts de production du vaccin (Gupta and Siber. 1995). Parmi les adjuvants les plus utilisés ou étudiés (Gupta *et al.* 1993; Hughes and Babiuk. 1994), on trouve les émulsions d'huiles (adjuvant complet et incomplet de Freund), les composés minéraux (hydroxyde et phosphate d'aluminium), les produits bactériens (lipopolysaccharides (LPS), Muramyl dipeptide (MDP), monophosphoryl lipide A ou des produits mycobactériens), ainsi que les vecteurs synthétiques: les liposomes, les microsphères et les ISCOMS (Immuno Stimulating Complexes).

### B. La vaccination génique.

L'utilisation d'ADN sous forme plasmidique comme méthode capable de générer une réponse immune est basée sur les observations de Wolff *et al.* (1990) qui montra qu'une injection intramusculaire (i.m.) d'ADN codant pour des gènes reporters résultait en l'expression de la protéine *in-situ*. L'ADN, qui reste sous forme épisomale, est transcrit et traduit en protéine de la même manière qu'un antigène synthétisé par un virus infectieux. Les fragments antigéniques sont donc présentés en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ce qui entraîne l'activation des cellules T cytotoxiques

(Ulmer *et al.* 1994). L'immunisation par l'ADN nu induit également la stimulation des cellules T auxiliaires et des lymphocytes B, et permet ainsi de protéger les animaux contre une infection d'épreuve (Sedegha *et al.* 1994). Actuellement, l'injection d'ADN nu est réalisée également dans d'autres tissus tels que le foie, les poumons, la peau ou la rate. Cependant, alors que l'ADN nu injecté en i.m. se trouve dans une solution saline (Manthorpe *et al.* 1993), il semble que la transfection des cellules dans d'autres tissus soit facilitée si l'ADN est complexé à des lipides cationiques (Stribling *et al.* 1992; Philip *et al.* 1993). Cette technique de vaccination à l'aide de polynucléotides représente une nouvelle voie très intéressante de part sa facilité de conception et d'utilisation. Néanmoins, notre champ de connaissance quant aux processus impliqués dans l'internalisation de l'ADN est encore très réduit. De prochaines études devraient permettre d'améliorer la formulation de l'ADN afin de le protéger contre une dégradation prématurée ou encore de faciliter son internalisation dans des cellules cibles.

## **C. Les vaccins cellulaires.**

### **1. Inactivés**

Ces vaccins sont constitués de bactéries ou de virus tués par la chaleur ou par des méthodes chimiques (vaccin cellulaire contre la coqueluche, vaccin contre la grippe, la rage, etc.). Ils possèdent l'avantage d'induire une réponse immunitaire chez la plupart des personnes vaccinées car ils contiennent une grande quantité d'antigènes. Cependant, certains vaccins de ce type peuvent exprimer une certaine toxicité et être la cause d'effets secondaires indésirables.

### **2. Vivants atténués**

L'atténuation de la virulence d'une bactérie ou d'un virus pathogène est dominée par l'exigence d'un équilibre entre une atténuation qui élimine tout symptôme détectable chez l'hôte et la sauvegarde d'un pouvoir infectieux minimum qui suscite une réponse immunitaire protectrice contre la maladie naturelle (Sansone *et al.* 1989).

Il existe cinq méthodes d'atténuation qui sont très inégalement utilisées:

- L'adaptation à un hôte étranger.

Cette technique est plus adaptée à la mise au point de vaccins viraux (contre la rougeole, la rubéole, etc.) étant donné la grande spécificité d'hôte de ces microorganismes (Fenner and Cairns. 1959). On peut néanmoins considérer que le BCG, qui est actuellement le vaccin le plus administré à l'échelle planétaire (WHO. 1992), appartient aussi plus ou moins à cette famille.

- L'adaptation à une température de croissance suboptimale.

Il s'agit là aussi d'une technique utilisée pour l'atténuation de la virulence de virus. Ainsi, des résultats intéressants ont été obtenus à partir de mutants sensibles à la température (ts) et infectant le tractus respiratoire dans lequel les voies supérieures sont à 28-32°C et les voies inférieures à 37°C. En théorie, la croissance de ces mutants ts devrait être restreinte aux voies supérieures où ils pourraient induire une réponse immune locale et systémique avec seulement de légers symptômes (Chanock *et al.* 1980). Des mutants ts ont été obtenus avec le virus de l'influenza et le virus syncytial respiratoire. Malheureusement, leur instabilité génétique freine leur utilisation comme vaccins vivants (Tolpin *et al.* 1982). De même, la stabilité de telles mutations chez les bactéries est discutable. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de tel vaccin disponible chez l'homme.

- Utilisation d'une souche non-pathogène.

Cette approche consiste à utiliser une souche non-pathogène pour l'hôte mais qui est antigéniquement très proche du pathogène contre lequel une protection est recherchée; ce fut le cas pour la variole.

- L'altération d'une ou plusieurs voies métaboliques essentielles.

Une approche rationnelle de l'atténuation de la virulence correspond à l'introduction d'auxotrophies portant sur la biosynthèse de métabolites non disponibles au sein des tissus humains, mais présents au sein des milieux de croissance *in vitro*.

Ainsi, des mutants de *Salmonella typhimurium* auxotrophes pour les purines, l'acide para-aminobenzoïque ou l'aspartate possèdent une virulence réduite chez la souris (Bacon *et al.* 1951). Germanier et Furer (1975) ont obtenu un mutant *galE* de *S. typhi* (Ty21a) qui n'exprime pas l'UDP-galactose-4-épimérase. Il en résulte un défaut de biosynthèse du LPS, structure essentielle à la virulence et à l'immunogénicité, en absence de galactose. En présence de ce sucre, la réduction importante de l'expression d'autres enzymes du métabolisme du galactose entraîne une accumulation d'un dérivé toxique pour la bactérie. Un tel mutant ne peut donc effectuer que deux ou trois générations chez l'hôte humain. Ce vaccin tend cependant à être délaissé du fait des incertitudes sur la nature exacte des lésions génétiques et l'impossibilité de reproduire les brillants résultats du premier essai réalisé en Egypte (Lévine *et al.* 1985). Hoiset et Stocker (1981) ont obtenu un double mutant de *S. typhi*  $\Delta$ aroA,  $\Delta$ purA possédant des mutations dans les gènes de biosynthèse d'acides aminés aromatiques (aroA) et des purines (purA). Ce travail est un parfait exemple de la difficulté à trouver un équilibre entre atténuation de la virulence et maintien de l'immunogénicité. En effet, cette souche vaccinale atténuée est très bien tolérée mais persiste peu de temps dans l'organisme et est très médiocrement immunogène (Lévine *et al.* 1987). De nouveaux mutants sont en cours de développement afin d'obtenir une souche atténuée capable de

survivre suffisamment longtemps dans l'individu vacciné pour induire une immunité systémique ou mucosale suffisante (Chatfield *et al.* 1992).

L'introduction d'une mutation *aroA* a été également réalisée dans d'autres bactéries telles que *Shigella flexneri* (Lindberg *et al.* 1988) ou *Bordetella pertussis* (Roberts *et al.* 1989). Ce dernier exemple sera repris plus en détail dans le chapitre II.

- Altération d'un ou plusieurs gènes spécifiquement impliqués dans la virulence.

Les avancées dans l'étude moléculaire de la pathogénicité de certaines espèces bactériennes sont telles qu'il est possible actuellement de construire des souches vivantes de virulence atténuée en réalisant des mutations très ciblées. Cette méthode d'atténuation est actuellement la plus prometteuse, car probablement la plus sûre, pour une utilisation éventuelle chez l'homme.

Différents vaccins correspondant à cette description sont en cours de développement. C'est le cas notamment de *Vibrio cholerae* où une séquence codant pour la résistance au mercure a été introduite dans l'opéron codant pour la toxine cholérique (Kaper *et al.* 1984). Cependant, ce mutant *tox<sup>-</sup>* provoque des effets indésirables (diarrhées) du fait du maintien de son pouvoir de colonisation de l'intestin grêle. Ceci est un bon exemple de la difficulté à prédire les conséquences d'une atténuation de la virulence. D'autres exemples sont actuellement à l'étude; en particulier *Shigella flexneri* (Phalipon and Sansonetti. 1995) ou *Bordetella pertussis* (cf. Chap II).

Par ailleurs, la construction de vaccins vivants de virulence atténuée permet d'envisager leur utilisation comme vecteurs polyvalents exprimant un ou plusieurs antigènes correspondant à une ou plusieurs espèces responsables de maladies chez l'homme.

#### **D. Les vaccins recombinants vivants.**

Le choix de l'utilisation de microorganismes vivants ou inactivés fait l'objet actuellement d'un débat. Cependant, les vaccins vivants atténués offrent de nombreux avantages. En effet, ces derniers sont souvent plus efficaces que les vaccins inactivés, probablement du fait qu'ils induisent à la fois une réponse immune humorale et cellulaire. Ils peuvent également être administrés au site d'entrée du pathogène naturel, c'est-à-dire au niveau des surfaces muqueuses (intestinales, nasales, vaginales, etc.) où ils peuvent se multiplier et induire une immunité locale. De plus, cette multiplication génère une production prolongée d'antigènes résultant en une meilleure stimulation du système immun. Ces différents atouts ont amené les chercheurs à développer des microorganismes recombinants vivants afin d'exprimer un ou plusieurs antigènes protecteurs hétérologues.



## a. Les virus recombinants.

Les vaccins viraux ont l'avantage de permettre l'expression correcte des antigènes hétérologues d'intérêt par les cellules infectées en utilisant leur machinerie post-traductionnelle.

### - Les poxvirus

Les récents progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis la construction de particules virales capables d'exprimer un ou plusieurs gènes hétérologues. Au moins 17 antigènes viraux, bactériens ou parasitaires ont été exprimés par le virus de la vaccine (WHO. 1989). La stratégie moléculaire entreprise consiste en l'insertion de l'ADNc codant pour la protéine étrangère dans une région non essentielle du génome de la vaccine. Grâce à la grande taille de ce virus, une quantité importante d'ADN peut être introduite permettant la construction de virus recombinant exprimant un, deux, ou plusieurs antigènes. Ainsi, des virus possédant un gène de l'influenza et de l'herpès ou encore de cinq épitopes distincts provenant de quatre antigènes de *Plasmodium falciparum* ont été créés. Une souche atténuée du virus de la vaccine, NYVAC, a été obtenue après délétion de 18 gènes affectant la virulence. Cette souche a été utilisée pour exprimer la glycoprotéine G du virus rabique et elle est actuellement en phase I d'essais cliniques chez les volontaires humains (Pincus *et al.* 1995).

### - Les adénovirus.

Le vaccin actuel contre la maladie respiratoire aiguë, administré par voie orale, est constitué de deux souches non-atténuées et protège à plus de 95% les individus vaccinés. Les adénovirus (virus à ADN) ont un génome de petite taille ce qui limite la quantité d'ADN hétérologue qui peut être insérée. Cependant, de nombreux adénovirus recombinants ont été construits (Randrianarison-Jewtougoff and Perricaudet. 1995). Ils possèdent, par exemple, les gènes codant pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) ou encore les protéines de structure Env et Gag ainsi que la protéine de régulation Rev du VIH. Cependant, les adénovirus sont abondants dans la nature et une immunité préexistante chez l'homme pourrait diminuer l'efficacité d'un vaccin basé sur l'utilisation d'un adénovirus recombinant vivant.

### - Les poliovirus.

Ces virus sont des virus à ARN. La manipulation génétique de ces 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). L'un des avantages majeur est l'expérience acquise durant plus de 25 ans dans la production, le contrôle et l'utilisation des vaccins constitués du poliovirus vivant. Cependant, l'instabilité génétique des virus recombinants limite fortement le développement de tels vaccins.

## b. Les vecteurs bactériens.

Un des avantages que possèdent les bactéries par rapport aux vecteurs viraux est qu'elles peuvent être potentiellement contrôlées par des antibiotiques. Les problèmes de dissémination accidentelle ou d'effets indésirables chez les sujets immunodéprimés sont ainsi moins critiques. De plus, le génome bactérien ne présente pas de restriction au niveau du nombre de gènes étrangers qui peuvent y être insérés. Cependant, les bactéries peuvent également être considérées comme des associations complexes de nombreux antigènes, avec tous les effets indésirables potentiels qui en résultent.

Les vaccins bactériens vivants possèdent trois caractéristiques et atouts majeurs:

- Ils expriment des immunogènes importants, consistant en des déterminants antigéniques propres à la bactérie et essentiels pour induire les réponses immunes souhaitées.
- Ce sont des vecteurs dans lesquels sont exprimés des antigènes hétérologues.
- Ils correspondent à un système d'expression, consistant en des éléments génétiques permettant l'expression correcte d'antigènes étrangers.

Actuellement, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont probablement les bactéries dans lesquelles l'expression d'antigènes hétérologues est la plus couramment réalisée. D'autres espèces bactériennes, parmi elles BCG (Gicquel. 1995), *Shigella flexneri* (Phalipon and Sansonetti. 1995), *Streptococcus gordinii* (Medagliani *et al.* 1995) ou *Bordetella pertussis* qui fait l'objet de ce travail, sont en cours d'étude afin d'être utilisées comme vecteur.

Cependant, différents problèmes sont apparus lors de l'expression d'antigènes étrangers par *E. coli* et *S. typhimurium*. En effet, de nombreux cas de protéines toxiques pour la bactérie ont été mis en évidence. La quantité d'antigènes hétérologues exprimée par la bactérie reste limitée, et le gène hétérologue, généralement porté par un plasmide, reste instable.

Le premier problème peut être résolu en utilisant des promoteurs inductibles *in vivo*, ce qui se traduit par l'expression de la protéine étrangère uniquement lorsque la bactérie se trouve dans l'organisme receveur. Afin d'augmenter la production de l'antigène hétérologue, un promoteur fort peut être inséré devant le gène d'intérêt. Enfin, la stabilité du transgène peut être obtenue après insertion dans le chromosome de la bactérie.

Une autre solution consiste à insérer l'ADNc codant pour l'antigène étranger dans le gène codant pour une protéine de la bactérie de manière à obtenir l'expression d'une protéine hybride. Le choix de cette protéine bactérienne peut être essentiel pour induire une réponse immune efficace contre l'antigène étranger. Bien souvent, on essaie de tirer avantage de quelques unes des propriétés intrinsèques de la protéine choisie, telles que l'expression à la surface de la bactérie ainsi que la capacité de sécrétion et la facilité de purification. D'autre

## Quelques vaccins mucosaux en cours de développement.

Les maladies	Les pathogènes	Les vecteurs vaccinaux
choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	Bactéries vivantes atténuées ou inactivées
Diarrhées	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigénique rotavirus <i>Clostridium difficile</i> espèces de <i>Shigella</i>	microsphères, bactéries vivantes atténuées microsphères, virus vivants atténués <i>Shigella</i> recombinant vivant microsphères, bactéries vivantes atténuées
Fièvre typhoïde	<i>Salmonella typhi</i>	bactéries vivantes atténuées
infections du tractus respiratoire supérieure	virus parainfluenza	microsphères, virus vivants atténués
grippe	virus influenza	microsphères, virus vivants atténués
pneumonies	virus syncitial respiratoire <i>Streptococcus pneumoniae</i>	microsphères, virus vivants atténués <i>Salmonella</i> vivante recombinante
maladie de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i>	BCG vivant recombinant
SIDA	VIH	<i>Salmonella</i> et poliovirus vivants recombinants, microsphères, adjuvants
carries dentaires	<i>Streptococcus mutans</i>	microsphères, adjuvants
rage	virus de la rage	adénovirus recombinant
mononucléose	virus d'Epstein-Barr	adénovirus recombinant

Table 1: D'après Service *et al.* 1994.

part, il est important de ne pas modifier les fonctions et la structure générale de la protéine dans laquelle est insérée des séquences étrangères. Les sites permissifs, dans lesquels l'insertion d'épitopes hétérologues peut être réalisée sans effet délétère majeur, sont en général situés au niveau des boucles et des régions N- et C-terminales de la protéine (domaines plus flexibles).

## **V. L'administration par voie muqueuse.**

Les microorganismes pathogènes peuvent infecter leur hôte par plusieurs mécanismes. Ils peuvent pénétrer par une blessure au niveau de la peau, être introduits par des vecteurs de transmission comme les insectes, ou ils peuvent interagir avec les muqueuses. Ainsi, pour la majorité des pathogènes, le premier contact avec l'hôte se fait au niveau des surfaces muqueuses. Les défenses immunes spécifiques et non-spécifiques y jouent un rôle important puisqu'elles représentent la "première ligne" de défense.

Exploiter ces mécanismes immunitaires revêt toute son importance dans le cadre d'une stratégie vaccinale. Ainsi, le développement de nouveaux vaccins administrables par voie mucosale représente un des enjeux prioritaires des prochaines décennies (tableau 1).

### **A. Les avantages de l'immunisation muqueuse.**

L'exploitation du système immunitaire muqueux offre plusieurs avantages.

Les cellules du système immunitaire, stimulées au niveau d'une surface mucosale suite à une vaccination, peuvent se disséminer vers d'autres muqueuses. L'administration par voie orale ou nasale peut donc être utilisée contre un large spectre d'infections mucosales. Cette voie d'immunisation peut également induire une réponse sérique élevée.

L'innocuité et la minimisation des effets indésirables peuvent être augmentées par l'utilisation de stratégies vaccinales impliquant une administration par voie muqueuse. En effet, la plupart des effets indésirables associés à la vaccination sont dus à l'administration parentérale de vaccins cellulaires inactivés, comme c'est le cas, par exemple du vaccin contre la typhoïde (Editorial. Lancet. 1992). L'administration par voie muqueuse de vaccins contenant du LPS ou d'autres toxines peut réduire les problèmes observés suite à l'administration de ces vaccins par voie systémique.

De plus, l'administration par voie muqueuse diminue le besoin en personnel et en équipement requis pour les injections, élimine le problème de contaminations dues à une mauvaise utilisation des seringues, et pourrait également rendre possible cette administration vaccinale à domicile. Ces avantages seraient non seulement bénéfiques pour les PVD, mais

pourraient également augmenter l'accessibilité et l'acceptation des vaccinations dans les pays industrialisés.

D'autre part, la vaccination par voie muqueuse pourrait accentuer l'efficacité des vaccins chez les personnes âgées. En effet, il a été montré chez la souris que le système lymphoïde associé aux muqueuses diffère du système systémique par le fait qu'il n'entraîne pas de dysfonctionnement associé à l'âge (Szewczuk *et al.* 1981) et qu'il reste immunologiquement efficace à un temps où l'immunité systémique diminue (Garg and Subbarao. 1992).

A l'autre extrémité de la courbe d'âge, la persistance des anticorps maternels peut interférer avec les vaccins administrés par voie parentérale, comme ce fut le cas avec la vaccination contre la rougeole chez les enfants âgés de moins de 9 mois (Weiss *et al.* 1992). L'immunisation par voie muqueuse pourrait être plus sûre et efficace chez les enfants de moins de 6 mois comme pour le vaccin vivant contre la poliomyélite administré à la naissance.

La vaccination par voie muqueuse peut également faciliter l'éradication de quelques maladies causées par des pathogènes qui persistent chez l'hôte par une colonisation asymptomatique des surfaces muqueuses. C'est le cas notamment de *B. pertussis* (cf. Chap II) ou encore d'*Haemophilus influenza* de type B. Ainsi, l'introduction d'un vaccin contre ce dernier microorganisme aux États-Unis dans le milieu des années 80 a réduit de plus de 85% l'incidence des méningites dues à cette infection (Shapiro. 1993).

D'autre part, du fait du développement prochain d'un grand nombre de nouveaux vaccins, les protocoles d'immunisation risquent de devenir de plus en plus complexes, à moins que la plupart de ces vaccins soient associés (Report European Commission COST/STD Initiative. 1996). Cependant, cette association sera limitée par la quantité de matériels qui peut être injectée parentéralement à des enfants. De plus grands volumes peuvent être administrés par voie muqueuse et l'administration de quelques vaccins muqueux réduirait le nombre de vaccins injectés par voie parentérale.

## **B. Le système immun muqueux: généralités.**

Les muqueuses représentent chez les vertébrés le système physiologique correspondant à la plus grande surface du corps (environ 400 m<sup>2</sup> chez l'homme). Cette vaste surface est en perpétuel contact avec nombre de microorganismes et il n'est pas surprenant que les tissus muqueux présents sous l'épithélium soient constitués d'une forte population de cellules du système immunitaire.

Table 2:

### **Composants du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)**

---

l'intestin (GALT)  
l'arbre bronchique (BALT)  
l'aire nasopharyngée (NALT)  
les glandes mammaires  
les glandes salivaires et lacrimales  
les organes génitaux  
l'oreille interne

---

D'après Croitoru and Bienenstock. 1994.

Le système immunitaire muqueux diffère du système systémique de par son organisation, par les mécanismes d'interaction des antigènes avec les cellules participant à l'élaboration de la réponse immunitaire, et enfin par les anticorps sécrétés, principalement les IgA sécrétées (IgAs) (Kraehenbuhl and Neutra. 1992).

### **a. Organisation du tissu lymphoïde associé aux muqueuses.**

Le concept du système immunitaire muqueux commun a été suggéré pour la première fois par Tomasi *et al* (1965) puis s'est affirmé dans les années 1980 (McDermott and Bienenstock; 1979; Mestecky. 1987). Ce système est constitué du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT pour "Mucosa-Associated Lymphoid Tissue") qui inclut différents composants (Tableau 2) parmi lesquels les muqueuses intestinales et du tractus respiratoire représentent une part majeure.

- Les muqueuses intestinales ou GALT ("Gut-Associated Lymphoid Tissue").

L'intestin correspond à la composante la plus vaste du MALT. Le GALT est constitué d'agrégats lymphoïdes représentés notamment par les plaques de Peyer au niveau de la lamina propria et de l'épithélium intestinal, par l'appendice et par les ganglions mésentériques. Les lymphocytes intraépithéliaux et ceux présents dans la lamina propria sont considérés comme faisant également parti du GALT. Ce tissu lymphoïde contient 70 à 80% de toutes les cellules productrices d'anticorps et il produit plus d'IgA sécrétées que la production totale d'IgG au niveau du corps humain (Brandtzaeg. 1989).

- Les muqueuses bronchiques ou BALT ("Bronchus- Associated Lymphoid Tissue").

Les similarités structurales entre le BALT et le GALT (Bienenstock *et al.* 1973) ont permis, par extension, une meilleure compréhension de l'immunité au niveau du tractus respiratoire. Certaines différences observées entre les deux structures lymphoïdes, souvent de nature quantitative, ont été expliquées par l'existence d'un lien entre le taux d'agrégats lymphoïdes et le nombre de stimuli antigéniques (Delventhal *et al.* 1992). Le BALT est séparé de la lumière bronchique par un épithélium cilié recouvert de mucus et de sécrétions contenant des anticorps (principalement des IgAs) ainsi que quelques substances possédant des activités antimicrobiennes (lysozyme, transferrine, etc.). De même que dans les plaques de Peyer, on trouve des cellules épithéliales spécialisées dans la capture et le transport des antigènes à travers la membrane épithéliale, les cellules M (membranaires) (Siebers and Finlay. 1996). La surface basolatérale des cellules M est fortement invaginée de manière à former une large "poche" intra-épithéliale. Cette structure raccourcit la distance entre la surface apicale et basolatérale et assure ainsi une transcytose rapide et efficace. De nombreux types

cellulaires ont été identifiés dans la poche des cellules M. On y trouve des lymphocytes B et T ainsi qu'un petit nombre de macrophages. La plupart des cellules T sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, contrairement aux cellules B qui sont constituées pour la moitié de cellules B naïves.

### **b. Présentation des antigènes au MALT.**

Les cellules M présentes dans l'épithélium et associées aux follicules permettent aux antigènes de franchir la barrière muqueuse par transcytose et d'entrer ainsi en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B) et/ou d'être traités et présentés directement par les cellules épithéliales aux cellules B et T sous-jacentes. Parmi les CPA présentes dans les poumons, les macrophages constituent une population cellulaire majoritaire. Au niveau du tractus respiratoire inférieur, on trouve notamment des macrophages alvéolaires résidents. Cependant, ceux-ci ne semblent jouer qu'un rôle mineur en tant que CPA et sont inefficaces pour stimuler la prolifération des cellules T (Lyons *et al.* 1986). Au niveau du tractus respiratoire inférieur et supérieur, on trouve un autre type de CPA, les cellules dendritiques, qui constituent un réseau équivalent à celui des cellules de Langherans au niveau du derme (Holt *et al.* 1990). Elles correspondent, dans des conditions normales, à la majorité des cellules présentant un CMH de classe II. Durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, les précurseurs des cellules dendritiques sont recrutés et vont s'installer au niveau de l'épithélium où ils vont se différencier en cellules dendritiques résidentes (McWilliam *et al.* 1994).

D'autre part, le mouvement transépithélial via les cellules M peut être exploité par certaines bactéries ou virus pour envahir plus facilement l'organisme hôte. C'est notamment le cas de *Salmonella*, de *Shigella* ou de *Vibrio cholerae* au niveau de l'épithélium intestinal ou encore du VIH au niveau des surfaces vaginales (Neutra and Kraehenbuhl. 1992). Les interactions des cellules M présentes dans le tractus respiratoire avec les pathogènes respiratoires restent, elles, encore très peu connues.

Il a également été montré que les immunoglobulines sont capables de se lier aux cellules M. Cette fixation permet le transport d'immun-complexes IgA-antigène à travers la barrière épithéliale pour potentiellement restimuler une réponse pré-existante (Kraehenbuhl and Neutra. 1992).



### c. Les réponses immunes induites au niveau du MALT.

Après interaction de l'antigène avec les cellules accessoires et reconnaissance par les cellules T auxiliaires, puis stimulation des lymphocytes B au niveau du tissu lymphoïde local, une réponse immune va être mise en place. Deux types de réponse peuvent se développer soit de manière concomitante soit séparément: la formation d'anticorps (principalement des IgAs) et l'induction d'une immunité à médiation cellulaire.

#### 1. Maturation des cellules B en plasmocytes producteurs d'IgA.

Les immunocytes sensibilisés, en particulier les cellules B mais probablement aussi les cellules T, vont quitter leur site d'induction et entrer dans la circulation systémique. Les lymphocytes vont alors atteindre leur site effecteur qui sera soit leur site d'induction initial soit un autre site muqueux tel que la lamina propria du tractus intestinal, respiratoire ou urogénital où ils seront sélectivement retenus. Ce phénomène est dû à la présence de récepteurs site-spécifiques présents sur les cellules lymphoïdes issues des muqueuses et à leurs structures complémentaires, les "addressines" tissu-spécifiques, associées aux cellules endothéliales vasculaires. Ce processus pourrait expliquer l'unité des réponses immunes au niveau du MALT qui est à l'origine du concept de système immunitaire muqueux commun, ainsi que la ségrégation des mécanismes immunitaires aux niveaux muqueux et systémique. Leur site effecteur atteint, les cellules B vont proliférer sous l'influence de cytokines produites par des cellules telles que les lymphocytes T ou les CPA, et être maturées en plasmocytes producteurs d'IgA. Ainsi, le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) et l'interleukine 10 (IL-10) semblent être impliqués dans la commutation isotypique des cellules B en plasmocytes producteurs d'IgA. L'IL-5, l'IL-4 en association avec l'IL-5, l'IL-2 et l'IL-6 semblent, elles, stimuler la sécrétion d'IgA *in vitro*, mais seul le rôle de l'IL-5 a pu être montré *in vivo* (Lebman and Coffman. 1994).

Des études chez la souris, et plus récemment chez l'homme, ont montré que la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut être divisée en deux sous-populations qui se distinguent par la nature des cytokines qu'elles produisent et par leur rôle dans la réponse immune (Mosmann and Coffman. 1989).

- Les lymphocytes Th1, qui produisent notamment l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et l'IL-2, et qui sont principalement responsables de la réponse immune à médiation cellulaire.
- Les lymphocytes Th2, qui produisent l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-10, et qui sont impliqués dans l'induction d'une réponse humorale.

Aucune ségrégation claire entre les sous-populations Th1 et Th2 n'a pu être encore établie au niveau muqueux chez l'homme, en partie du fait de la diversité des stimuli antigéniques et du répertoire des cellules T correspondantes

## Fonctions potentielles des IgA sécrétoires

---

- L' "exclusion immune" comprend:
    - l'inhibition de l'adhérence et de la colonisation des bactéries.
    - l'inhibition de l'adhésion des virus sur les cellules épithéliales et leur neutralisation au niveau intracellulaire.
    - la neutralisation des enzymes et des toxines.
    - l'inhibition de l'absorption d'antigènes (ingérés ou inhalés)
  
  - L'interaction avec des facteurs anti-bactériens non-spécifiques
  
  - La stimulation de la réponse immune par:
    - la facilitation de la capture des antigènes par les cellules M.
    - la stimulation des lymphocytes par des anticorps anti-idiotype (rôle du lait maternel).
  
  - La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)
- 

D'après Holmgren *et al.* 1992.

## 2. Rôle des IgA sécrétoires.

La réponse immune produite au niveau des muqueuses est caractérisée par la présence d'IgAs. La formation de ces immunoglobulines et leur transport jusqu'aux sécrétions mucosales impliquent une coopération entre les plasmocytes, producteurs d'IgA maintenues sous forme de dimère par la chaîne J, et les cellules épithéliales des muqueuses qui produisent la pièce sécrétoire. La fixation de cette dernière stabilise les IgAs et masque les sites sensibles à la protéolyse, rendant cette immunoglobuline particulièrement adaptée à sa "survie" dans l'environnement muqueux riche en protéases.

Les IgAs vont jouer plusieurs rôles distincts dans la défense muqueuse (Tableau 3):

- Ces anticorps représentent une barrière immune qui va empêcher l'adhérence des bactéries sur les cellules épithéliales (Svanborg and Svennerholm. 1978).
- Ces IgAs semblent, de plus, avoir non seulement la capacité de prévenir une infection virale en empêchant les virus de pénétrer dans les cellules épithéliales de l'hôte (Outlaw and Dimmock. 1990), mais de posséder également la propriété de les neutraliser au niveau intracellulaire (Mazanec *et al.*1993). Ce mécanisme permettrait d'interrompre la réplication virale tout en épargnant la vie des cellules infectées, contrairement au processus mettant en jeu l'immunité à médiation cellulaire qui aboutit à la destruction de la cellule infectée.
- L'inhibition de l'activité de certaines enzymes ou toxines par les IgAs a été démontré dans plusieurs systèmes. Cet effet résulte d'un simple encombrement stérique du site de fixation des enzymes à leur substrat ou à leur cellule cible (Lycke *et al.*1987; Smith *et al.* 1985).
- Enfin, l'absorption excessive d'antigènes (provenant, par exemple, de l'alimentation) est diminuée par la présence des IgAs.

L'ensemble de ces activités est regroupé sous le nom d'"exclusion immune".

Les IgAs peuvent également agir en synergie avec des facteurs non-spécifiques pour détruire ou inhiber la croissance des bactéries. C'est le cas, par exemple, avec la lactoferrine, la lactoperoxydase et probablement le lysozyme.

De plus, la présence des IgAs peut stimuler la réponse immune. En effet, la formation des complexes IgA-antigène permet une capture et un transport plus efficace de l'antigène par les cellules M vers le MALT.

## 3. L'immunité à médiation cellulaire.

Des mécanismes tels que la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T (CTL) (particulièrement efficace pour l'élimination des cellules infectées par des virus), la cytotoxicité

dépendante d'anticorps (ADCC), et l'activité des cellules Natural Killer (NK) peuvent se développer au niveau des tissus muqueux, en particulier au niveau de l'épithélium gastro-intestinal (McGhee *et al.* 1992).

#### 4. La tolérance immune.

L'administration d'un antigène par voie mucosale, notamment par ingestion ou inhalation, peut également conduire au développement d'une tolérance immune vis-à-vis de cet antigène. Ce phénomène est caractérisé par le fait qu'un animal ayant avalé ou inhalé un antigène peut devenir réfractaire ou peut voir sa capacité à développer une réponse immune diminuée quand il est réexposé au même antigène administré par voie systémique. Ce mécanisme physiologique naturel se révèle très important pour éviter, par exemple, l'induction de réactions inflammatoires de type retardé (DTH) aux différentes substances alimentaires ingérées. De nombreux travaux sont actuellement en cours afin de tirer parti de ce phénomène pour développer de nouveaux vaccins anti-inflammatoires et des immunothérapies contre des maladies telles que certains désordres auto-immuns, des allergies, ou encore le rejet d'allogreffes. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus chez l'animal contre l'encéphalite auto-immune, l'arthrite rhumatoïde, ou encore le diabète auto-immun après induction d'une tolérance orale obtenue par administration d'un antigène spécifique couplé à la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) (Sun *et al.* 1994, 1996). L'usage de la CTB permet de réduire considérablement la dose élevée d'antigènes classiquement nécessaires à l'obtention d'une tolérance par voie orale, ainsi que la fréquence des ingestions (Czerkinsky and Holmgren. 1995).

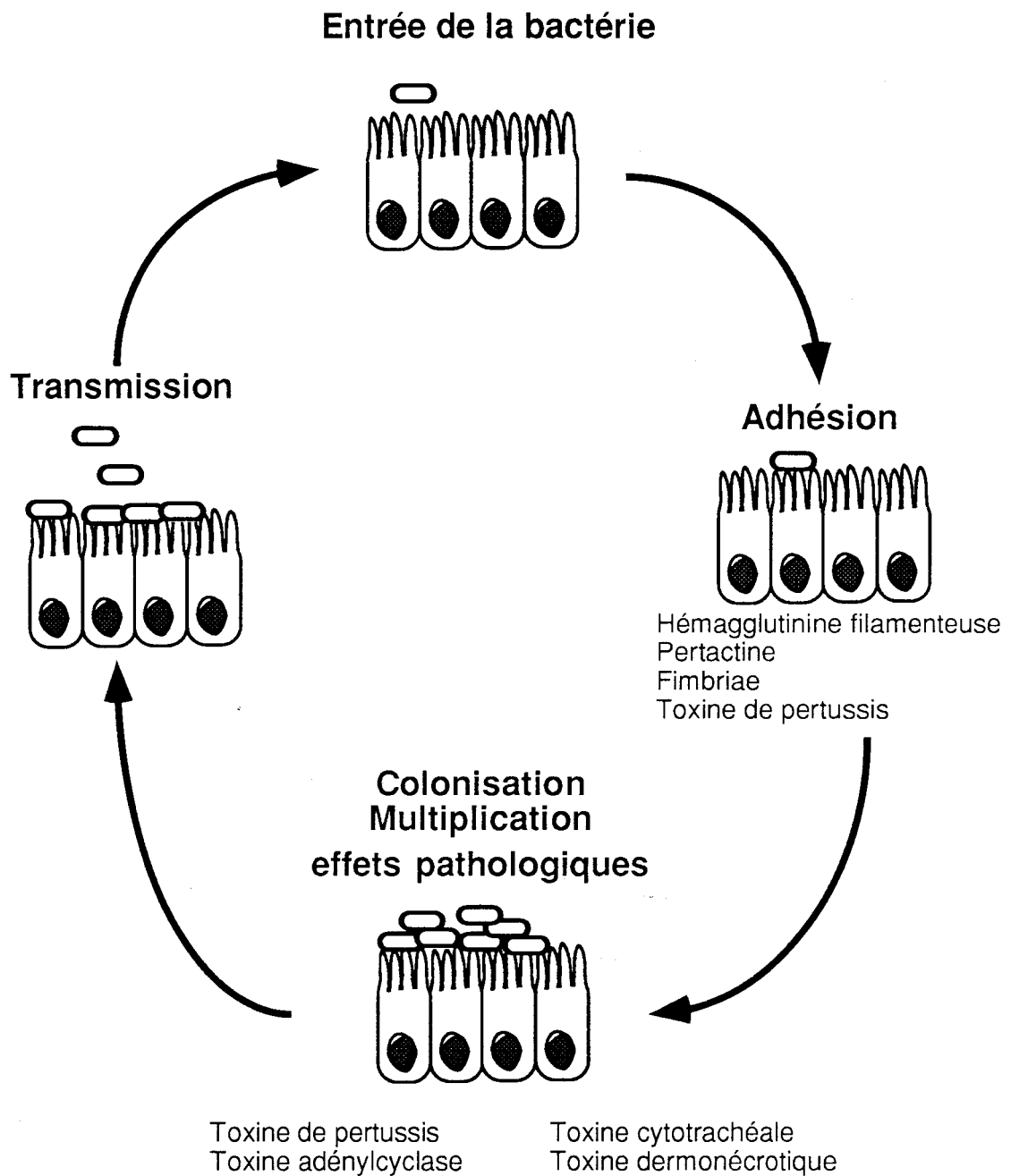
## *Chapitre II*

### *Bordetella pertussis*

La coqueluche est une maladie respiratoire décrite dès l'antiquité par Hippocrate. C'est en 1906 que J. Bordet et O. Gengou ont isolé en culture l'agent responsable de cette maladie, une bactérie à Gram négatif aérobie stricte, *Bordetella pertussis*, à partir des sécrétions respiratoires des malades. Par la suite d'autres espèces bactériennes ont été reconnues, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella bronchiseptica*. *Bordetella parapertussis* est responsable d'environ 10% des cas de coqueluche, maladie habituellement plus bénigne que celle provoquée par *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* est essentiellement un pathogène responsable de maladies chez des animaux tels que le porc ou le chien. Les infections humaines provoquées par cette espèce sont rarissimes et ne s'observent en règle générale que chez les sujets immunodéprimés.

#### **I. La coqueluche.**

La coqueluche reste, en 1996, une maladie infectieuse d'actualité en France et dans le monde. La contamination se fait par voie aérienne, par projection de sécrétions muqueuses lors de toux. La durée d'incubation est de 7 à 10 jours. Elle est suivie par une période d'une dizaine de jours marquée par des éternuements, un léger écoulement nasal, un malaise général et une anorexie. Durant cette période, les sécrétions respiratoires des malades sont riches en bactéries de la coqueluche et la maladie est, à ce stade, hautement contagieuse. La toux apparaît en général à la fin de cette phase qui dure 1 à 2 semaines. Elle est caractérisée par des quintes convulsives et spasmodiques. La phase de déclin, qui survient 2 à 3



**Fig 1: Cycle infectieux de *Bordetella pertussis*.**

Quelques uns des principaux facteurs de virulence impliqués sont figurés pour chaque étape du cycle.

semaines plus tard, est annoncée par la diminution du nombre et de l'intensité des quintes de toux.

La mortalité est estimée à 500 000 décès par an dans le monde, principalement chez les nourrissons. Elle est élevée dans les PVD où la vaccination est insuffisante. D'autre part, dans les pays industrialisés où la vaccination anti-coqueluche a été largement utilisée, on observe une résurgence de la maladie due à un affaiblissement au cours du temps de l'immunité post-vaccinale en l'absence de rappel tardif (Flament-Saillour and Peronne. 1996).

## **II. Les facteurs de virulence de *Bordetella pertussis*.**

La pathogénie bactérienne est le résultat de l'expression, généralement de manière coordonnée, de facteurs de virulence qui vont permettre aux bactéries de reconnaître et de répondre de façon appropriée aux différents changements de leur environnement. Cette virulence va s'exprimer à chaque stade du cycle infectieux (Fig.1). La première étape consiste, pour la bactérie, à trouver la porte d'entrée dans l'hôte, soit au niveau des surfaces muqueuses, soit par une lésion superficielle de l'épiderme. Par la suite, la bactérie devra trouver au sein de l'hôte une niche écologique optimale, c'est-à-dire un tissu ou un organe procurant l'environnement le plus favorable à sa multiplication. Cette phase nécessite la production de facteurs d'adhérence spécifiques de manière à établir un foyer infectieux. La bactérie doit alors être capable de capter les nutriments nécessaires à sa croissance et à sa multiplication. Finalement, le microorganisme pathogène devra quitter son hôte initial pour se transmettre à un nouvel hôte susceptible.

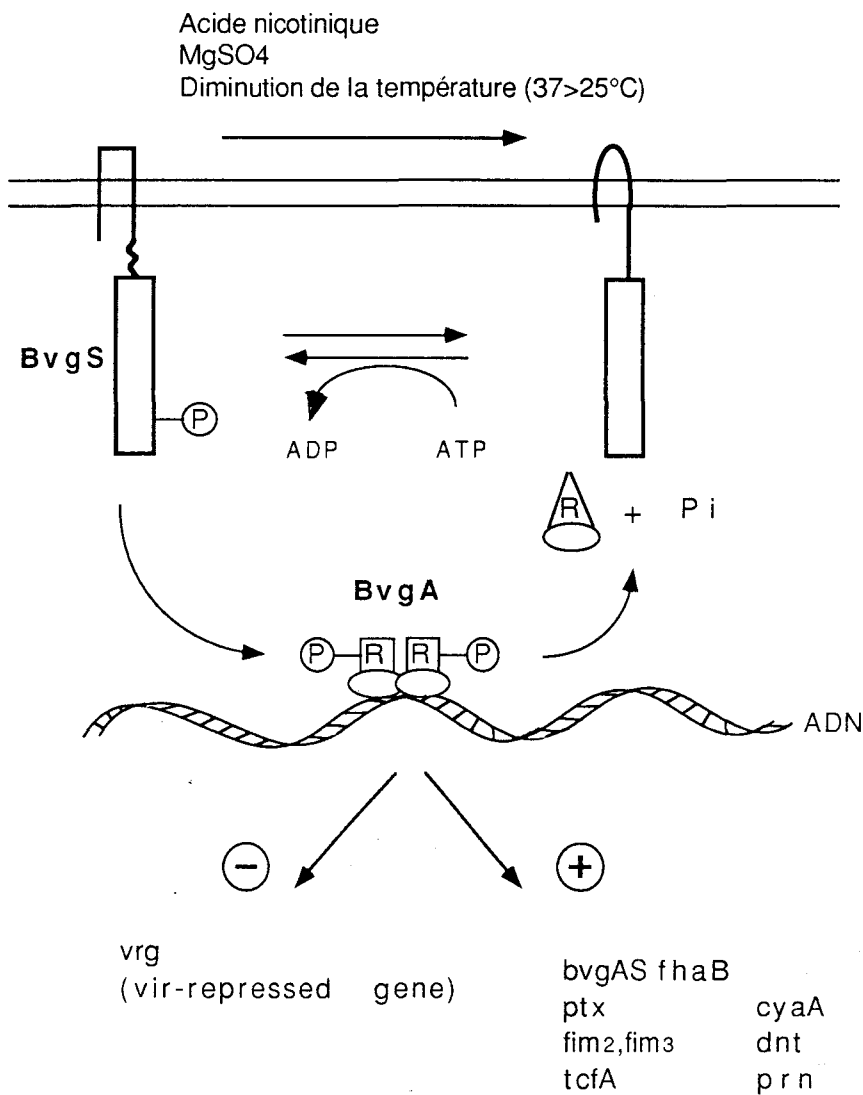
Pour répondre aux différentes modifications environnementales rencontrées lors de leur cycle infectieux, les bactéries ont développé des systèmes de régulation qui leur permettent de réagir à ces modifications par l'expression coordonnée d'un ensemble de gènes.

### **A. La régulation de l'expression des facteurs de virulence chez *B. pertussis*.**

Les gènes de virulence de *B. pertussis* sont régulés de deux manières: la variation de phase et la modulation phénotypique.

#### **a. La modulation phénotypique.**

Ce mécanisme correspond à une régulation transcriptionnelle des gènes de virulence. L'expression de ces gènes est ainsi plus élevée à 37°C et est supprimée quand la



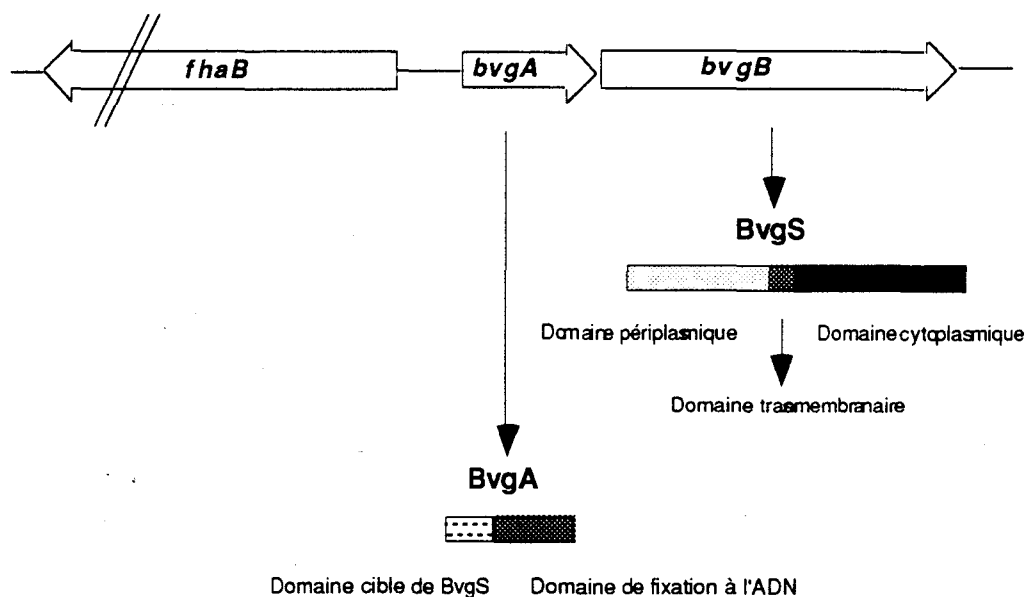
**Fig 2: Mécanisme d'action proposé du système BvgAS**  
(D'après Akerley *et al.* 1996)

fhaB=hémagglutinine filamenteuse, ptx=toxine de pertussis, cyaA=toxine adénylcylase, fim2,fim3=sous-unités des fimbriae, dnt=toxine dermonécrotique, tcfA=toxine cytotrachéale, prn=pertactine.



croissance des bactéries est réalisée à température plus faible ou dans un milieu contenant des taux élevés de sulfate de magnésium ou d'acide nicotinique.

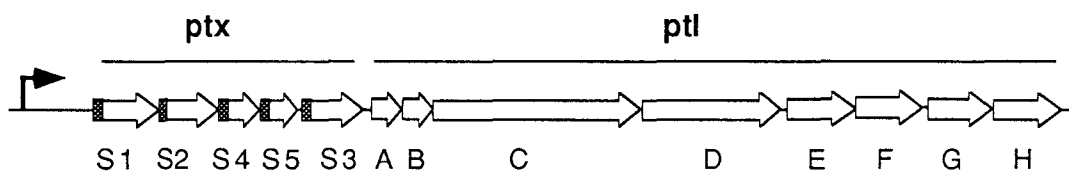
La synthèse des principaux facteurs de virulence chez *B. pertussis* est ainsi régulée de manière coordonnée par les produits du locus *bvg*, pour "Bordetella virulence gene" (autrefois appelé *vir* pour "virulence"), BvgA et BvgS (Coote *et al.* 1991).



### carte physique du locus *bvg* de *B. pertussis* (D'après Stibitz, S. 1992)

La séquence en acides aminés de ces deux protéines BvgA et BvgS montre des similarités avec la famille des protéines régulatrices à deux composants formés d'un senseur, qui réagit aux modifications de l'environnement, et d'un régulateur qui module la transcription des gènes de virulence. Le senseur et le régulateur sont tous deux constitués de domaines ayant des fonctions spécifiques. Ainsi, BvgS serait une protéine transmembranaire possédant un domaine N-terminal périplasmique qui percevrait certaines modifications du milieu extérieur et les transmettrait à BvgA, en l'activant par phosphorylation (Fig.2). BvgA transactiverait ensuite les gènes des différents facteurs de virulence de *Bordetella* (Boucher *et al.* 1994).

Les gènes qui sont activés par les produits du locus *bvg* sont appelés *vag*, pour "vir-activated gene", tandis que les gènes dont l'expression est réprimée sont appelés *vrg*, pour "vir-repressed gene". Récemment, deux gènes *vrg* ont été isolés (Beattie *et al.* 1991). La perte de l'un de ces gènes, nommé *vrg-6* et codant pour une protéine de 11,4 kDa, entraîne



**Fig 3: Représentation schématique du locus ptx et ptl.**

Les flèches montrent le sens et la taille relative des régions codantes pour les différentes sous-unités de PTX (S1 à S5), les boîtes hachurées représentant le peptide signal, et les différentes protéines du système de sécrétion (A à H). La flèche en trait gras indique la position du promoteur de ptx et ptl. D'après Kotob *et al.* 1995.

une réduction de la capacité de la bactérie à coloniser le tractus respiratoire de la souris. Une insertion dans l'autre gène, *vrg-18*, n'a pas d'effet détectable sur la virulence chez la souris.

### **b. La variation de phase.**

L'expression des facteurs de virulence chez *B. pertussis* est régulée par un second type de mécanisme appelé variation de phase (Willems *et al.* 1990). Des mutants avirulents (Vir-) peuvent être obtenus à partir de souches virulentes (Vir+) à une fréquence d'environ 1 pour 10<sup>6</sup> bactéries. Cette variation de phase n'est pas simplement un artefact de laboratoire, puisque des souches avirulentes de *B. pertussis* sont fréquemment isolées chez des enfants atteints de coqueluche. De récents travaux ont montré que cette variation de phase pouvait être observée lors de l'entrée de la bactérie dans les macrophages. Ces résultats suggèrent que les gènes activés par le système BvgS/ BvgA sont importants pour l'adhérence et la phase initiale de colonisation du tractus respiratoire, alors qu'ils deviennent néfastes à la survie intracellulaire de bactérie. Ainsi, *B. pertussis* passerait d'une phase virulente (Vir+) à une phase avirulente (Vir-) une fois phagocytée.

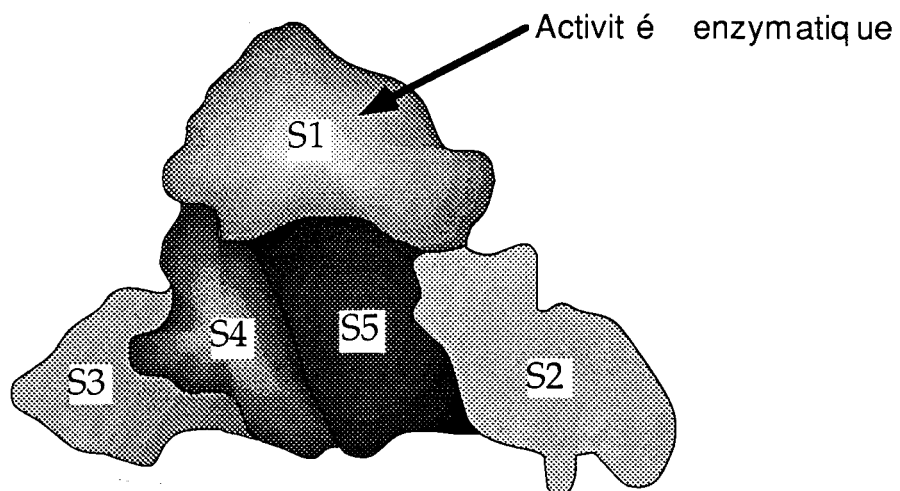
## **B. La toxine de pertussis.**

*B. pertussis* produit plusieurs toxines qui vont participer à la pathogénèse mais également à l'acquisition d'une immunité protectrice contre la maladie. Parmi elles, la toxine de pertussis (PTX) est un des facteurs de virulence majeur sécrété par la bactérie.

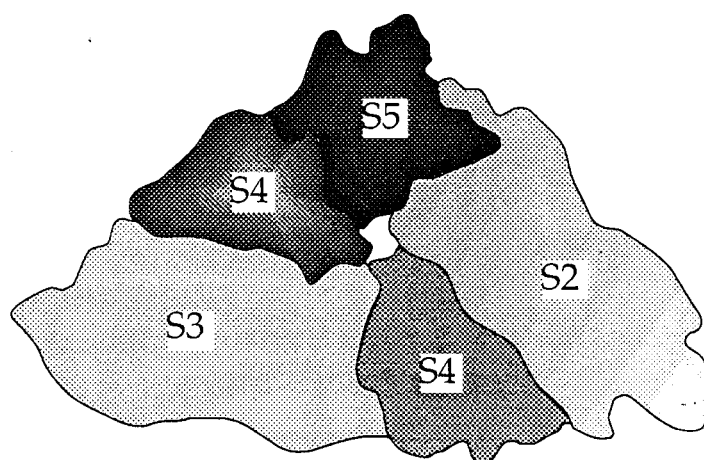
### **a. Génétique de la toxine de pertussis.**

La PTX est une protéine hexamérique composée de 6 sous-unités, nommées S1 à S5, S4 étant présente en deux exemplaires. Les gènes codant pour les différentes sous-unités de la toxine sont organisés en un opéron (*ptx*) polycistronique de 3,2 kb. Les différentes sous-unités sont transcrites dans l'ordre suivant: S1, S2, S4, S5, et S3 (Locht and Keith. 1986; Nicosia *et al.* 1986) (Fig.3).

Les gènes codant pour chacune des sous-unités sont précédés par une séquence codant pour un peptide signal, suggérant que chaque sous-unité est sécrétée séparément dans le périplasme. Les différentes sous-unités vont alors s'assembler en une holotoxine mature qui sera sécrétée activement dans le milieu extracellulaire par *B. pertussis*. Un ensemble de 8 gènes (*ptI*), situés directement en aval de l'opéron *ptx*, code pour des protéines nécessaires à la sécrétion de PTX (Weiss *et al.*1993; Johnson and Burns. 1994).



Vue transversale de PTX



Vue supérieure de PTX

Fig 4: Modèle d'après la structure tridimensionnelle de la toxine de pertussis (PTX)

De récents travaux (Kotob *et al.* 1995; Ricci *et al.* 1996) ont montré que le promoteur de *ptx* est essentiel pour l'expression des gènes *ptl* et suggèrent l'existence d'un opéron *ptx* plus grand que celui précédemment décrit et qui comprendrait à la fois les gènes *ptx* et *ptl*.

### **b. Structure protéique.**

PTX est une protéine hexamérique de 105 kDa. Elle possède une organisation de type A-B similaire à celle observée chez d'autres toxines bactériennes, telles que la toxine de *Vibrio cholerae* ou l'entérotoxine d'*Escherichia coli* (Tamura *et al.* 1982). Le protomère A ("actif") est constitué de la sous-unité S1 (26 kDa) qui porte l'activité enzymatique de PTX ce qui lui confère la plupart de ses activités biologiques (Ui, 1988). L'oligomère B ("binding") est formé de deux dimères, D1 composé de S2 (22 kDa) et S4 (12 kDa), et D2 formé de S3 (22 kDa) et S4 (12 kDa). D1 et D2 sont reliés par la sous-unité S5 (11 kDa) (Fig.4). La toxine se fixe via l'oligomère B à un récepteur membranaire et permet l'internalisation de la sous-unité S1 (Tamura *et al.* 1983). Ces propriétés d'adhésion sont portées par les sous-unités S2 et S3. Bien qu'elles possèdent une homologie dans leur séquence d'acides aminés (Locht and Keith, 1986), ces deux sous-unités semblent cependant reconnaître des récepteurs cellulaires structurellement distincts (Tuomanen *et al.* 1988; Witvliet *et al.* 1989). Ainsi, Lobet *et al.* (1993) ont montré qu'un résidu asparagine en position 105 (Asn 105) dans S2 était important pour la fixation de PTX aux syalglycoprotéines, alors que le résidu analogue Lys 105 de S3 était impliqué dans l'interaction avec les cellules CHO.

### **c. Fonctions biologiques de PTX.**

La plupart des activités biologiques de PTX sont dépendantes de l'activité enzymatique de la sous-unité S1. Cependant, la fixation de l'oligomère B seul entraîne une agglutination des érythrocytes ainsi qu'une prolifération des lymphocytes T (Nencioni *et al.* 1991). De récents travaux (Sakurai *et al.* 1996) semblent également montrer que l'oligomère B serait responsable de l'induction de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules de rate, notamment par les lymphocytes T. Cet IFN $\gamma$  pourrait alors activer les macrophages et induire la production d'oxyde nitrique (NO), qui pourrait avoir une activité cytotoxique (Nathan and Hibbs, 1991) contre *B. pertussis*, ou jouer un rôle immunosuppresseur sur les macrophages ou les cellules Th1 et Th2 (Albina *et al.* 1991).

La PTX se fixe aux cellules eucaryotes grâce à l'oligomère B, et cette fixation permet l'internalisation de la sous-unité S1 qui porte l'activité enzymatique. La toxine de pertussis est une ADP-ribosyltransférase (Katada *et al.* 1983), caractéristique partagée par de nombreuses autres toxines bactériennes (toxine de *V. cholerae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *C. diphtheria*) (Moss and Vaughan, 1988). Les membres de cette famille de toxines bactériennes catalysent

le clivage de la molécule de NAD<sup>+</sup> en nicotinamide et en ADP-ribose qui sera ensuite transféré sur une cystéine de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G. Ces protéines interviennent dans la transduction des signaux membranaires chez les cellules eucaryotes. Parmi les différentes protéines G ADP-ribosylées par PTX, on trouve Gi qui régule l'activité de l'adénylate cyclase, Gt qui régule la phosphodiesterase du cGMP dans les cellules de la rétine, et Go, impliquée dans la régulation de la phospholipase A2, C ou D (Ui. 1990). L'ADP-ribosylation de ces protéines G par PTX inhibe la transmission du signal extracellulaire à la protéine effectrice. La variété des types cellulaires touchés et le nombre de systèmes de transmission inhibés expliquent la diversité des activités biologiques de cette toxine: sensibilisation à l'histamine, augmentation de la sécrétion d'insuline provoquant une hypoglycémie, modification de la perméabilité membranaire, lymphocytose sanguine, ou encore inhibition de la migration des macrophages (Munoz. 1985).

La PTX va également jouer un rôle prépondérant sur la réponse immunitaire développée au cours de l'infection. Son action sur le système immunitaire sera analysé au cours du chapitre "*B. pertussis* et réponse immunitaire".

## **C. Autres facteurs de virulence de *B. pertussis*.**

### **a. La toxine adénylate cyclase.**

La toxine adénylate cyclase (Ac-Hly) est un facteur de virulence essentiel aux stades précoces de la colonisation du tractus respiratoire par *B. pertussis* (Gross *et al.* 1992; Khelef *et al.* 1992). Cette protéine, codée par le gène *cyaA*, est constituée de 1706 acides aminés et appartient à la famille des toxines RTX (Coote. 1992). Elle possède une activité adénylate-cyclase dépendante de la calmoduline et une activité hémolytique indépendantes (Sakamoto *et al.* 1992). La toxine Ac-Hly possède un domaine N-terminal de 400 acides aminés portant l'activité adénylate-cyclase. Celui-ci pénètre dans les cellules eucaryotes et catalyse rapidement, après activation par la calmoduline, une élévation du taux d'AMPc altérant les fonctions cellulaires (Wolff *et al.* 1980; Rogel and Hanski. 1992). Cette activité cytotoxique est à l'origine de lésions pulmonaires durant l'infection par *B. pertussis* et va induire, *in vitro*, l'apoptose de certains macrophages alvéolaires (Khelef *et al.* 1993; Khelef *et al.* 1994). La partie C-terminale de la toxine (les derniers 1300 acides aminés) est impliquée dans la fixation aux cellules eucaryotes et dans la translocation de la partie N-terminale enzymatiquement active à travers la membrane cellulaire vers le cytoplasme. Cette région C-terminale contient un domaine hydrophobe impliqué dans l'activité hémolytique de Ac-Hly (Benz *et al.* 1994), un domaine répété riche en glycine et en aspartate caractéristique de toutes les toxines RTX et impliqué dans la fixation du calcium (Boehm *et al.* 1990), et un signal de sécrétion C-terminal (Sebo and Ladan. 1993). Comme toutes les toxines RTX, Ac-Hly est synthétisée sous forme

de pro-toxine inactive qui est convertie en protéine active par activation post-translationnelle dépendante du produit d'un gène accessoire *cyaC* (Barry *et al.* 1991). Cette toxine est alors sécrétée à l'aide de protéines codées par les gènes *cyaB*, *cyaD* et *cyaE* (Glaser *et al.* 1988).

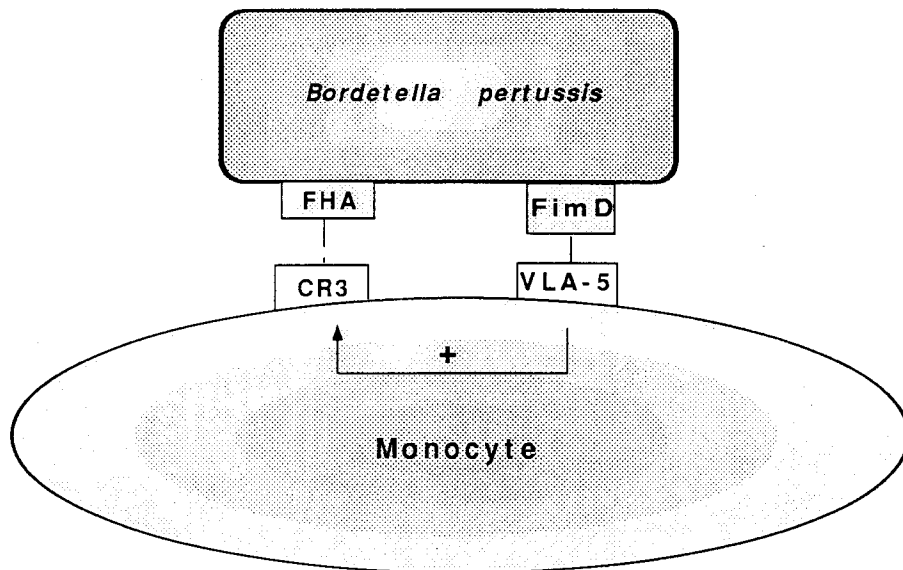
L'Ac-Hly a été montré comme étant un antigène protecteur important contre la colonisation bactérienne dans un modèle respiratoire murin (Guiso *et al.* 1991). De plus, des anticorps dirigés contre Ac-Hly ont été détectés dans le sérum d'enfants et d'adultes infectés par *B. pertussis* (Arciniaga *et al.* 1991). Des travaux récents (Betsou *et al.* 1993) ont montré que l'activation de Ac-Hly par CyaC est importante non seulement pour son activité cytotoxique mais également pour son activité protectrice. La même équipe a, par la suite, localisé des épitopes protecteurs, probablement conformationnels, dans les derniers 800 acides aminés C-terminaux (Betsou *et al.* 1995).

#### **b. La toxine dermonécrotique.**

La toxine dermonécrotique (DNT), également appelée PEHLT pour "Pertussis Heat-Labile Toxin", est un polypeptide monomérique de 140 kDa. Elle est très active puisque l'injection de picogrammes de DNT purifiée entraîne des lésions nécrotiques chez la souris nouveau-né et la dose létale chez des souris adultes est obtenue avec des nanogrammes de toxine (Zhang and Sekura. 1991). Cette toxine est localisée dans le cytoplasme de *B. pertussis* (Cowell *et al.* 1979) mais son mécanisme d'action reste encore inconnu.

#### **c. La cytotoxine trachéale.**

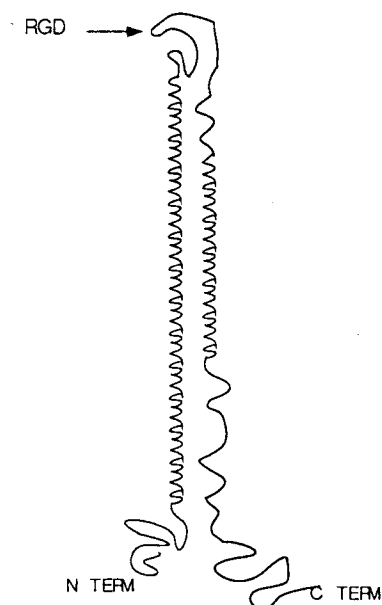
La cytotoxine trachéale (TCT) est un membre de la grande famille des muramyl-peptides (Cookson *et al.* 1989), qui correspondent à des fragments de peptidoglycannes composant la paroi bactérienne. La TCT est responsable de la destruction des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, affaiblissant ainsi le processus de "nettoyage" de cet épithélium. Cette destruction favorise la colonisation du tractus respiratoire par *B. pertussis*. Des travaux récents (Heiss *et al.* 1993) ont montré qu'une cytokine inflammatoire, l'IL-1 $\alpha$ , produite par les cellules épithéliales en réponse à la TCT, semble jouer un rôle de médiateur intracellulaire dans la cytopathologie respiratoire observée lors de la phase précoce de l'infection par *B. pertussis*.



**Fig 5: Mécanisme schématique de l'adhérence de *B. pertussis* aux monocytes.**

D'après Hazenbos et al. 1995.

Dans un premier temps, FimD va reconnaître VLA-5. Cette interaction va activer le CR3 des monocytes. *B. pertussis* va alors se fixer via la FHA au CR3, ce qui va renforcer l'adhésion de la bactérie sur le monocyte.



**Fig 6: Structure tridimensionnelle de la FHA.**

D'après Makhov et al. 1995.



#### **d. La pertactine.**

La pertactine (P69) est une adhésine présente sur la membrane externe de *B. pertussis*. Elle est codée par le gène *prn* et est synthétisée sous forme d'un précurseur de 93 kDa qui subit une maturation protéolytique pour donner une protéine de 69 kDa (Charles *et al.* 1989). Cette protéine mature joue un rôle important dans l'adhésion de *B. pertussis* aux cellules eucaryotes notamment via une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) (Leininger *et al.* 1991). D'autre part, l'infection naturelle par *B. pertussis* entraîne une réponse humorale anti-P69 (Thomas *et al.* 1989). La pertactine, ainsi que des anticorps anti-P69, polyclonaux ou monoclonaux, induisent chez la souris une immunité protectrice contre une infection respiratoire par *B. pertussis* (Roberts *et al.* 1993; Shahin *et al.* 1990). Cette protéine entre de ce fait dans la composition des nouveaux vaccins acellulaires contre la coqueluche. L'épitope immunoprotecteur majeur de la P69 semble être localisé dans la région C-terminale de la protéine, au niveau d'une boucle présentant le motif proline-glutamine-proline répété 5 fois (Emsley *et al.* 1996).

#### **e. Les fimbriae.**

Les fimbriae font partie des trois adhésines de *B. pertussis*, avec la pertactine et la FHA, impliquées dans l'initiation de l'infection. *B. pertussis* produit deux sérotypes distincts de fimbriae nommés Fim2 et Fim3, qui sont composés de sous-unités majeures de 22,5 et 22 kDa (Mooi *et al.* 1987). La sous-unité mineure, FimD, est capable de se lier à l'intégrine  $\text{V}\alpha\text{-5}$  (Fig.5), facilitant ainsi la capture de *B. pertussis* par les monocytes (Hazenbos *et al.* 1995), tandis que la sous-unité majeure se fixe aux sucres sulfatés présents à la surface des cellules épithéliales (Geuijen *et al.* 1996). L'infection naturelle par *B. pertussis* ou l'immunisation avec le vaccin cellulaire contre la coqueluche induit la production d'anticorps anti-fimbriae (Thomas *et al.* 1989). De plus, des études chez la souris ont montré que les fimbriae étaient capables de les protéger contre une infection respiratoire (Robinson *et al.* 1989). De ce fait, les fimbriae entrent dans la composition de plusieurs vaccins acellulaires en cours d'expérimentation (Edwards *et al.* 1993).

### **C. L'hémagglutinine filamenteuse.**

L'hémagglutinine filamenteuse ou FHA est l'adhésine majeure produite et sécrétée par *B. pertussis*. Elle joue un rôle essentiel dans l'attachement de la bactérie au tractus respiratoire supérieure de l'hôte (Locht *et al.* 1993).

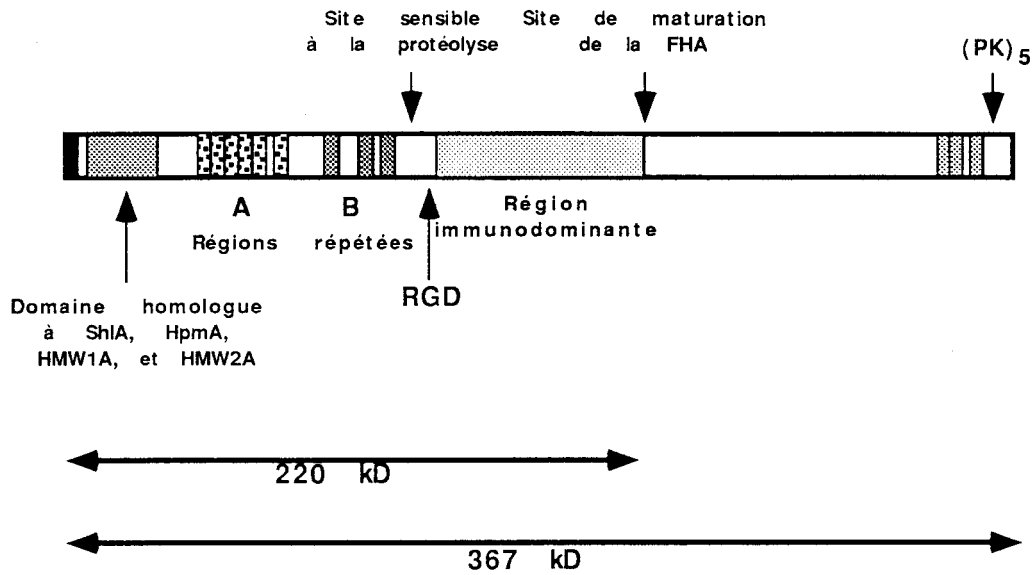


Fig 7: Représentation schématique de la structure de la FHA.  
D'après Locht *et al.* 1993.

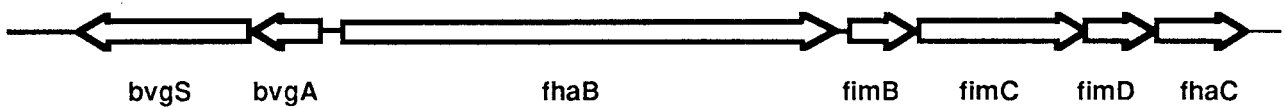


Fig 8: Structure du locus *bvg/fha/fim*.

Les flèches montrent le sens de transcription et la taille relative des différents gènes. D'après Locht *et al.* 1993.

### a. Structure et biogénèse de la FHA.

Le gène de structure de la FHA, *fhaB*, code pour une protéine de 367 kDa (FhaB). La forme mature (220 kDa) correspond aux 2/3 N-terminaux de FhaB et possède une structure dite "en épingle à cheveux" (Fig.6) (Makhov *et al.* 1994).

Bien que la partie C-terminale de FhaB ne soit pas présente dans la forme mature, elle possède des caractéristiques intéressantes telles que plusieurs régions répétées riches en proline et un site RGD. Cette région C-terminale présente notamment des similarités avec le domaine C-terminal de la protéine M des streptocoques. Chez ces bactéries Gram positives, cette région riche en proline semble être importante pour l'ancrage des protéines dans la membrane cellulaire (Domenighini *et al.* 1990). De plus, cette partie C-terminale du précurseur semble jouer un rôle important dans la sécrétion de la FHA (Renauld-Mongénie *et al.* 1996). Ce mécanisme sera discuté dans le chapitre Résultats.

La région N-terminale de la FHA est homologue aux régions N-terminales des hémolysines ShIA de *Serratia marcescens* et HpmA de *Proteus mirabilis* (Delisse-Gathoye *et al.* 1990) ainsi qu'à celles de HMW1A et HMW2A, deux adhésines de la surface de *Haemophilus influenza* (Barenkamp *et al.* 1992). En aval de ce domaine se trouvent deux régions répétées, respectivement A et B, suivies par un site sensible à la protéolyse et par une séquence RGD. Le site de maturation de FhaB est situé à environ 1000 acides aminés en aval de cette séquence RGD (Fig.7).

Le domaine N-terminal de FhaB joue un rôle essentiel dans la sécrétion de la protéine mature puisqu'une délétion en phase de cette région semble totalement inhiber la biogénèse de la FHA (Willems *et al.* 1994). De même que la sécrétion de ShIA et HpmA dépendent respectivement de la présence de ShIB et HpmB chez *S. marcescens* et *P. mirabilis*, la sécrétion de la FHA dépend d'une protéine accessoire nommée FhaC et présente au niveau de la membrane externe de *B. pertussis* (Willems *et al.* 1994). Cette protéine est codée par le gène *fhaC* localisé en aval de *fhaB* et séparé de ce dernier par trois autres gènes, *fimB*, *fimC*, et *fimD*, codant pour les fimbriae (Fig.8). Un mécanisme de sécrétion de la FHA impliquant un clivage puis une modification de la partie N-terminale de FhaB, suivie d'une interaction entre cette région et la protéine accessoire FHAC a été proposé (Jacob-Dubuisson *et al.* 1996) et sera discuté dans le chapitre Résultats.

### b. Les activités d'adhésion de la FHA.

La variété des mécanismes de fixation de la FHA permet l'adhésion de *B. pertussis* à de nombreux types de cellules eucaryotes.

Bien que la toxine de pertussis soit impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales du tractus respiratoire, la FHA joue un rôle prépondérant dans cette

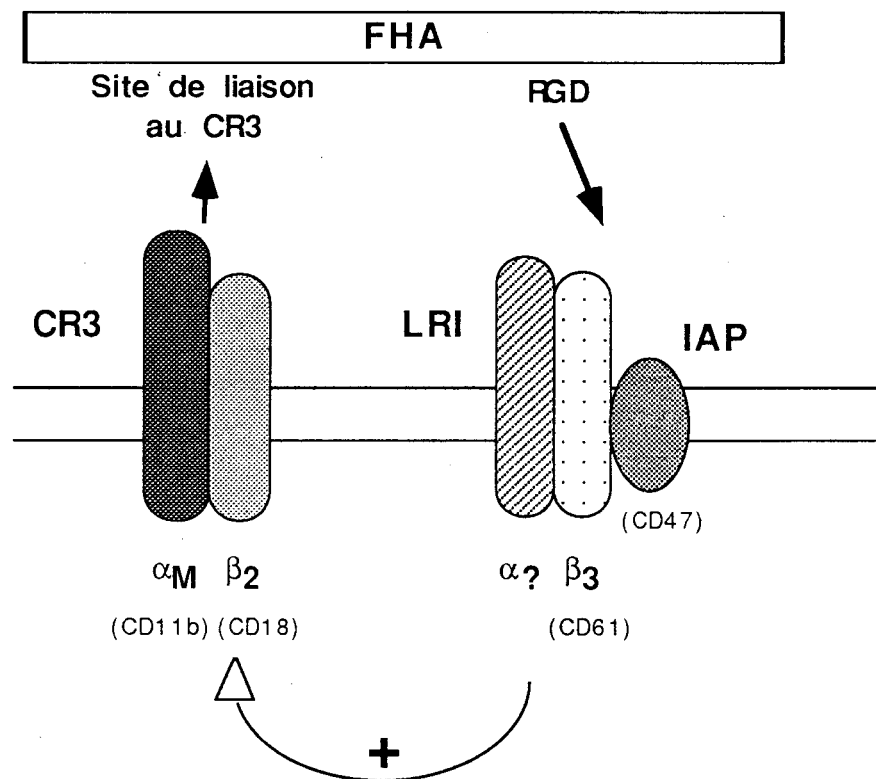


Fig 9: Modèle proposé de l'interaction entre la séquence RGD de la FHA et le complexe LRI/IAP des monocytes. D'après Ishibashi *et al.* 1994.

interaction (Relman *et al.* 1989). Des expériences de compétition ont permis de montrer que les carbohydrates servant de récepteurs à la FHA sur les cellules ciliées pulmonaires étaient des glycolipides contenant du lactose (Tuomanen *et al.* 1988). D'autre part, Prasad *et al.* (1993) ont montré qu'un anticorps monoclonal, reconnaissant une région de la FHA délimitée par les acides aminés 1141 à 1279, était capable d'inhiber la fixation de *B. pertussis* aux cellules ciliées. Une souche mutante produisant une FHA dépourvue de cette région est également incapable d'adhérer aux cellules ciliées et aux macrophages alvéolaires. Ces observations semblent indiquer la présence d'un domaine de reconnaissance des carbohydrates (DRC) situé dans la région comprise entre les acides aminés 1141 et 1279, qui correspondrait à la boucle de la structure "en épingle à cheveux" (Makhov *et al.* 1994) qui contient déjà le site RGD en position 1097-1099 (Fig.6).

La FHA est également l'adhésine majeure impliquée dans le mécanisme d'adhérence de *B. pertussis* aux cellules épithéliales non ciliées. Une activité de fixation de cette molécule sur l'héparine, glycosaminoglycane sulfaté présent en quantité non négligeable dans le mucus bronchique ainsi que dans la matrice extracellulaire et à la surface de nombreuses cellules épithéliales, est responsable de l'adhérence de la bactérie sur ces cellules (Menozzi *et al.* 1991,1994). Des études récentes (Hannah *et al.* 1994) mettent en évidence un site de fixation spécifique à l'héparine localisé dans la région N-terminale de la FHA, probablement dans la région comprise entre les acides aminés 442 et 863, comprenant notamment la plupart des régions répétées A et les deux premières régions B (Fig.7).

En plus de cette activité d'adhésion sur les cellules épithéliales ciliées et non-ciliées, la FHA est capable de se lier spécifiquement au récepteur CR3 (CD11b/CD18,  $\alpha_M\beta_2$ ) présent sur les macrophages et les monocytes humains (Relman *et al.* 1990). La FHA possède une séquence RGD supposée être responsable de la reconnaissance du CR3. Cette hypothèse était basée sur le fait qu'une mutation dirigée de cette séquence RGD réduisait de manière significative la fixation de *B. pertussis* aux macrophages humains, de même que des peptides contenant le site RGD étaient capables d'inhiber l'adhésion de la bactérie aux monocytes (Relman *et al.* 1990). Cependant, la séquence RGD de la FHA n'est pas reconnue par le CR3 purifié (Van Strijp *et al.* 1993). Ishibashi *et al.* (1994) ont émis l'hypothèse que le site RGD de la FHA pourrait interagir avec le complexe LRI ("Leukocyte Response Integrin")/ IAP ("Integrin-Associated Protein") et que cette interaction pourrait activer le CR3 des monocytes, stimulant ainsi la reconnaissance par le CR3 d'un autre domaine de la FHA, non encore défini (Fig.9). Cette fixation de *B. pertussis*, via la FHA, au CR3 permet l'internalisation des bactéries dans les macrophages par une voie n'engendrant pas de catabolisme oxydatif. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la survie et de la persistance de *B. pertussis* dans les macrophages alvéolaires présents au niveau du tractus respiratoire (Saukkonen *et al.* 1991; Friedman *et al.* 1992).

### III. *B. pertussis* et réponse immune.

L'infection naturelle chez l'homme ou expérimentale chez la souris, par *B. pertussis* va induire une forte réaction du système immunitaire chez le sujet infecté. Notre intention n'est pas ici de passer en revue l'ensemble de ces réactions, mais plutôt de se focaliser sur la réponse humorale contre deux facteurs de virulence particulièrement intéressants dans l'optique d'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur recombinant vivant: la PTX, facteur de virulence majoritairement impliqué dans les effets toxiques produits après infection par ce pathogène des voies respiratoires, et la FHA, adhésine majeure de la bactérie exprimée à la surface et sous forme sécrétée. L'immunité à médiation cellulaire sera également abordée de part son rôle dans la protection contre *B. pertussis*.

#### a. PTX et réponse immune.

De nombreux travaux, utilisant la toxine native ou recombinante, ont permis l'identification d'épitopes au niveau de la sous-unité S1 (Locht *et al.* 1987; Kim *et al.* 1989). Des anticorps monoclonaux spécifiques de S1 sont capables de protéger des souris contre une infection par *B. pertussis* (Sato and Sato. 1990). D'autre part, une protéine hybride constituée du fragment C de la toxine tétanique et de la sous-unité S1 de PTX a été construite (Boucher *et al.* 1994). Cette protéine chimérique est capable d'induire, chez la souris, des anticorps neutralisants contre les deux toxines, indiquant que les épitopes protecteurs sont conservés dans la protéine recombinante. L'immunisation de souris à l'aide de l'oligomère B induit également la production d'anticorps neutralisant la toxine (Hausman *et al.* 1989) ainsi qu'une protection contre une infection respiratoire par *B. pertussis* (Shahin *et al.* 1990).

Des épitopes potentiels de cellules B et T ont été identifiés sur les sous-unités S1, S2, S3, et S4 (Oksenberg *et al.* 1989; Chong *et al.* 1992; Petersen *et al.* 1992; Ibsen *et al.* 1993).

La toxine de pertussis est connue pour être une protéine immunogénique potentiellement protectrice, mais elle va également exercer de nombreux effets sur le système immunitaire. La PTX, injectée par voie parentérale, va stimuler la production d'IgE contre des protéines coadministrées et induire des réactions d'hypersensibilité de type retardée (Sewell *et al.* 1983). Ces deux phénomènes sont régulés par l'IL-4 et l'IFN $\gamma$  dont la production est stimulée par PTX (Mu and Sewell. 1993).

Des propriétés adjuvantes concernant la toxine de pertussis ont été décrites (Munoz. 1988) mais très peu d'articles font référence à une adjuvantivité de la PTX pour des protéines hétérologues administrées par voie muqueuse. Par exemple, Wilson *et al.* (1990) ont montré que PTX pourrait avoir un effet adjuvant sur la réponse immune dirigée contre la CTB et la

KLH (keyhole limpet hemocyanin) administrées par voie orale chez la souris, alors qu'elle n'induit qu'une très faible réponse contre elle-même.

Les mécanismes par lesquels PTX exercerait son pouvoir potentiateur de la réponse immune restent inconnus. Cependant, certains auteurs (Black *et al.* 1988) pensent que cet effet serait lié à l'activité enzymatique de la toxine. Ils ont ainsi montré que l'administration par voie intraveineuse de souches de *B. pertussis* inactivées par la chaleur et qui, soit étaient délétées du gène codant pour la sous-unité S1, soit avaient une insertion dans S1 entraînant une perte de 90% de l'activité ADP-ribosyltransférase, n'induisait pas d'augmentation du taux d'anticorps sériques dirigés contre l'ovalbumine, contrairement à des souches exprimant la toxine native. Ces résultats sont en opposition avec ceux obtenus par Roberts *et al.* (1995) qui ont mis en évidence un pouvoir adjuvant chez une toxine mutée (PT-9K/129G) ayant perdu son activité enzymatique vis-à-vis de protéines hétérologues administrées par voie nasale.

Cependant, il existe de nombreuses différences entre les deux études. Le mutant PTX utilisé par Black *et al.* (1988) possède 4 acides aminés supplémentaires insérés dans S1, alors que 2 acides aminés ont été substitués dans la sous-unité S1 de PT-9K/129G. Les premiers utilisent des souches de *B. pertussis* inactivées alors que Roberts *et al.* (1995) étudient des toxines purifiées. Enfin, la voie d'administration est différente et pourrait jouer un rôle important sur les propriétés adjuvantes des toxines mutées.

De manière comparable, des travaux récents (Dickinson and Clements. 1995) portant sur l'entérotoxine (LT) d'*E. coli*, immunologiquement et physiochimiquement proche de la toxine de pertussis, ont montré qu'une entérotoxine mutée (par substitution d'un seul acide aminé), appelée LT(R192G) et dépourvue de son activité ADP-ribosyltransférase et de sa toxicité, conservait sa capacité à agir comme un adjuvant pour des antigènes coadministrés par voie orale. Ces résultats sont opposés à ceux obtenus par Lycke *et al.* (1992) montrant qu'une toxine mutée (par substitution d'une lysine en position 112 par une glutamate) avait non seulement perdu son activité enzymatique mais également sa capacité d'induire de l'AMPc et son pouvoir adjuvant.

Comme on peut le constater, les travaux portant sur le pouvoir adjuvant des toxines bactériennes à activité ADP-ribosyltransférase sont très controversés et de nombreux points restent encore à éclaircir avant de déterminer les effets et les mécanismes d'action de PTX sur la réponse immune contre un antigène coadministré par voie muqueuse. Cependant, la nature des mutations sur la PTX, la présentation (toxine purifiée ou bactérie atténuée), ainsi que la voie d'administration des antigènes hétérologues semblent intervenir de manière essentielle dans la propriété d'adjuvantité ou non de la toxine.

Dans notre modèle, nous avons tenté d'aborder la relation PTX/réponse immune par une approche originale en étudiant le lien pouvant exister entre la toxine de pertussis, et

notamment son activité enzymatique, et la réponse immune dirigée contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) après administration intranasale de plusieurs souches vivantes atténuées de *B. pertussis* (voir Chap. Résultats).

## **B. Le rôle de la FHA dans l'immunité protectrice.**

De part son importance dans l'adhésion de *B. pertussis* à différents types cellulaires, la FHA a été considérée comme un antigène majeur entrant dans la composition des vaccins contre la coqueluche. L'administration du vaccin cellulaire à des souris ou à des enfants entraîne la production d'anticorps anti-FHA dans leur sérum (Redhaed *et al.* 1984). De plus, la vaccination d'enfants âgés de 18 mois avec le vaccin acellulaire induit des taux élevés d'anticorps anti-FHA ainsi qu'une réponse cellulaire T spécifique (Tomoda *et al.* 1991). Ces caractéristiques immunes sont retrouvées chez les personnes convalescentes après une coqueluche.

Cependant, le profil isotypique de la réponse anti-FHA chez des enfants ayant reçu le vaccin cellulaire diffère de celui des individus atteints par la coqueluche. Alors que le taux d'IgG sérique spécifique est similaire, la réponse IgA anti-FHA est plus importante chez les malades que chez les personnes vaccinées (Thomas *et al.* 1989). Cette différence est encore plus marquée au niveau des sécrétions nasopharyngées et de la salive (Zackrisson *et al.* 1990) où l'on observe une augmentation du taux d'IgA anti-FHA chez la plupart des malades plusieurs semaines après le début des symptômes. De manière similaire, on retrouve des taux élevés d'IgA anti-FHA dans les sécrétions nasales de souris infectées avec la souche virulente de *B. pertussis* (Shahin *et al.* 1992), et ce, sur une période allant jusqu'à 26 semaines après l'infection (Amsbaugh *et al.* 1993). L'ensemble de ces observations, ajoutées au fait que la protection chez la souris et chez l'homme est plus importante après une infection qu'après une vaccination, suggère que la présentation des antigènes de *B. pertussis*, notamment de la FHA, au système immun muqueux du tractus respiratoire pourrait jouer un rôle essentiel dans l'efficacité et la durée de l'immunité protectrice.

L'optimisation de la réponse immune anti-FHA fait l'objet de nombreux travaux.

Shahin *et al.* (1992) ont ainsi montré que l'immunisation par voie intranasale ou orale de souris avec de la FHA purifiée (2 administrations de 100 µg à une semaine d'intervalle) induit la production d'IgG anti-FHA dans le sérum et dans les sécrétions nasales alors qu'une réponse IgA spécifique n'est détectée que dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA). Ce protocole d'immunisation, tout comme une administration intraduodénale, est capable de protéger les souris contre une infection avec la souche virulente de *B. pertussis*. (Shahin *et al.* 1992; Roberts *et al.* 1993).



Différentes équipes ont utilisé des vecteurs synthétiques afin d'améliorer l'immunité protectrice induite après administration muqueuse de la FHA. Ainsi, des souris immunisées par voie orale à l'aide de liposomes contenant de la FHA et de la PTX détoxifiée (à raison de trois fois 4 µg) présentent une réponse IgG sérique spécifique des deux antigènes bactériens ainsi que des IgG et des IgA spécifiques dans les LBA (Guzman *et al.* 1993).

Cahill *et al.* (1994) ont immunisé des souris par voie intranasale avec, soit de la FHA en solution, soit de la FHA incorporée dans des microsphères (2 administrations de 12,5 µg à 4 semaines d'intervalle). Les résultats obtenus en termes de réponse immune et de protection contre une infection par la souche virulente de *B. pertussis* sont similaires pour les deux protocoles d'immunisation.

Un autre mode de vectorisation de la FHA consiste à faire exprimer cette adhésine par des souches recombinantes de *S. typhimurium aroA* ou encore d'*E. coli*. Leur administration par voie orale induit un niveau élevé d'IgA anti-FHA dans les poumons (Guzman *et al.* 1991).

La localisation sur la FHA des épitopes de cellules B et T potentiellement protecteurs a été entreprise. Une région immunodominante a ainsi été déterminée dans la région C-terminale de la FHA mature. Elle est reconnue par les cellules B murines (Delisse-Gathoye *et al.* 1990) et par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains (Di Tommaso *et al.* 1991) qui reconnaissent également la partie N-terminale de la FHA.

### C. L'immunité à médiation cellulaire.

Les études entreprises afin d'étudier les mécanismes immunologiques permettant d'obtenir une protection contre *B. pertussis* se sont longtemps focalisées sur le rôle de l'immunité humorale. Cependant, les résultats d'un essai clinique en Suède avec le vaccin acellulaire contre la coqueluche (Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. 1988), ainsi que de nombreuses expériences chez la souris (Roberts *et al.* 1990; Shahin *et al.* 1990a) et chez le lapin (Ashworth *et al.* 1982), n'ont pas permis de déterminer de corrélation entre le taux d'anticorps sériques contre les antigènes de *B. pertussis* et une protection contre l'infection. Ainsi, alors que les anticorps circulants jouent un rôle de neutralisation des toxines et de prévention de l'adhésion des bactéries, l'immunité à médiation cellulaire semble intervenir dans la protection.

De récentes études ont montré que *B. pertussis* n'est pas un pathogène strictement extracellulaire. En effet, cette bactérie peut survivre *in vitro* dans des cellules eucaryotes tels que les macrophages alvéolaires (Saukkonen *et al.* 1991), les cellules HeLa ou encore les cellules épithéliales du tractus respiratoire humain (Ewanowich *et al.* 1989). *B. pertussis* a également été retrouvé dans les macrophages alvéolaires présents dans les poumons des personnes atteintes du SIDA (Bromberg *et al.* 1991).

L'ensemble de ces observations semble montrer que l'immunité à médiation cellulaire est nécessaire au contrôle du stade intracellulaire de *B. pertussis* qui pourrait ainsi échapper aux mécanismes de défense immune médiés par les anticorps.

De nombreux épitopes reconnus par les cellules T ont été localisés sur les antigènes de *B. pertussis* et démontrent ainsi le rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans la protection contre une infection. Une preuve directe de l'importance des cellules T a été obtenue récemment. Des souris nude, déficientes en cellules T, se révèlent incapables d'éliminer les bactéries suite à une infection respiratoire et vont développer une infection chronique, alors que les souris naïves normales vont éliminer les bactéries en 35 jours. De plus, le transfert de cellules T CD4+, provenant de souris préalablement infectées par *B. pertussis*, à des souris nude ou rendues immunosuppressives par irradiation entraîne une élimination rapide des bactéries. Aucun anticorps sérique n'est détecté dans ces souris receveuses (Mills *et al.* 1993).

Le profil de cytokines obtenus à partir des cellules spléniques de souris convalescentes est caractéristique d'une sous-population Th1 de lymphocytes T CD4+ (production d'IL-2, d'IFN $\gamma$ , et de TNF $\alpha$ ) (Petersen *et al.* 1992b). De même, l'immunisation de souris à l'aide du vaccin cellulaire contre la coqueluche induit une réponse de type Th1 et un taux modéré d'anticorps (Redhead *et al.* 1993). Par contre, l'administration du vaccin acellulaire (composé de FHA, de PTX inactivée, et de pertactine) induit une forte réponse anticorps ainsi qu'un profil de cytokines de type Th2 (production d'IL-5 mais pas d'IL-2 ni d'IFN $\gamma$ ). La moins bonne efficacité du vaccin acellulaire, comparée au vaccin cellulaire, pour éliminer les bactéries suite à une infection respiratoire par *B. pertussis* semble refléter l'incapacité de ce vaccin à induire la production de cytokines Th1 spécifiques de la bactérie pathogène. Cependant, la courbe d'élimination des bactéries chez des souris immunisées avec le vaccin acellulaire est compatible avec le rôle des anticorps stimulés par les cellules Th2 qui vont réduire le nombre de bactéries dans les poumons durant le stade initial de l'infection.

#### **IV. La vaccination contre la coqueluche.**

Avant l'ère de la vaccination, la coqueluche était une des causes majeures de mortalité infantile dans le monde. Entre les années 1940 et 1948, aux Etats-Unis, davantage d'enfants sont morts de coqueluche que de rougeole, de scarlatine, de diphtérie, de poliomyélite et de méningite associées. Actuellement, l'O.M.S. estime que la coqueluche est responsable, chaque année, de la mort de 500 000 personnes dans le monde, notamment dans les pays en voie de développement (Muller *et al.* 1986).

De part sa gravité, cette maladie fait, depuis le début de ce siècle, l'objet de nombreuses recherches. Durant les années 1930, plusieurs vaccins basés sur des méthodes

de préparation différentes ont vu le jour, mais les campagnes de vaccination contre la coqueluche ne débutèrent que dans les années 1940 et 1950 avec l'utilisation du vaccin cellulaire composé de *B. pertussis* inactivées chimiquement ou par la chaleur (Fine and Clarkson. 1987). L'efficacité de ce vaccin a été estimée à plus de 95% (Onorato *et al.* 1992), et son utilisation a entraîné une réduction spectaculaire de l'incidence de la coqueluche. Cette préparation vaccinale est en général associée aux anatoxines tétanique et diphtérique en présence d'un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium, ou encore le phosphate de calcium pour produire un vaccin combiné contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche, nommé DTP. En raison de la gravité de la coqueluche au cours de la première année de vie, les nourrissons sont vaccinés à partir du deuxième mois. Trois injections sous-cutanées ou intramusculaires sont pratiquées à 1 ou 2 mois d'intervalle; un premier rappel est effectué 12 à 15 mois après la première dose vaccinante, un second 5 ans après la primo-vaccination.

Plusieurs rapports ont émis l'hypothèse d'une relation entre l'administration du vaccin cellulaire contre la coqueluche et certains effets secondaires graves. Ceci a entraîné une diminution de l'acceptation de cette vaccination, avec pour conséquence l'apparition de nouvelles épidémies (Miller *et al.* 1981). Bien que ces rapports soient maintenant largement réfutés (Brahams. 1988), ils furent les instruments qui déclenchèrent de nouvelles recherches sur le développement de vaccins acellulaires mieux définis et moins réactifs.

Au Japon, les vaccins acellulaires, constitués de FHA, de PTX inactivée, et d'autres antigènes de *B. pertussis* purifiés, sont utilisés depuis 1981 chez des enfants âgés de 2 ans, et leur utilisation a entraîné une réduction importante du nombre de cas de coqueluche (Kimura. 1991). Récemment, une étude comparative a été réalisée en Suède. Elle a permis de montrer qu'un vaccin acellulaire à 5 composants (PTX inactivée, FHA, Fim2 et Fim3, et pertactine) présentait un profil de sécurité d'utilisation favorable et conférait une protection à 85% contre la coqueluche. Un vaccin à 2 composants (PTX inactivée et FHA) ainsi que le vaccin cellulaire étaient moins efficaces, avec respectivement 60% et 48% de protection (Gustafsson *et al.* 1996).

Les vaccins acellulaires contenant des molécules détoxifiées sont plus sûrs et plus immunogènes que les vaccins cellulaires, mais la possibilité d'une réversion de la toxicité reste présente. De nombreux travaux sont actuellement réalisés sur la détoxification au niveau génétique de la toxine de pertussis, notamment au niveau de la sous-unité S1 responsable de la majorité des effets biologiques sévères de PTX (Loosmore *et al.* 1994).

## ***Chapitre III***

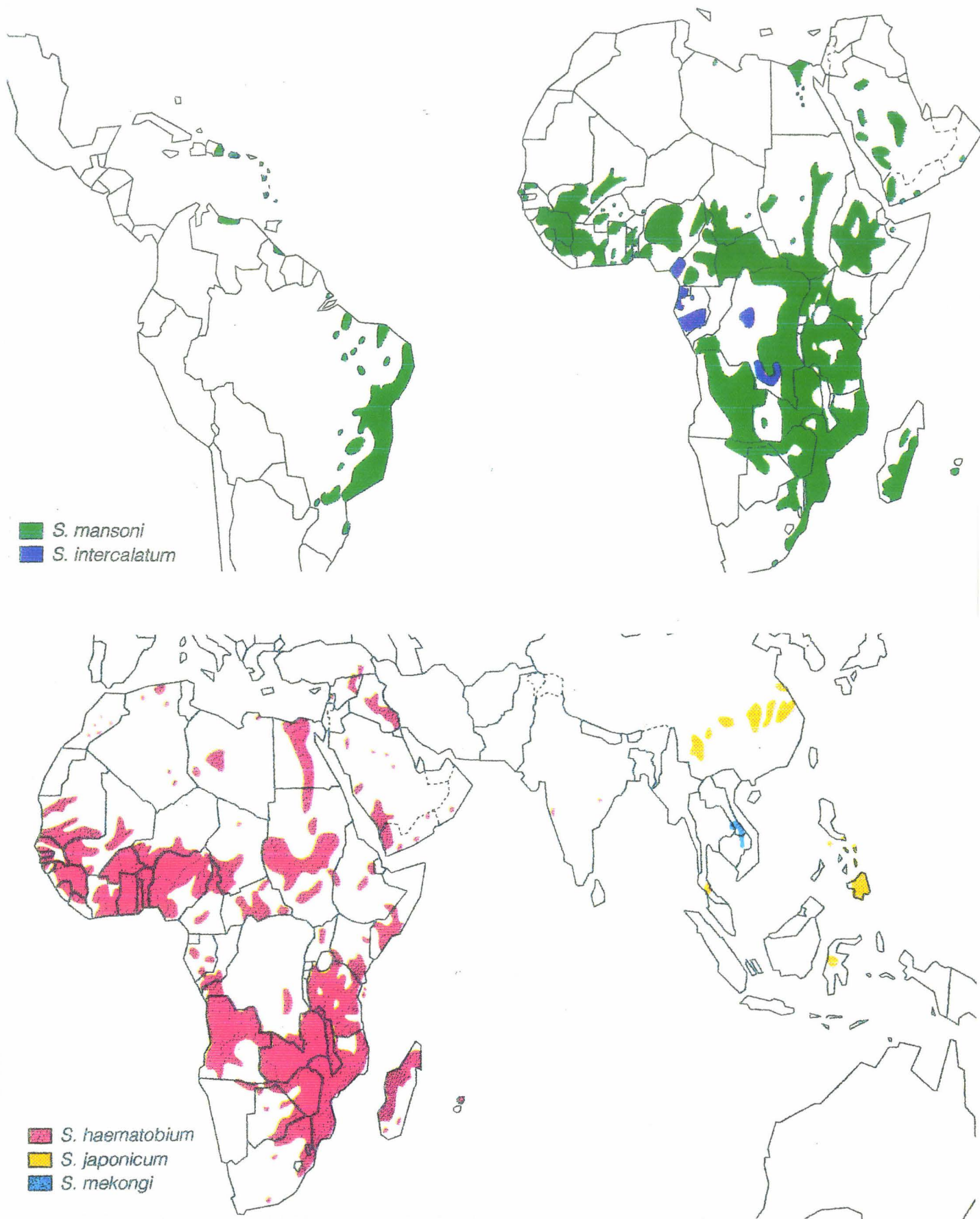
### **La schistosomiase ou bilharziose**

#### **I. Un problème de santé publique.**

La schistosomiase ou bilharziose (du nom de Théodor Bilharz) est une infection parasitaire chronique et débilitante qui constitue un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux. Cette maladie représente la seconde endémie parasitaire dans le monde, après le paludisme, et est responsable chaque année de la mort de centaines de milliers de personnes et d'une morbidité difficilement estimable. La schistosomiase aurait également un impact considérable sur la nutrition, sur la croissance et le développement, et également sur les performances physiques et intellectuelles des enfants d'âge scolaire (Wiest. 1996).

La gravité des lésions rencontrées et l'importance de la morbidité due à cette maladie chronique a incité de nombreux organismes internationaux à mettre en place des programmes destinés à la prévention de la maladie, à la surveillance épidémiologique au traitement, à l'information des populations et à la recherche d'un vaccin efficace (Picot. 1993). Les efforts de développement de nouvelles stratégies vaccinales s'orientent désormais non seulement vers l'induction d'une immunité protectrice efficace, mais de plus en plus vers un contrôle de la pathologie.

Ces projets ont pu voir le jour grâce aux résultats acquis suite à l'ensemble des recherches effectuées sur ce sujet, notamment en ce qui concerne la symptomatologie de la



**Fig. 10 : Distributions géographiques des différentes espèces de schistosomes.**  
 D'après "The control of schistosomiasis" WHO 1993.

maladie, la biologie des parasites responsables: les schistosomes, et la réponse immune générée lors de l'infection.

## II. La répartition géographique.

Cette parasitose affectant 200 millions de personnes, 600 millions étant exposées au risque d'infection, est endémique dans 74 pays. La répartition des lieux d'endémies est liée à la présence des mollusques d'eau douce, hôtes intermédiaires. Les continents africains, sud-américains et asiatiques, présentant des conditions climatiques de type tropical et subtropical adéquates, sont les plus touchés (Fig.10).

L'aménagement des cours d'eau entraîne une augmentation de l'aire de répartition des schistosomes du fait de leur fréquentation par les populations humaines dans des régions où l'équipement sanitaire fait défaut. L'extrême adaptation du parasite à son hôte définitif est ici exemplaire. La forme infestante du schistosome, le cercaire, va quitter son hôte intermédiaire, le mollusque, à une heure de la journée lui offrant le plus de chance de le mettre au contact avec son hôte définitif. Il s'agira du milieu de la journée (pic à 11 h) pour *Schistosoma mansoni* lorsque les activités de l'homme (travail, tâches ménagères ou loisir) le mènent au contact de l'eau, alors que les cercaires de l'espèce *S. bovis* seront présents dans l'eau à l'heure où le bétail vient s'abreuver (pic à 9 h). Cette chronobiologie cercarienne est génétiquement déterminée chez le schistosome (Théron and Combes. 1988). L'augmentation du niveau de vie, corrélée à la construction de latrines et d'adductions d'eau, ainsi que l'apparition d'eau filtrée pour l'utilisation quotidienne va donc entraîner une régression de l'incidence de la schistosomiase. Le flux migratoire des populations va également modifier la répartition géographique des aires d'endémies.

Il existe 18 espèces de parasites appartenant au genre *Schistosoma* dont 5 vont infecter l'homme (Short. 1983).

*Schistosoma mansoni* et *S. haematobium* sont les plus répandues (Larivière. 1993). L'espèce *S. mansoni*, à localisation intestinale, est endémique notamment en Afrique, dans la péninsule arabique, en Amérique du Sud et dans les Caraïbes, touchant plus de 50 pays. Un nombre similaire de pays est affecté par *S. haematobium*. Les principaux foyers de cette parasitose vésicale sont situés en Afrique, dans la péninsule arabique, à Madagascar, à l'île Maurice et en Inde.

*S. japonicum* et *S. mekongi*, responsables d'une bilharziose intestinale, sévissent en Asie. L'espèce *japonicum* est notamment présente en Chine, aux Philippines, au Japon et en Indonésie, alors que *S. mekongi* a été identifié au Cambodge et au Laos (presqu'île du Mékong).

*S. intercalatum*, à localisation rectale chez l'homme, est quant à lui un parasite strictement africain. Sa présence a été détectée au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun.

*S. mansoni*, *S. haematobium*, et *S. intercalatum* coexistent dans plusieurs pays d'Afrique centrale et occidentale. Cette cohabitation peut avoir plusieurs conséquences importantes (Tchuem Tchuente *et al.* 1996).

Premièrement, elle peut exercer une influence sur l'épidémiologie du parasite. Ainsi, l'existence d'un mécanisme de compétition entre deux espèces de parasite capables d'infecter le même hôte peut entraîner un phénomène d'exclusion. Un facteur important limitant la distribution de *S. intercalatum* en Afrique pourrait provenir d'une telle exclusion entre cette espèce et *S. mansoni* (Tchuem Tchuente, 1995) ou *S. haematobium* (Southgate, 1978).

D'autre part, cette compétition entre les différentes espèces pourrait en partie expliquer la localisation différente des schistosomes africains chez leur hôte humain: *S. mansoni* est retrouvé dans l'intestin, *S. haematobium* dans la vessie et *S. intercalatum* dans le rectum.

Des appariements interspécifiques au sein d'un même hôte peut entraîner l'apparition d'hybrides qui vont influencer l'hétérogénéité génétique des populations naturelles avec des conséquences possibles sur le pouvoir infectieux. Ainsi, l'évolution des prévalences des porteurs d'oeufs hybrides entre 1984 et 1992 au Gabon est en faveur d'un développement de l'espèce hybride (Richard-Lenoble *et al.* 1993).

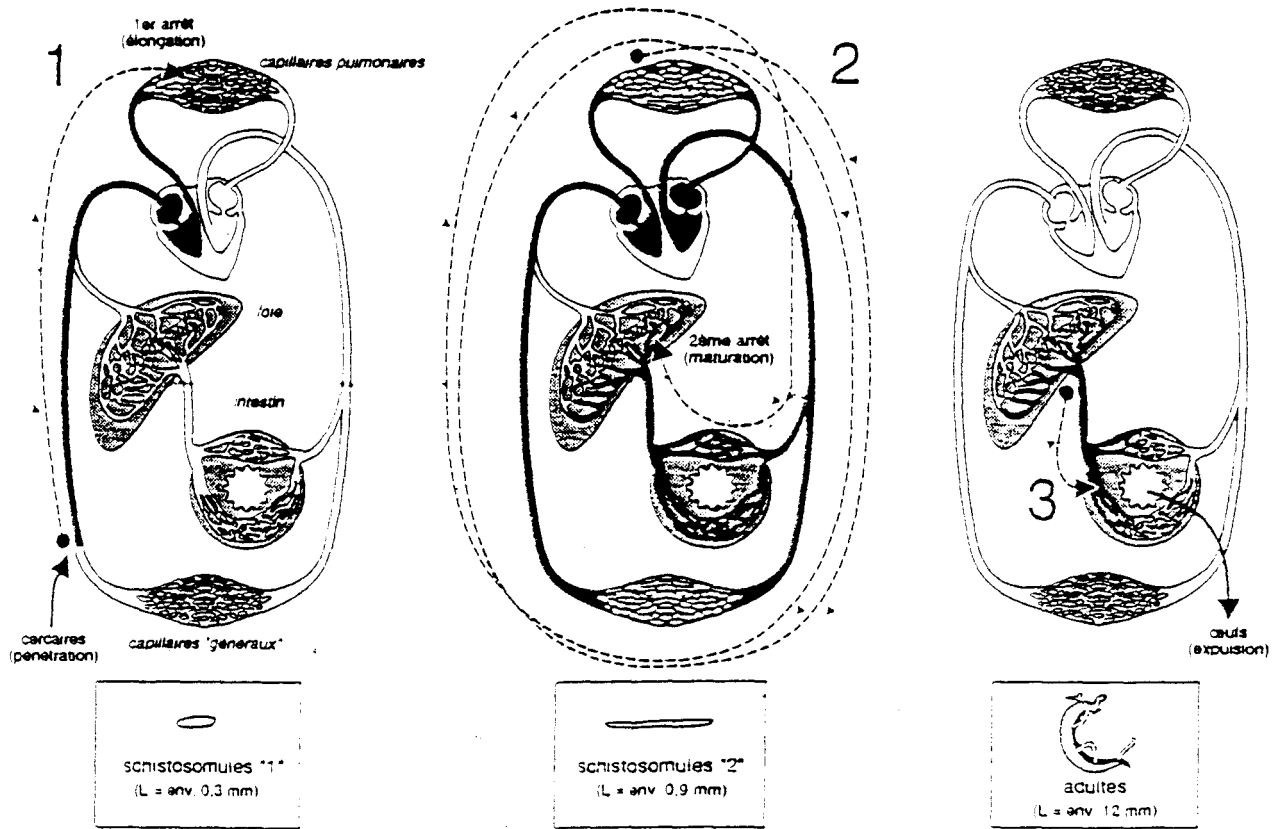
Enfin, il existe un nombre important d'espèces zoophiles parmi lesquelles *S. bovis* et *S. matthei* qui infectent le bétail entraînant des pertes économiques importantes.

### **III. Le parasite.**

#### **A. Généralités.**

Les agents responsables, les schistosomes, sont des vers hématophages appartenant à l'embranchement des plathelminthes (vers plats non-segmentés) et à la classe des trématodes. Ces parasites suivent un cycle évolutif indirect (ils appartiennent à la sous-classe des digènes) avec un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce et un hôte définitif mammifère.

Le génome nucléaire du schistosome comprend environ  $2,7 \cdot 10^8$  paires de bases (Simpson *et al.* 1982) et est particulièrement riche en bases A et T (66%). Les schistosomes possèdent 7 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels (ZZ pour le mâle et ZW pour la femelle). Par la technique de RAPD ("Random Amplified



**Fig 11: Le parcours des schistosomes chez l'hôte définitif.**  
D'après Combes, 1993.



Polymorphic DNA"), on ne distingue pas de polymorphisme entre les souches d'une même espèce isolées de zones géographiques distinctes (Simpson *et al.* 1995).

La distinction entre les espèces est basée sur des critères morphologiques et biochimiques, parasitologiques (localisation géographiques, hôtes intermédiaires et définitifs,...), et également pathogéniques (localisation tissulaire, chronobiologie, ...). La classification peut également se référer au spectre d'infectivité. 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 et le bétail.

## B. Le cycle évolutif des schistosomes.

Le cycle parasitaire s'effectue entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce.

La pénétration de la forme infestante du parasite, la furcocercaire issue d'un mollusque, dans l'hôte définitif commence par une étape de fixation à la peau par deux ventouses munies d'épines. Par des mouvements vibratoires et la sécrétion d'enzymes protéolytiques au niveau des glandes céphaliques, la cercaire va traverser les couches supérieures de la peau en quelques minutes. Au cours de la pénétration, elle va perdre sa queue bifide qui lui permettait de nager en quête de son hôte. C'est la première des modifications que subit le parasite, alors appelé schistosomule.

Tout en poursuivant ses processus de maturation, le schistosomule va quitter le derme, atteindre la lumière d'une veine ou d'un vaisseau lymphatique, et être entraîné par le flux sanguin jusqu'au cœur puis aux poumons. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours durant lesquels le parasite va s'étirer (passant d'une longueur de 300  $\mu\text{m}$  à près de 900  $\mu\text{m}$ ) afin de se faufiler dans les fins capillaires pulmonaires. Par la suite, le schistosomule va être entraîné vers l'aorte, les artères mésentériques et la veine porte, jusqu'au foie, son lieu de maturation.

Le jeune parasite va alors se différencier en schistosome et subir une maturation sexuelle. S'il est de sexe mâle, il acquiert la morphologie caractéristique du schistosome mâle, sa face ventrale formant un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle (Fig.11). Il s'accouple ainsi à une femelle schistosome qui peut, alors seulement, atteindre sa maturité sexuelle. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. La longueur des vers varie de 6 à 26 mm, la femelle plus fine que le mâle étant généralement plus longue. Les vers appariés se déplacent ensuite à contre-courant grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infestant l'homme vont se nicher dans les veines proches de l'intestin. L'espèce *S. haematobium*, quant à elle, à un tropisme particulier pour le système urogénital.

Les femelles matures vont produire des oeufs en continu; on estime que la femelle de *S. mansoni* pond environ 300 oeufs par jour. Les oeufs de *S. mansoni* sont ensuite disséminés dans divers organes internes, notamment le foie, où à la faveur du rétrécissement des vaisseaux sanguins, ils se trouvent bloqués. Les oeufs sont alors la cible d'une forte réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ils sont ainsi responsables de la pathologie liée à l'infection et permettent la poursuite du cycle parasitaire. En effet, les oeufs qui franchissent les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*) sont excrétés dans les urines ou les selles et sont libérés dans l'eau.

Les oeufs vont alors donner naissance, si certaines conditions du milieu sont réunies (pH neutre, luminosité, hydrométrie, salinité modérée et température proche de 30°C), à une forme larvaire libre, le miracidium. Celui-ci est extrêmement mobile car doté de cils vibratiles lui permettant de se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, vraisemblablement attiré par des facteurs chimiotactiques. Les mollusques-hôtes sont spécifiques de chaque espèce: *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum* infectant respectivement les genres *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*.

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste primaire et rejoint l'hétopancreas de l'hôte intermédiaire. Il passe alors, en 3 à 8 semaines, du stade sporocyste primaire et secondaire à celui de furcocercaire par multiplication asexuée et polyembryonie. Un seul miracidium peut ainsi donner naissance à plusieurs milliers de cercaires qui, à maturité, quittent le mollusque et contaminent les plans d'eau.

#### **IV. Les pathologies associées aux schistosomiasés.**

Au sein d'une population infectée, les manifestations cliniques sont extrêmement variables. Elles sont corrélées à l'intensité de l'infection, à la souche du parasite infestant, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire de l'individu infecté ainsi qu'à des facteurs génétiques. Les prévalences d'infection les plus élevées et l'intensité des infections les plus importantes sont observées chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, le nombre d'oeufs excrétés et l'intensité des lésions diminuant au cours du temps (Larivière. 1993). Cependant, il s'avère, d'après une enquête échographique sur une population infectée par *S. japonicum*, que les adultes excrétant le moins d'oeufs (âgés de 40 à 49 ans) sont également ceux qui ont la plus forte prévalence de fibrose hépatique avancée (Wiest *et al.* 1993).

Selon la localisation des vers et la circulation des oeufs, on distingue des atteintes urogénitales (*S. haematobium*), l'infection à terme pouvant toucher les reins et provoquer des déficiences graves, et des atteintes hépato-intestinales (*S. mansoni* et *S. japonicum*).

Le premier symptôme qui apparaît chez le sujet naïf est la “dermatite du nageur”, éruption traduisant la pénétration cutanée de la cercaire. Par la suite, la pathologie associée à l'infection par *S. mansoni* est essentiellement liée à la ponte des oeufs par le ver adulte. Les formes les plus “bénignes” se traduisent par une gêne intestinale (forme chronique intestinale) due à la présence des oeufs. Les lésions provoquées par le franchissement de la muqueuse intestinale peuvent conduire à des diarrhées sanglantes et à la formation de polypes. Les formes sévères de la maladie sont liées à la présence des oeufs dans le foie. Bloqués dans les capillaires hépatiques, ils altèrent la circulation sanguine et entraînent une hypertension portale. Celle-ci peut être responsable d'une fuite de plasma sanguin dans la cavité abdominale (ascite) ou dans les tissus (oedèmes). Les oeufs sont également la cible d'une réaction inflammatoire avec un afflux de cellules mononuclées (granulome primaire) puis, à la maturité du granulome, une majorité d'éosinophiles et en proportion plus faible des lymphocytes T et B, des macrophages, des mastocytes, des neutrophiles et des fibroblastes (Weinstock and Boros. 1983). Les granulomes vont ensuite évoluer vers une fibrose qui devient progressivement irréversible. Lorsqu'elle est massive, elle génère une circulation collatérale et des varices. Le risque majeur réside alors dans la rupture de ces varices associée à des hémorragies.

*S. japonicum* présente un tableau clinique très similaire, les lésions semblant néanmoins plus précoces et des atteintes neurologiques étant observées.

Dans les PVD, d'autres maladies fréquemment associées aux schistosomiasés, telles que l'hépatite B, la salmonellose ou encore la shigellose pour *S. mansoni* et le cancer de la vessie pour *S. haematobium*, viennent encore aggraver le tableau clinique.

De manière générale, l'altération de la réponse immunitaire provoquée par le parasite entraîne, chez la souris, une diminution de la capacité d'élimination d'autres pathogènes (Actor *et al.* 1993; 1994).

## V. Les traitements.

Il existe actuellement plusieurs traitements chimiothérapeutiques efficaces contre les schistosomiasés, le praziquantel (PZQ) étant le composé le plus utilisé devant l'oxamniquine.

Le PZQ est actif sur toutes les espèces de schistosomes infectant l'homme et, dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*, le taux de guérison, déterminé par l'arrêt définitif de l'émission d'oeufs dans les selles, est estimé à environ 90%. En raison de son action anti-

inflammatoire non-spécifique, le PZQ entraîne également une régression des lésions viscérales, si elles ne sont pas trop anciennes.

Bien que ces effets sur le parasite soient connus, le mode d'action de cette molécule reste encore mal déterminé. Le PZQ provoque *in vitro* une contraction musculaire paralysante, une dépolarisation membranaire et un influx de calcium suivi par une rupture du tégument du ver adulte entraînant une mort rapide du parasite. Il agit également, à un moindre degré, sur les schistosomules et les oeufs en transit dans les tissus. De plus, le PZQ semble modifier le profil des antigènes de surface du schistosome, exposant notamment certaines enzymes (la phosphatase alcaline pour *S. mansoni* et la glutathione S-transférase de 26 kDa pour *S. japonicum*) qui deviennent alors plus accessibles au système immunitaire (Fallon and Doenhoff. 1994; McTigue *et al.* 1995).

L'efficacité de ce traitement est cependant associée à de nombreux effets secondaires et, bien que reconnue non tératogène, la prescription du PZQ est à éviter chez la femme enceinte. D'autre part, ce médicament semble diminuer l'immunité acquise à la réinfection (Moloney *et al.* 1987) et son coût élevé en restreint l'usage dans les PVD.

Une nouvelle observation vient également porter une ombre sur l'utilisation du PZQ comme médicament de référence contre les schistosomes; il s'agit de l'apparition d'une population de parasites résistants à cette molécule. En effet, de telles résistances ont été mises en évidence au laboratoire (Fallon and Doenhoff. 1994; Ismaïl *et al.* 1994) ainsi que dans certains foyers d'infection naturelle (Sénégal, Egypte) où l'on observe un taux de guérison plus faible (60%) suite au traitement par le PZQ (Fallon *et al.* 1995). De tels phénomènes de résistance ont également été observés pour l'oxamniquine (Fallon *et al.* 1996).

L'oxamniquine est la deuxième molécule utilisée dans le traitement de la bilharziose. Elle a une action paralysante sur le ver, provoquant ainsi son reflux dans la circulation portale intra-hépatique où les mâles sont détruits. Les femelles semblent survivre mais cessent alors de pondre. Cette molécule, uniquement active sur *S. mansoni*, a l'avantage d'être quatre fois moins chère que le PZQ.

Cependant, quelle que soit l'efficacité d'un traitement chimiothérapeutique, celui-ci ne prévient pas les réinfections chez les jeunes enfants, qui peuvent réapparaître très rapidement en zone d'endémie.

Des efforts de prophylaxie sanitaire, basée sur l'interruption du cycle parasitaire, ont été entrepris. Ils ont été abordés à plusieurs niveaux: élimination de la forme infestante du schistosome par l'éradication des mollusques vecteurs (peu efficace et dangereux pour l'environnement), réduction de la contamination des plans d'eau par les excréments et diminution

des contacts de la population avec le biotope contaminé (disposition difficile à mettre en place sur le terrain).

Pour ces raisons, la lutte contre la bilharziose s'oriente désormais vers une stratégie visant à l'élaboration d'une prophylaxie médicale basée sur l'utilisation d'un vaccin. Cette approche vaccinale devra probablement être associée avec un traitement préalable au PZQ. Ceci a entraîné le développement d'une étude approfondie de la réponse immune de l'hôte à l'infection par les schistosomes.

## **VI. Réponse immune développée au cours d'une infection à *S. mansoni*.**

### **A. La réponse anticorps et les phénomènes d'ADCC: les mécanismes effecteurs chez l'homme et chez le rat.**

L'une des approches entreprises pour déterminer les mécanismes immunitaires développés par l'hôte humain en réaction aux parasites, est basée sur des études épidémiologiques de populations touchées par la bilharziose.

Les résultats obtenus lors de deux études épidémiologiques s'appliquant à une infection par *S. mansoni* chez des populations kenyanes (Dunne *et al.* 1992) et brésiliennes (Rihet *et al.* 1991; Demeure *et al.* 1993), montrent une corrélation positive entre la réponse IgE spécifique des antigènes du parasite et l'acquisition d'une résistance à la réinfection (après chimiothérapie). De la même manière, lors d'une infection à *S. haematobium*, des taux élevés d'IgE sont associés avec une résistance à la réinfection (Ndhlovu *et al.* 1996), principalement chez les jeunes enfants (Hagan *et al.* 1991). Dans le cas d'infections à *S. mansoni*, bien que la réponse IgA sérique contre les antigènes totaux soit seulement associée de manière non significative à l'acquisition âge-dépendante d'une immunité (Dunne *et al.* 1992), la réponse IgA contre une glutathion *S*-transférase de 28 kDa (Sm28GST) augmente significativement avec l'âge des individus. Ces anticorps sont par ailleurs capables d'inhiber l'activité enzymatique de la protéine, réduisant la fécondité des vers femelles et la viabilité des oeufs produits (Grzych *et al.* 1993).

D'autre part, des phénomènes de cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC pour Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), mettant en jeu des IgG et des éosinophiles, ont été mis en évidence chez l'homme (Butterworth *et al.* 1975; Khalife *et al.* 1989). Cependant, l'étude approfondie de ces mécanismes, induisant la lyse des schistosomules *in vitro*, a été

réalisée chez le rat, hôte semi-permissif pour le schistosome c'est-à-dire chez lequel le parasite, n'atteignant pas sa maturité, ne pond pas d'oeufs et est expulsé 3 semaines après l'infection. Chez le rat, l'immunité à la réinfection est principalement basée sur ces phénomènes d'ADCC qui font intervenir des cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes (macrophages (Capron *et al.* 1975), éosinophiles (Capron *et al.* 1981), et plaquettes (Joseph *et al.* 1983)) et des anticorps anaphylactiques (IgE et IgG2a) (Verwaerde *et al.* 1987; Grzych *et al.* 1982). Ces interactions nécessitent l'expression de récepteurs cellulaires Fc pour les anticorps (le récepteur de haute affinité aux IgE Fc $\epsilon$ RI vient d'être récemment décrit sur les éosinophiles (Soussi-Gouni *et al.* 1995)) et la présence d'isotypes particuliers d'anticorps. Ainsi, alors que les IgG2a provoquent une cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules en présence d'éosinophiles et sont capables, *in vivo*, de conférer une protection après transfert passif, les IgG2c de même spécificité sont capables d'inhiber cette cytotoxicité (Capron *et al.* 1987). Ces anticorps, IgG2c chez le rat (Grzych *et al.* 1984), IgM, IgG2 et IgG4 lors d'une infestation humaine (Khalife *et al.* 1986; 1989; Demeure *et al.* 1993), sont dits "bloquants" de par leur capacité à neutraliser la formation de l'interaction cellules effectrices/anticorps/schistosomule.

## B. L'immunité protectrice chez la souris.

La souris, hôte permissif pour les schistosomes, est un modèle de choix pour étudier la pathologie liée à l'infection par *S. mansoni*. Le parasite y effectue son cycle entier ce qui se traduit par la ponte des oeufs et la formation des granulomes. L'utilisation de cet animal de laboratoire est donc propice aux protocoles d'immunisation à l'aide d'antigènes potentiellement protecteurs, ceci dans le but d'analyser l'immunité spécifique développée contre cet antigène et son effet sur le nombre de vers ou la charge en oeufs responsables de la pathologie.

L'étude de la réponse cellulaire T au cours d'une infection expérimentale montre une réponse Th1 générée durant la phase précoce de l'infection qui laisse place à un profil de cytokines de type Th2 induit par les oeufs. Cette relation causale entre les oeufs de schistosomes et la réponse Th2 est suggérée par l'apparition simultanée d'IL-4 et d'IL-5 produites par des cellules Th2 lorsque les vers commencent à pondre (Pearce *et al.* 1991), contrairement aux résultats observés lors d'une infection expérimentale unisexe de *S. mansoni* au cours de laquelle il n'y a évidemment pas de production d'oeufs (Grzych *et al.* 1991).

L'exposition de souris à des cercaires irradiées a permis d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes immunitaires développés chez la souris. Dans ce modèle, l'immunité est associée à la production d'IFN $\gamma$  produit par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1, générés au niveau de la peau puis recrutés au niveau des poumons. Le phénomène

d'attrition observé lors d'une infection suite à ce protocole d'immunisation pourrait être dû à la sécrétion de cytokines par ces cellules Th1 qui, induisant la formation d'agrégats cellulaires autour des parasites dans les poumons, bloquerait leur migration (Smythies *et al.* 1992). Malgré la forte inflammation locale qui parfois détruit le système vasculaire, il n'y a pas d'évidence quant à de potentiels effets cytotoxiques sur les parasites eux-mêmes (Crabtree and Wilson. 1986).

D'autre part, la réponse IgA sérique spécifique des antigènes de schistosomes (stade ver adulte, furcocercaire ou oeuf) ainsi que la production d'IgA au niveau des muqueuses intestinales augmentent après la ponte des oeufs. On a d'ailleurs pu mettre en évidence la présence de ces oeufs au niveau des follicules de plaque de Peyer (Poulain-Godefroy *et al.* 1996), montrant les relations intimes entre le parasite et le système muqueux de l'intestin au cours d'une infestation.

### **C. Les mécanismes de contrôle de la réponse immune de l'hôte développés par le parasite.**

Afin de se protéger contre la réponse immune de l'hôte à laquelle il est constamment exposé, le parasite va mettre en place des mécanismes de mimétisme moléculaire ou de "détournement" des composants de la réponse de l'hôte.

Le schistosomule va rapidement acquérir des antigènes de l'hôte. Le phénomène de mimétisme moléculaire se fait par acquisition passive de ces protéine (protéines du CMH ou de groupes sanguins) ou par l'expression de structures antigéniques analogues à celles de l'hôte (Capron. 1995a). Chez *S. mansoni*, l'augmentation de la production des oeufs par les vers femelles, suite à l'injection de TNF $\alpha$ , chez les souris SCID (où elle est généralement très faible) semble indiquer que le parasite est capable d'exprimer des protéines possédant des homologies avec les récepteurs présents chez l'hôte (Amiri *et al.* 1992).

Le schistosome est également capable de fixer ou d'exprimer certains facteurs (SCIP-1 pour "schistosome complement inhibitor", ou encore des serpines pour "serine protease inhibitor") qui vont permettre la neutralisation de certains composants impliqués dans les réactions de défense non-spécifiques (Fishelson. 1995).

Les protéases du parasite peuvent également dégrader les IgG fixés sur les vers, donnant naissance à des peptides qui possèdent des fonctions immunomodultrices *in vitro* sur les macrophages (Auriault *et al.* 1981).

De plus, les schistosomes produisent à tous les stades de leur développement des quantités significatives de dérivés du précurseur POMC (ProOpioMelanoCortine), conduisant à une immunosuppression des immunocytes de l'hôte intermédiaire ainsi que des monocytes de l'hôte définitif (Duvaux-Miret *et al.* 1992).

## VII. Approches vaccinales contre l'infection à *S. mansoni*.

La complexité des mécanismes immunitaires développés chez l'homme ou l'animal en réaction à une infection par *S. mansoni*, amplifiée par les stratégies mises en place par le parasite afin d'échapper à cette réponse immune, reflète les difficultés rencontrées lors de l'élaboration d'un vaccin contre la schistosomiase (Pierce and Capron. 1994a).

Deux caractéristiques de l'infection par les schistosomes sont essentielles à la conception d'un tel vaccin :

- Ces parasites ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif, et donc une immunité partielle non stérilisante, acquise de façon naturelle ou suite à une vaccination, peut avoir un impact considérable sur la charge en vers et donc sur l'incidence de la pathologie et la transmission de la maladie.
- Puisque les oeufs sont les principaux responsables de la pathologie, une immunisation qui réduirait la fécondité des vers femelles ou qui diminuerait la réaction granulomateuse autour des oeufs, accompagnée ou non par une réduction du nombre de vers adultes, entrainerait une diminution de la morbidité des populations touchées, limiterait les formes aiguës de la maladie et contrôlerait sa transmission.

### A. Les antigènes à potentiel vaccinal.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses molécules potentiellement vaccinales ont été caractérisées, clonées et produites en bactérie ou en levure. Quelques unes d'entre elles présentent un effet protecteur chez l'animal contre une infection par des schistosomes.

Parmi elles, l'OMS a retenu 6 antigènes comme candidats vaccinaux contre l'infection par *S. mansoni* (Bergquist. 1995).

#### - La paramyosine

Il s'agit d'une protéine de 97 kDa isolée à partir des antigènes de vers adultes. L'immunisation de souris à l'aide de la paramyosine recombinante en présence de BCG comme adjuvant, induit une protection de l'ordre de 39% (Pearce *et al.* 1988).

#### - La protéine IrV-5 (irradiation-associated vaccine antigen)

Cette protéine de 62 kDa a été isolée à partir d'antigènes de surface de schistosomules à l'aide de sérums provenant de souris vaccinées à l'aide de cercaires irradiées. Un taux élevé de protection (60 à 80%) est obtenu chez la souris après trois injections intrapéritonéales ou



sous-cutanées de la protéine recombinante (Amory-Soisson *et al.* 1992), mais les résultats obtenus chez le babouin sont beaucoup plus variables.

- La Sm23

La structure proposée de cet antigène membranaire de 23 kDa suggère la présence de 4 domaines transmembranaires et de 2 domaines extracellulaires hydrophiles (Reynolds *et al.* 1992). La Sm23 est un antigène protecteur puisque des expériences d'immunisation à l'aide d'un peptide synthétique contenant les épitopes de cellules B et T confèrent 45 à 80% de protection en termes de réduction du nombre de vers chez la souris.

- La Sm14 ou FABP-14 (Fatty Acid Binding Protein)

Cet antigène membranaire (Moser *et al.* 1991), présent au stade schistosomule, protège la souris à 65% et le lapin à 95%. La Sm14 de *S. mansoni* présente de fortes homologues avec la protéine Fh12 de *Fasciola hepatica*, parasite responsable d'atteintes hépatiques. Ainsi, l'immunisation de souris avec la protéine Fh12 protège contre l'infection par *S. mansoni* (Tandler *et al.* 1995). De telles réactions croisées permettent d'envisager une vaccination contre plusieurs parasites co-endémiques.

- La TriosePhosphate Isomérase (TPI)

Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme du glucose. Elle a été identifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal qui reconnaissait un antigène de 28 kDa à tous les stades du développement parasitaire (Harn. 1985). Cette protéine a été clonée et la TPI recombinante exprime l'activité enzymatique. Chez la souris, les taux de protection varient de 30 à 60%.

- La Sm28GST

Le candidat vaccinal le mieux caractérisé, et avec lequel les études d'immunisation et de protection ont été les plus poussées, est une glutathion S-transférase de 28 kDa de *S. mansoni* (Capron *et al.* 1995b). C'est le seul candidat actuel dont l'injection entraîne non seulement une réduction du nombre de vers mais également une diminution de la fécondité des vers femelles et de la viabilité des oeufs. L'ensemble des caractéristiques et propriétés de la Sm28GST seront repris dans le chapitre suivant.

## B. La Sm28GST de *S. mansoni*.

### a. Découverte et caractérisation de la Sm28GST.

L'identification d'une fraction de 28 kDa provenant d'antigènes solubles de vers adultes de *S. mansoni*, qui induisait une réponse anticorps protectrice et qui conférait des taux élevés de protection chez le rat Fisher (50 à 70%) et chez la souris Balb/C (40 à 43%) par immunisation directe en présence d'adjuvants (Balloul *et al.* 1985; 1987a), a été suivie, après criblage d'une banque d'expression, par le clonage et le séquençage de l'ADNc codant pour le composé antigénique majeur de cette fraction (Balloul *et al.* 1987b). La comparaison de la séquence protéique de cette protéine de 211 acides aminés a montré des homologues avec la famille des GSTs, enzymes répandues dans tout le règne animal et végétal et essentielles au métabolisme cellulaire (Taylor *et al.* 1988).

L'ADNc complet de cette protéine, alors baptisée Sm28GST, a été sous-cloné et exprimé chez *E. coli* (Balloul *et al.* 1987b) et *Saccharomyces cerevisiae* (Loison *et al.* 1989) sous une forme enzymatiquement active, ce qui permet sa purification par chromatographie d'affinité sur glutathion-agarose. Le clonage et le séquençage du clone génomique a permis de déterminer la taille du gène complet codant pour la Sm28GST (5,5 kb) et la présence de 4 exons (McNair *et al.* 1993).

### b. La famille des GSTs.

#### 1. Généralités.

Les GSTs sont une famille d'enzymes qui ont de multiples fonctions dans la protection de la cellule, notamment contre les composés réactifs générés par les radicaux libres. Ils sont essentiels chez les helminthes qui possèdent peu d'enzymes de réparation et semblent dépourvus de cytochromes P-450 (Precious and Barret. 1989). Ces derniers ont un rôle primordial chez les mammifères en intervenant dans les processus d'oxydoréduction constitutifs lors de la phase primaire de détoxification (Coon and Vaz. 1988).

L'origine des radicaux libres, libérés lors d'une infection par un pathogène intra- ou extracellulaire (Hughes. 1988), peut être multiple. Ces composés oxygénés peuvent dériver du métabolisme cellulaire, de phagocytes activés ou de cellules du système immunitaire (macrophages, plaquettes, neutrophiles ou éosinophiles) activées par le complément ou par des anticorps.

Pour se défendre, les parasites possèdent plusieurs types d'enzymes impliquées dans la détoxification de ces radicaux oxydants, telles que la catalase, la cytochrome c peroxydase, la superoxyde dismutase ou encore les enzymes dépendantes du glutathion

comme les GSTs (Brophy and Barret. 1990) et les glutathion peroxydases (Roche *et al.* 1994).

Les GSTs, considérées comme des enzymes ubiquitaires, jouent donc un rôle essentiel dans la protection des tissus face aux dommages oxydatifs. Elles agissent en catalysant l'attaque nucléophile du glutathion (GSH) sur des composés hydrophobes qui peuvent être des substrats exogènes ou des composés endogènes résultant du métabolisme oxydatif. La conjugaison du GSH diminue la réactivité de ces molécules toxiques et augmente leur caractère hydrophile, facilitant ainsi leur solubilisation et leur élimination sous forme inactivée (Boylard and Chasseaud. 1969). De plus, il semble que chez les helminthes, notamment chez *S. mansoni*, les GSTs pourraient également être à l'origine d'une résistance contre un médicament antiparasitaire, le dichlorvos (O'Leary and Tracy. 1991).

Parallèlement à leur rôle de défense, les GSTs peuvent parfois participer à la synthèse de molécules physiologiquement actives telles que les prostaglandines, les leucotriènes C<sub>4</sub>, ainsi qu'au transport et au stockage intracellulaire de molécules lipophiles (Ketterer *et al.* 1988).

## 2. Les GSTs chez les schistosomes.

Plusieurs travaux suggèrent que les GSTs sont cruciales pour le parasite afin qu'il puisse se défendre contre les mécanismes immunitaires spécifiques et non-spécifiques développés par l'hôte, et que l'inhibition de cette activité enzymatique entraîne la mort du parasite (Taylor *et al.* 1988; Mitchell. 1989). Cette supposition est renforcée par la localisation des GSTs dans le tégument, le parenchyme, et l'épithélium oesophagien (Liu *et al.* 1996). La Sm28GST est également retrouvée dans les organes génitaux des vers adultes et les glandes céphaliques des schistosomules. Ceci explique la présence de la Sm28GST dans les sécrétions larvaires (Taylor *et al.* 1988; Trottein *et al.* 1990). La Sm28GST est également présente chez les miracidiums, les cercaires, et dans les oeufs de schistosomes. Des données, qui apparaîtront dans le chapitre sur les propriétés immunologiques de la Sm28GST, laissent penser que cette activité enzymatique jouerait un rôle important, directement ou indirectement, sur la fécondité des vers femelles et la viabilité des oeufs. Les schistosomes expriment donc une activité GST à tous les stades de leur développement, ce qui fait de la Sm28GST une cible potentielle intéressante.

Les schistosomes possèdent deux familles de GSTs de 26 et 28 kDa (Balloul *et al.* 1987a; Trottein *et al.* 1990, 1992). La Sm28GST peut être exprimée sous trois formes variantes: SmGST-1, SmGST-2, et SmGST-3 qui diffèrent entre elles par deux acides aminés en position 61 et 136 (SmGST-1: Asp/Leu; -2: Asn/Phe; -3: Asn/Leu) (Pierce *et al.* 1994b). Les isoenzymes natives sont des dimères, SmGST-1 et -3 se présentant sous

forme homodimérique, SmGST-2 étant un hétérodimère composé d'une sous-unité SmGST-1 et d'une sous-unité SmGST-3.

La comparaison des séquences peptidiques des GST des différentes espèces de schistosomes montre un fort degré de conservation, laissant supposer des réactions croisées au niveau épitopique qui pourraient permettre de protéger contre plusieurs espèces de schistosomes à l'aide d'un seul antigène vaccinal. Sb28GST (*S. bovis*) est identique à 97% à Sh28GST (*S. haematobium*), elle-même identique à 90% à Sm28GST. Par contre, le degré d'identité de ces GST avec la Sj28GST (*S. japonicum*) est plus faible (respectivement 78, 76, et 77%) (Trottein *et al.* 1992). La similitude de séquence entre les formes de 28 et de 26 kDa de *S. mansoni* n'est pas significative (Trottein *et al.* 1990).

D'autre part, malgré la conservation de structure entre les GSTs de schistosomes et de mammifères, aucune réaction immunologique croisée n'a été observée entre ces enzymes parasitaires et celles correspondantes chez le rat et chez l'homme (Taylor *et al.* 1988).

### c. Les propriétés immunologiques de la Sm28GST.

#### 1. L'effet protecteur de la Sm28GST.

La Sm28GST recombinante induit une immunité protectrice chez le modèle rat et hamster (Balloull *et al.* 1987b; Grezel *et al.* 1992), chez le babouin (Balloull *et al.* 1987c; Boulanger *et al.* 1991) et chez la souris (Boulanger *et al.* 1991; Xu *et al.* 1993, Pancré *et al.* soumis). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50-70% chez le rat à 30-45% chez la souris et 38% chez le babouin. Ce dernier modèle est représentatif d'un des problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'un unique antigène recombinant chez des animaux qui ne sont pas syngéniques, et chez lesquels une forte variation individuelle est obtenue. En effet, les taux individuels de protection varient de 0 à 80%.

L'ensemble de la discussion ayant trait à la protection contre une infection par les schistosomes portait auparavant sur la réduction du nombre de parasites chez les animaux immunisés. Les expériences d'immunisation chez les babouins et les souris à l'aide de la Sm28GST recombinante ont mis en évidence un effet protecteur différent, qui n'avait jusque-là encore jamais été observé. Cet effet correspond à une réduction de la fécondité des vers femelles qui se traduit par une diminution des oeufs excrétés chez les animaux immunisés, et une réduction de la charge tissulaire en oeufs (Boulanger *et al.* 1991). De même, des travaux réalisés chez le veau avec la Sb28GST de *S. bovis* (Trottein *et al.* 1992) montrent une réduction de l'excrétion des oeufs et de la densité tissulaire, non associée à une diminution de vers (Bushara *et al.* 1993). Inversement, des chèvres immunisées avec Sb28GST voient une réduction de leur charge parasitaire après infection par *S. bovis*, mais pas d'effet sur la fécondité (Boulanger *et al.* 1995). Des différences importantes quant à l'effet de la vaccination

avec Sb28GST semblent donc être observées en fonction de l'espèce animale. D'autre part, des singes *patas*, immunisés avec la rSm28GST, puis infestés expérimentalement avec *S. haematobium*, développe une diminution marquée de la fécondité des vers et de la viabilité des oeufs (Boulanger *et al.* 1995). Ces résultats soulignent les potentialités vaccinales de la Sm28GST dans le contrôle de la pathologie induite par les oeufs et la transmission de la schistosomiase, même lorsqu'il s'agit d'une infestation hétérologue.

## 2. Sm28GST et anticorps.

Partant de l'hypothèse que l'effet protecteur associé à l'immunisation avec la Sm28GST pourrait être dû à l'inhibition de l'activité enzymatique GST qui est vitale à la survie du parasite dans son hôte définitif (Taylor *et al.* 1988; Mitchell. 1989), un anticorps monoclonal (S13) qui inhibe l'activité enzymatique de la Sm28GST *in vitro*, a été utilisé pour déterminer un éventuel lien entre l'immunité protectrice et l'activité GST. Le transfert passif de S13 chez des souris Balb C, préalablement infectées par *S. mansoni*, entraîne une réduction du nombre de vers, ce qui n'est pas le cas d'un autre anticorps monoclonal (H2) dirigé contre la Sm28GST mais ne bloquant pas son activité enzymatique. Quand S13 est transféré passivement 15 ou 30 jours avant l'infection, aucun effet sur le nombre de vers n'est observé, mais une forte réduction du nombre d'oeufs dans les tissus est mise en évidence (Xu *et al.* 1991). Transféré de la même manière, H2 n'a aucun effet, laissant supposer un lien entre l'inhibition de l'activité GST et l'immunité anti-fécondité. L'utilisation de S13, après immunisation avec la Sm28GST, induit également une réduction de la viabilité des oeufs produits qui se traduit par une diminution du nombre d'oeufs matures présents et de leur capacité à éclore *in vitro*.

L'anticorps monoclonal S13 interagit avec des peptides dérivés des domaines N- et C-terminaux de la Sm28GST (Xu *et al.* 1993). Cette reconnaissance des deux extrémités de la protéine par un même anticorps peut être expliquée par la structure tridimensionnelle proposée après cristallisation de la Sm28GST et par extrapolation des structures des GSTs de mammifères (Trottein *et al.* 1992b). L'utilisation du peptide C-terminal (peptide 190-211), conjugué à l'ovalbumine, induit la production d'anticorps capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST, entraîne une réduction partielle du nombre de vers suite à une infection expérimentale, et surtout, se traduit par une réduction marquée de la charge en oeufs dans les tissus et de leur viabilité. La relevance de ces observations lors d'une infection humaine est suggérée par la capacité des IgA sériques d'individus infectés à inhiber la fécondité des couples de vers adultes maintenus en culture (Grzych *et al.* 1993).

Le peptide 190-211 de la Sm28GST correspond à un épitope majeur chez l'homme puisqu'il est capable de stimuler la prolifération des lymphocytes du sang périphérique chez la plupart des individus infectés (Wolowczuk *et al.* 1996). Parmi les autres épitopes importants de la Sm28GST, initialement définis dans les modèles animaux (Auriault *et al.* 1988; Wolowczuk *et al.* 1989; 1991), le peptide 115-131, porteur d'épitope(s) T et B, est

particulièrement intéressant. Un octopus (8 copies) de ce peptide induit une immunité protectrice chez le rat et la souris (Wolowczuk *et al.* 1991). La région 24-43 est également considérée comme porteuse d'épitope(s) T (on retrouve des cellules spécifiques chez les animaux ayant reçu la Sm28GST, mais peu d'anticorps spécifiques)

## 2. Sm28GST et réponse cellulaire T.

La réponse cellulaire T contre la Sm28GST joue un rôle important de par son implication dans la réduction du nombre d'oeufs dans le foie et dans la diminution de la pathologie hépatique, mesurée par le taux de collagène contenu dans le foie des souris infectées (Pancré *et al.* soumis). Dans ce modèle, les souris immunisées avec une seule dose de rSm28GST développent des réponses CD4<sup>+</sup> Th1 et CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène, et les effets protecteurs peuvent être complètement abolis par l'administration d'anticorps anti-IFN $\gamma$  (Pancré *et al.* 1994). Cette cytokine semble donc être impliquée dans l'immunité protectrice obtenue après immunisation avec la rSm28GST.

## ***Cadre - Objectifs***

L'un des enjeux actuels de la vaccinologie est de parvenir à élaborer de nouvelles préparations vaccinales qui pourraient être administrables par voie muqueuse.

L'approche muqueuse paraît très prometteuse car elle permet d'induire à la fois une réponse locale et une réponse immune sérique. Cette voie d'administration vaccinale se traduit donc par la capacité à prévenir les infections au niveau des muqueuses, porte d'entrée de nombreux pathogènes, ainsi que par la stimulation du système immunitaire systémique de l'individu receveur en évitant les inconvénients liés à une administration par injection à travers la peau (contaminations, nécessité d'un encadrement médical important).

Dans le cadre du développement d'une stratégie vaccinale contre la bilharziose, nous avons choisi une approche consistant à vectoriser un antigène vaccinal très prometteur, la Sm28GST, à l'aide d'une bactérie ayant un tropisme pour les muqueuses des voies respiratoires, *Bordetella pertussis*.

La capacité de cette protéine parasitaire à induire une immunité protectrice a été démontrée chez les rongeurs et les primates. En effet, l'immunisation à l'aide de la Sm28GST recombinante, en présence de différents adjuvants, conduit à une réduction partielle mais significative du nombre de vers, ainsi que de la fécondité des vers femelles et de la viabilité des oeufs. Or, des études épidémiologiques récentes (Butterworth, 1992) ont montré qu'une diminution de la charge parasitaire de l'ordre de 60% diminuerait de manière considérable les manifestations pathologiques tout en affectant, à terme, le potentiel de transmission. Une stratégie vaccinale conduisant à une réduction simultanée du nombre de vers et de la fécondité des vers femelles affecterait donc profondément les manifestations pathologiques en même temps que la transmission du parasite.

Sur la base de ce concept, diverses stratégies faisant appel à des vecteurs synthétiques (liposomes, microsphères) ou à des vecteurs vivants (*Salmonella*, BCG) ont été développées au cours de ces dernières années.

- L'administration orale de la Sm28GST associée à des liposomes conduit à une réponse spécifique muqueuse et sérique, liées à une protection significative (53%) chez la souris



Balb/C (Ivanoff *et al.* 1996). L'administration par voie nasale induit une réponse immune spécifique dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et dans le sérum des souris immunisées.

- Des souris immunisées à l'aide de microsphères contenant de la Sm28GST par voie orale produisent des anticorps contre la protéine parasitaire sur une très longue période (au moins neuf mois) (Baras. communication personnelle).

- Une souche recombinante de *S. typhimurium* exprimant la Sm28GST en fusion avec le fragment C de la toxine tétanique (TetC) a été utilisée pour l'immunisation orale de souris (Khan *et al.* 1994). Une réduction de la charge parasitaire (environ 50%) a été observée mais elle n'est pas associée à une diminution de la fécondité.

- Une souche de BCG recombinant est capable, par différentes voies d'administration systémiques et muqueuse (nasale) chez la souris Balb/C, d'induire une réponse spécifique de la Sm28GST et notamment des anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST (Kremer *et al.* 1996), l'inhibition de cette activité étant corrélée à l'effet anti-fécondité.

- Une nouvelle stratégie de vaccination à l'aide d'un plasmide contenant l'ADNc de la Sm28GST est actuellement en cours de développement. Les résultats de protection chez le rat semblent très prometteurs (Dupré *et al.* soumis).

L'originalité de notre démarche réside dans l'utilisation d'un pathogène des voies respiratoires comme vecteur recombinant vivant.

*B. pertussis*, agent étiologique de la coqueluche, a la capacité de coloniser le tractus respiratoire de l'homme et de la souris. Cette colonisation entraîne une stimulation prolongée du système immunitaire de l'individu receveur. De plus, l'administration par voie intranasale est relativement aisée et permet d'éviter l'environnement acide et protéolytique de l'estomac rencontré après administration par voie orale. Enfin, le tractus respiratoire est relativement peu colonisé par des bactéries commensales, comparativement à l'intestin. Il n'y aura donc pas ou peu de compétition entre le vecteur vivant et les bactéries déjà présentes.

L'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur recombinant vivant est basée sur l'exploitation des propriétés de son adhésine majeure, l'hémagglutinine filamenteuse ou FHA. Cette protéine est présente à la surface de la bactérie et également sous forme sécrétée. Elle est impliquée dans les mécanismes d'adhésion de la bactérie à au moins trois types cellulaires distincts (cellules épithéliales ciliées et non ciliées, macrophages alvéolaires). Cette protéine bactérienne est également fortement immunogène. En effet, la FHA est capable d'induire la production d'un taux élevé d'anticorps au niveau mucosal et systémique, et ce, sur une longue période, après une infection naturelle chez l'homme ou expérimentale chez la souris.

Nous avons donc voulu exploiter les différentes propriétés de la cette protéine en réalisant une fusion génétique de la FHA avec la Sm28GST, afin que cet antigène parasitaire soit présenté aux muqueuses des voies respiratoires par l'intermédiaire de *B. pertussis* recombinant, ce qui représente un avantage non-négligeable puisque les poumons sont un lieu de passage obligé pour les parasites.

Dans un premier temps, nous nous sommes appliqués à étudier la biogenèse de la FHA. Une meilleure compréhension des mécanismes de sécrétion de cette protéine bactérienne et des régions du précurseur FhaB ou de la protéine mature FHA impliquées, était essentielle à la détermination des sites d'insertion de l'ADNc codant pour la Sm28GST dans le gène de la FHA, de manière à obtenir l'expression d'une protéine hybride à la surface de la bactérie et/ou sécrétée.

Notre objectif suivant a donc été de construire plusieurs souches recombinantes de *B. pertussis* exprimant la Sm28GST en fusion avec la FHA.

Nos travaux se sont ensuite concentrés sur une des souches qui paraissait la plus prometteuse, la souche de *B. pertussis* BPGR60 qui exprime une Sm28GST, modifiée au niveau de son résidu cystéine, en fusion avec la FHA. L'administration de BPGR60 par voie intranasale à des souris OF1 induit une réponse contre la Sm28GST dans les LBA et la production locale et transitoire de cytokines pro-inflammatoires. Nous nous sommes alors appliqués à déterminer la capacité de cette souche recombinante de *B. pertussis* à stimuler une mémoire immune spécifique, en réalisant différents types de rappel chez des souris préalablement immunisées avec BPGR60. Le pouvoir protecteur de ce protocole d'immunisation a été évalué contre une infection par *S. mansoni* et également contre *B. pertussis*.

Les résultats obtenus à l'aide de la souche BPGR60 sont prometteurs. Cependant, la virulence de cette bactérie freine toute application potentielle comme vecteur recombinant vivant chez l'homme. Notre troisième objectif a donc consisté à construire une souche recombinante atténuée exprimant la Sm28GST en fusion avec la FHA. Nous avons tout d'abord déterminé le degré d'atténuation permettant à la bactérie de conserver sa capacité à coloniser le tractus respiratoire et induire une réponse immune contre la FHA, tout en diminuant l'intensité de l'inflammation au niveau des muqueuses des voies pulmonaires. De manière intéressante, la délétion du gène codant pour la toxine de pertussis (PTX) entraîne, en plus d'une réduction marquée du phénomène inflammatoire local, une augmentation significative de la réponse anti-FHA sérique.

L'application de ces résultats nous a amené à construire une souche recombinante atténuée exprimant la Sm28GST, appelée BPNX. De manière comparable, l'administration de

BPNX induit une forte réponse anti-FHA et, alors que l'immunisation avec la souche recombinante virulente (BPGR60) n'entraîne pas la production d'anticorps anti-Sm28GST sérique, cette réponse est observée avec la souche recombinante atténuée (BPNX). L'immunité protectrice induite par l'administration intranasale de BPNX a été évaluée contre une infection par *S. mansoni*.

Le dernier aspect qu'il nous semblait important de déterminer dans le cadre d'une stratégie vaccinale a consisté à évaluer la réponse immune induite après administration intranasale de *B. pertussis* recombinante chez des souris soit déjà vaccinées contre la coqueluche (la plupart des cas dans les pays industrialisés), soit ayant déjà été infectées par *B. pertussis* sauvage ou par le parasite *S. mansoni*.

## ***Résultats***

## I. Contribution à l'étude de la biogenèse de la FHA.

La virulence des microorganismes pathogènes est bien souvent associée à la sécrétion de protéines (adhésines et toxines) dont le rôle est finalement d'assurer leur développement en leur permettant de se fixer et de coloniser leur niche écologique, et en déviant à leur profit le métabolisme de l'hôte infecté.

*B. pertussis* est une bactérie Gram négative qui possède une membrane interne et une membrane externe, séparées par un espace, le périplasme. Les protéines sécrétées ou présentes à la surface de *B. pertussis* doivent donc traverser deux membranes, ce qui nécessite un système complexe d'exportation qui reste encore mal connu. Parmi les différents facteurs de virulence, la FHA représente le produit majeur de sécrétion et joue un rôle primordial dans l'adhésion de la bactérie au niveau du tractus respiratoire de l'individu infecté. Notre étude a donc porté sur les mécanismes impliqués dans la présentation de cette adhésine à la surface de la bactérie et sous forme sécrétée.

### A. La sécrétion de la FHA.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la FHA (220 kDa) est l'adhésine majeure de *B. pertussis* et provient de la maturation d'un précurseur (FhaB) de 370 kDa. Le produit primaire du gène *fhaB*, le précurseur de la FHA, est appelé FhaB. Sachant que la région N-terminale homologue aux hémolysines ShIA et HpmA est importante pour la biogenèse de la FHA (Willems *et al.* 1994), il était important d'explorer également le rôle de la région C-terminale de FhaB.

Afin de savoir s'il était possible de compléter une mutation chromosomique du gène *fhaB* par un plasmide autorépliquatif, nous avons, dans un premier temps, utilisé la souche de *B. pertussis* BPGR4 (Locht *et al.* 1992), dérivée de la souche sauvage BPSM chez laquelle le fragment *EcoRI* de 10 kpb contenant la plupart de la phase de lecture du gène *fhaB* et son promoteur a été délété du chromosome par deux événements successifs de recombinaison homologue. Cette souche ne produit pas de FHA. Nous avons montré qu'un plasmide recombinant (pBG1), dérivé de pBBR1 isolé de *Bordetella bronchiseptica* (Antoine *et al.* 1992), et possédant le fragment *EcoRI* de *fhaB*, est capable de compléter efficacement la mutation *fhaB* de *B. pertussis* BPGR4.

Des délétions progressives ont alors été réalisées à partir de l'extrémité 3' terminale du gène *fhaB* jusqu'au côté 5' terminal et les plasmides correspondants ont été introduits dans BPGR4 par électroporation. Les surnageants de culture des différentes souches ont été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ainsi que par Western-blot en utilisant des anticorps polyclonaux de rat anti-FHA. Suite à ces délétions, une absence ou un niveau très réduit de FHA est observé, indiquant que la région C-terminale du précurseur est impliquée dans la biogenèse de la FHA, ce qui n'est cependant pas le cas pour la sécrétion d'un fragment tronqué (Fha44) de taille inférieure (80 kDa).

La Fha44 étant sécrétée très efficacement, il était important de savoir si cette sécrétion dépendait toujours de FhaC, protéine accessoire présente sur la membrane externe de la bactérie. Le plasmide pBG4, codant pour la protéine tronquée Fha44, a donc été introduit dans la souche BPMC (Locht *et al.* 1992), caractérisée par une délétion chromosomique du gène *fhaB* et de la région intergénique entre *fhaB* et les gènes auxiliaires en aval, y compris *fhaC*. Elle n'exprime donc ni *fhaB*, ni *fhaC*, ni les gènes *fimBCD*. La souche BPMC(pBG4) ne produit pas de protéine tronquée extracellulaire, montrant que l'expression du gène *fhaC* est nécessaire à la production extracellulaire de la région N-terminale de la FHA. Nous avons également pu montrer que la région N-terminale de la FHA homologue aux hémolysines ShIA et HpmA est nécessaire à la sécrétion de la FHA tronquée, comme à celle de la FHA complète.

La FHA de *B. pertussis* peut interagir avec l'héparine et être purifiée sur héparine-Sépharose (Menozzi *et al.* 1991). Les résultats obtenus avec la Fha44 montrent que la région N-terminale correspondante de la FHA contient le site de fixation à l'héparine. Cette protéine tronquée est également capable, à un taux plus faible que la FHA entière, d'hémagglutiner les érythrocytes de moutons.

D'autre part, la protéine Fha44 est faiblement reconnue par un anticorps anti-FHA. Réciproquement, la FHA entière est faiblement reconnue par un anticorps anti-Fha44, indiquant que la région N-terminale de la FHA est masquée par son domaine C-terminal. Cette observation est en accord avec la structure en "épingle à cheveux" de la FHA décrite par Makhov *et al.* (1994). La Fha44, contrairement à la FHA mature dont la région N-terminale est masquée par son domaine C-terminal, possède donc une région N-terminale libre d'interagir avec FhaC ce qui pourrait expliquer le fort taux de sécrétion de cette protéine tronquée. Ainsi, bien que le domaine C-terminal de FhaB soit clivé durant la maturation de la FHA, il joue un rôle important dans la sécrétion de la FHA.

L'ensemble des résultats obtenus en collaboration avec G. Renauld-Mongénie et J. Cornette, est documenté dans la publication intitulée "Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin".

## Distinct Roles of the N-Terminal and C-Terminal Precursor Domains in the Biogenesis of the *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin

GENEVIÈVE RENAULD-MONGÉNIÉ,<sup>1†</sup> JOCELYNE CORNETTE,<sup>1</sup> NATHALIE MIELCAREK,<sup>1</sup>  
FRANCO D. MENOZZI,<sup>2</sup> AND CAMILLE LOCHT<sup>2\*</sup>

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM 167,<sup>1</sup> and Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM C/JF9109, IFR17,<sup>2</sup> Institut Pasteur, F-59019 Lille Cedex, France

Received 16 June 1995/Accepted 2 December 1995

The 220-kDa *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin (FHA) is the major exported protein found in culture supernatants. The structural gene of FHA has a coding potential for a 367-kDa protein, and the mature form constitutes the N-terminal 60% of the 367-kDa precursor. The C-terminal domain of the precursor was found to be important for the high-level secretion of full-length FHA but not of truncated analogs (80 kDa or less). The secretion of full-length and truncated FHA polypeptides requires the presence of the approximately 100-amino-acid N-terminal domain and the outer membrane protein FhaC, homologous to the N-terminal domains of the *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis* hemolysins and their accessory proteins, respectively. By analogy to these hemolysins, it is likely that the N-terminal domain of the FHA precursor interacts, directly or indirectly, with the accessory protein during FHA biogenesis. However, immunogenicity and antigenicity studies suggest that the N-terminal domain of FHA is masked by its C-terminal domain and therefore should not be available for its interactions with FhaC. These observations suggest a model in which the C-terminal domain of the FHA precursor may play a role as an intramolecular chaperone to prevent premature folding of the protein. Both heparin binding and hemagglutination are expressed by the N-terminal half of FHA, indicating that this domain contains important functional regions of the molecule.

Exported proteins in gram-negative microorganisms face the challenge of having to cross two distinct membranes, called the inner and outer membranes. In most cases, translocation through the inner membrane involves the signal peptide-dependent general secretion pathway (for a recent review, see reference 22). Important exceptions include the members of protein families related to the RTX hemolysins (31). Transport across the outer membrane often requires the concerted action of several accessory proteins that were thought to be specific for a given exported protein but that appear now to fall within distinct protein families.

Successful interaction of bacterial pathogens with their hosts usually requires the production of several extracellular proteins that constitute important virulence factors. Therefore, pathogenic organisms represent interesting models for the study of protein export, especially across the outer membrane. *Bordetella pertussis*, the etiologic agent of whooping cough, produces several virulence factors that are located at the outer surface of the organism or released into the extracellular milieu. These factors include pertussis toxin, adenylate cyclase toxin, filamentous hemagglutinin (FHA), fimbriae, and probably other proteins that have yet to be identified. Accessory genes important for the biogenesis and export of several of these factors have been isolated and studied (6, 14, 30, 32, 33). Interestingly, in each case the accessory proteins were found to be members of protein families involved in export and biogenesis of macromolecules in other bacterial genera.

Among the various protein export systems of *B. pertussis*, the FHA export machinery is particularly efficient, because FHA represents the major secreted protein in *B. pertussis* culture supernatants. This high efficiency is particularly interesting because of the large size of monomeric FHA polypeptides (220 kDa).

FHA is a major adhesin produced by several *Bordetella* species. It expresses at least three different adherence activities (for a recent review, see reference 13). The region downstream of the FHA structural gene (*fhaB*) contains several open reading frames, of which the three most proximal are involved in the biogenesis of the fimbriae (14, 32, 33) and the most distal is involved in the biogenesis of FHA (32). The protein encoded by this latter gene, named *fhaC*, has significant sequence similarities with accessory proteins involved in the secretion of hemolysins of *Serratia marcescens* (20) and *Proteus mirabilis* (27). In addition, the N-terminal region of FHA has strong sequence similarities with the N-terminal domains of the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins (4). This region was found to be important for hemolysin (25) and FHA export (32), respectively, strongly suggesting that the hemolysin export systems have characteristics in common with the export system for FHA.

The open reading frame of the *fhaB* gene has the capacity to code for a 367-kDa protein, referred to as FhaB (4, 5), and the mature protein, referred to as FHA, represents the approximately 60% N-terminal portion of FhaB. The C-terminal part of FhaB is not present in the mature FHA but contains several particular features, such as a proline/lysine-rich domain, several proline-rich repeats, and an RGD sequence.

To assess the functional role of the C-terminal and N-terminal regions of FhaB, we set out to analyze their involvement in the biogenesis of FHA, using progressive deletions from the 3' end of *fhaB* toward its 5' end. The results indicate that this

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM C/JF 9109, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 20.87.77.28. Fax: (33) 20.87.79.06.

† Present address: Pasteur Mérieux S.V., F-69280 Marcy l'Etoile, France.



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>B. pertussis</i>		
BPSM	Streptomycin- and nalidixic acid-resistant Tohama I derivative	17
BPGR4	10-kb <i>EcoRI</i> deletion of <i>fhaB</i>	14
BPGR7	0.45-kb <i>PstI</i> deletion in <i>fhaB</i>	32
BPMC	11.65-kb <i>EcoRI-SphI</i> deletion in <i>fhaB</i> and <i>fimA</i>	14
BPNJ4	Chromosomal insertion of pUC18EH in BPGR4	This study
<i>B. parapertussis</i>		
<i>E. coli</i> JM109	Clinical isolate	18
<b>Plasmids</b>		
pBBR122	Chloramphenicol- and kanamycin-resistant pBBR1 derivative	1a
pBG1	10-kb <i>EcoRI fhaB</i> fragment in pBBR122	This study
pBG13	<i>BglII-BamHIc</i> deletion in pBG1	This study
pBG8	<i>BamHIIb-BamHIc</i> deletion in pBG1	This study
pBG4	<i>BamHIIa-BamHIc</i> deletion in pBG1	This study
pBG7	0.45-kb <i>PstI</i> deletion in <i>fhaB</i> in pBG4	This study
pBG12	<i>SalIIa-BamHIc</i> deletion in pBG4	This study
pBG15	1.9-kb <i>PvuI</i> deletion in pBG4	This study
pRIT13202	10-kb <i>EcoRI fhaB</i> fragment in pUC18	4
pRIT13197	<i>EcoRI-BglII fhaB</i> fragment in pUC8	4
pUC18	ColE1, ampicillin resistance	34
pUC18-3	1.25-kb <i>SphI-SalI fhaB</i> fragment in pUC18	This study
pUC18-4	0.45-kb <i>PstI</i> deletion in pUC18-3	This study
pUC18-5	<i>SalIIa-BamHIIa fhaB</i> fragment in pUC18-4	This study
pGR5	5' end of <i>bvgA5</i> and 3' end of <i>fhaB</i> in pSS1129	14
pUC18EH	2.2-kb <i>EcoRI-HindIII</i> fragment of pGR5 in pUC18	This study

region is involved in the biogenesis of FHA, because deletions or frameshift mutations result in either no or highly reduced levels of FHA. However, further deletions toward the N terminus show that smaller peptides can be secreted at very high levels in an *fhaC*-dependent manner.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *B. pertussis* and *Bordetella parapertussis* strains were grown on Bordet-Gengou agar (3) supplemented with 1% glycerol and 20% defibrinated sheep blood or in modified Stainer and Scholeto medium containing 1 g of 2,6-*O*-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (8) per liter and the relevant antibiotics at the following concentrations: streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; gentamicin, 10  $\mu$ g/ml; and kanamycin, 10  $\mu$ g/ml. *Escherichia coli* strains were grown in LB broth (24), and antibiotic-resistant *E. coli* was selected with 100  $\mu$ g of ampicillin, 25  $\mu$ g of gentamicin, or 25  $\mu$ g of kanamycin per ml.

**Recombinant DNA techniques.** Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and other DNA-modifying enzymes were purchased from Boehringer Mannheim and used as recommended by the supplier. Plasmid DNA was isolated by using either the rapid alkaline lysis method as described by Sambrook et al. (24) or disposable Qiagen columns (Coger) under the conditions recommended by the supplier. DNA fragments were eluted from agarose gel with a GeneClean kit (Bio 101). All other DNA manipulations were performed as described by Sambrook et al. (24).

**Constructions of plasmids containing various truncated *fhaB*-derived genes.** To complement the *fhaB* deletion in *B. pertussis* BPGR4, we chose the kanamycin- and chloramphenicol-resistant plasmid pBBR122, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1 isolated from *Bordetella bronchiseptica* by Antoine and Loch (1a). To create pBG1, the 10-kb *EcoRI* fragment containing the nearly entire *fhaB* gene, including its promoter and regulatory sites, was isolated from pRIT13202 (4) and inserted into the unique *EcoRI* site of pBBR122, located in the kanamycin resistance gene. pBG4 resulted from the digestion of pBG1 with *BamHI* and religation, thereby eliminating the two *BamHI* fragments of 2.37 and 4.7 kb. To generate pBG8, the 4.7-kb *BamHI* fragment isolated from pRIT13202 was inserted into the *BamHI* site of pBG4. pBG13 resulted from the exchange of the 2.5-kb *SphI-BamHI* fragment of pBG4 for the 6-kb *SphI-BglII* fragment of pRIT13202. To construct pBG7, the 1.27-kb *SphI-SalI* fragment isolated from pRIT13197 (4) was first subcloned into pUC18, previously digested with *SphI* and *SalI*, and the resulting plasmid, pUC18-3, was then digested with *PstI* and ligated to generate pUC18-4, missing the 471-bp *PstI* fragment. The 1.26-kb *BamHI-SalI* fragment isolated from pRIT13197 was then inserted into pUC18-4, previously digested with *BamHI* and *SalI*, to create pUC18-5, and the 2.1-kb *SphI-BamHI* fragment from pUC18-5 was finally introduced into pBG4, previ-

ously digested with *SphI* and *BamHI*. Consequently, pBG7 is similar to pBG4 except for the in-frame deletion of the 471-bp *PstI* fragment coding for the FHA region homologous to the N-terminal regions of ShIA and HpmA of *S. marcescens* and *P. mirabilis*, respectively. To create pBG12, the 2.5-kb *SphI-BamHI* fragment from pBG4 was exchanged for the 1.27-kb *SphI-BamHI* fragment isolated from pUC18-3. pBG15 was obtained after digestion of pBG4 with *PvuI* and ligation of the 3.65-kb *PvuI* fragment with the 2.76-kb *PvuI* fragment. To construct pUC18EH, the 2.17-kb *EcoRI-HindIII* fragment of pGR5 (14) was inserted into pUC18 digested with *EcoRI* and *HindIII*.

**Electroporation of *B. pertussis* and *B. parapertussis*.** The various pBBR122 derivatives described above were introduced into different *Bordetella* strains by electroporation as described elsewhere (1). Kanamycin-resistant *Bordetella* colonies were analyzed for the presence of the recombinant plasmids by the rapid electroproduction method described by Baulard et al. (2) or directly by immunostaining for the presence of FHA derivatives.

**Identification of FHA-related polypeptides.** To detect FHA-related polypeptides, culture supernatant or cell-associated protein fractions of the different *Bordetella* cultures were analyzed by electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gel as described by Laemmli (11) and Coomassie brilliant blue staining or by immunoblotting as described by Towbin et al. (26), using rat polyclonal antibodies directed against native FHA or truncated FHA (named Fha44) or using monoclonal antibody X3C (12), kindly provided by M. Brennan, or 12.2H5 (4), kindly provided by I. Heron. Immunoblot analyses were performed by using a Minifold II apparatus (Schleicher & Schuell) containing a nitrocellulose membrane and by serially diluting Fha44 or FHA twofold in phosphate-buffered saline (PBS), starting with a concentration of 125 or 500  $\mu$ g/ml, respectively. Each slot received 200  $\mu$ l. The antigen solutions were then aspirated, and the filters were washed several times with PBS containing 0.01% Tween 20 (PBS-Tween). The nitrocellulose membrane was then incubated with the anti-Fha44 antibodies for 2 h at room temperature, washed three times with PBS-Tween, incubated for 1 h with peroxidase-linked rabbit anti-rat antibodies (Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France), and finally developed with 4-chloro-1-naphthol (Bio-Rad) and hydrogen peroxide. Immunoblots and Coomassie blue-stained polyacrylamide gels were scanned with a Bio-Rad model GS-670 imaging densitometer, and the areas of the peaks were compared with each other on the same blot or gel to estimate the relative quantities or immunoreactivities of FHA and Fha44.

**Polyclonal antisera.** Rat polyclonal antibodies directed against purified FHA or Fha44 were obtained as described by Vaitukaitis et al. (28), using 50  $\mu$ g of FHA or Fha44. Three weeks after the primary immunization, two boosts with the same preparation were given intraperitoneally. The anti-FHA and anti-Fha44 sera were then enriched for specific antibodies after absorption of the nonspecific antibodies on a *B. pertussis* BPGR4 crude cell lysate.

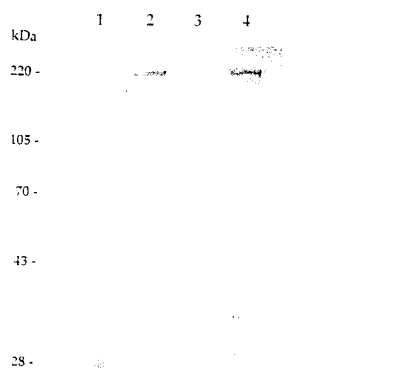


FIG. 1. SDS-PAGE analysis of *B. pertussis* BPSM, BPGR4, and BPGR4(pBG1) culture supernatants. One hundred-microliter aliquots of unconcentrated *B. pertussis* culture supernatants at stationary phase were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The supernatants were from strains BPSM (lane 2), BPGR4 (lane 3), and BPGR4 containing pBG1 (lane 4). Lane 1, size markers (sizes are given at the left).

**Hemagglutination assay.** Fifty-microliter aliquots of twofold serial dilutions of FHA or Fha44, ranging from 50 to 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS, were each added to 50  $\mu\text{l}$  of a 5% suspension of fresh rabbit erythrocytes in 96-well plastic plates. After 2 h of incubation at room temperature, the plates were read for hemagglutination activity.

**Purification of Fha44 by heparin-Sepharose.** FHA and the truncated FHA analog Fha44 were purified on heparin-Sepharose from strains BPSM and BPGR4(pBG4), respectively, as described for mature FHA by Menozzi et al. (16).

## RESULTS

**FHA complementation of *B. pertussis* BPGR4 with a pBBR1 derivative carrying the nearly complete *fhaB* gene.** *B. pertussis* BPGR4 is a strain from which a 10-kb *EcoRI* fragment, containing the nearly entire *fhaB* gene, including its promoter and regulatory sites, was deleted (14). To analyze the role of the C-terminal domain of FhaB in FHA biogenesis, we developed a complementation system for this strain, using a derivative of pBBR1, a broad-host-range plasmid previously isolated from *B. bronchiseptica*. This derivative, named pBBR122, contains chloramphenicol and kanamycin resistance markers as described previously (1a). The 10-kb *EcoRI* fragment containing the complete *fhaB* sequence except for the last 990 bp of the open reading frame was cloned into the unique *EcoRI* site of pBBR122. The resulting plasmid, pBG1, was then introduced into *B. pertussis* BPGR4. Analysis of culture supernatants by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Coomassie blue staining revealed that BPGR4(pBG1) secreted FHA at a level similar to that of the wild-type strain BPSM, a streptomycin- and nalidixic acid-resistant Tohama I derivative (Fig. 1), whereas no FHA was found in untransformed BPGR4. Western blot (immunoblot) analysis using several anti-FHA monoclonal antibodies confirmed that the protein secreted by BPGR4(pBG1) was FHA (data not shown). This finding demonstrates that pBG1 can efficiently complement the *fhaB* mutation of BPGR4 *in trans* and that the last 330 amino acids of FhaB are not essential for the efficient production and secretion of FHA.

**Role of the C-terminal domain of FhaB in the biogenesis of FHA and truncated analogs.** To analyze the role of the C-terminal region of FhaB in the biogenesis of FHA and truncated analogs, different deletions of the 3' end of *fhaB* were constructed in the 10-kb *fhaB EcoRI* fragment of pBG1 as described in Materials and Methods. The resulting recombi-

nant plasmids, pBG13, pBG8, pBG4, pBG12, and pBG15, containing the various deletions as depicted in Fig. 2 were then introduced into BPGR4, and both the cells and the culture supernatants from each recombinant strain were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining as well as by Western blotting with rat polyclonal antibodies directed against FHA.

As shown in Fig. 3, BPGR4(pBG13), containing a *BglII*-to-*BamHI*c deletion in *fhaB*, produced a truncated secreted protein with a size slightly smaller than that of FHA and reactive with anti-FHA polyclonal antibodies. Compared with BPGR4(pBG1) and the wild-type strain BPSM, BPGR4(pBG13) yielded significantly less truncated FHA in the culture supernatant (Fig. 3, lanes 2), indicating that efficient extracellular production of mature FHA requires the C-terminal domain of FhaB. On the other hand, the truncated FHA derivative is well produced in a cell-associated form (Fig. 2).

Similar to BPGR4(pBG13), BPGR4(pBG8), containing a *BamHII*b-to-*BamHI*c deletion in *fhaB*, also produced less FHA derivative than BPSM or BPGR4(pBG1). In contrast, BPGR4(pBG4), containing the *BamHII*a-to-*BamHI*c deletion in *fhaB*, produced very efficiently a secreted truncated FHA derivative (Fig. 3A). This truncated FHA polypeptide was named Fha44. The amounts of Fha44 found in the culture supernatants of BPGR4(pBG4) were significantly greater than those of FHA found in BPSM or BPGR4(pBG1) culture supernatants. Densitometric scanning of the Coomassie blue-stained gel indicated that on a molar basis, approximately sevenfold more Fha44 than FHA was secreted. This finding indicates that the first 947 amino acids of FHA do not require the C-terminal portion of FhaB for extracellular production. The culture supernatant of BPGR4(pBG4) also contained a second, smaller polypeptide that is most likely a degradation product of Fha44. Degradation products were also found in the case of the other constructs but were present at lower levels than the approximately 50% seen with Fha44.

To confirm that the greater extracellular production of Fha44 than of natural FHA was not due to a copy number effect of the pBBR122 derivatives, the truncated *fhaB* gene from pBG4 was subcloned into a pUC18 derivative, yielding pUC18EH, and introduced into the chromosome of BPGR4. This yielded *B. pertussis* BPNJ4, with a single truncated *fhaB* gene in the *fha* locus. SDS-PAGE analysis indicated that the production of the truncated FHA derivative in this strain was also significantly greater than the FHA production in BPSM.

As shown in Fig. 3B, Fha44 reacts very poorly with the polyclonal anti-FHA antiserum, whereas it reacts strongly with the anti-FHA monoclonal antibody X3C (data not shown), thereby confirming its identity as an FHA-related polypeptide. Densitometric scanning of the Western blot indicated that the polyclonal antibodies recognized Fha44 approximately 100-fold less well than FHA, as determined by a molar comparison (Fig. 4).

BPGR4(pBG12), containing the *SalI*-to-*BamHI*c deletion in *fhaB*, also produced relatively high levels of truncated extracellular FHA (Fig. 2). It was also readily detected by monoclonal antibody X3C. Finally, no FHA-related polypeptide could be detected in the culture supernatant of BPGR4(pBG15), containing the *PvuII*a-to-*PvuII*e deletion in *fhaB*.

Together, these results indicate that the C-terminal domain of FhaB is required for efficient full-length FHA biogenesis, whereas it is not required for the extracellular production of truncated FHA derivatives, encompassing the N-terminal half of the mature protein. This finding implies that the N-terminal region of FHA contains all of the information necessary for its secretion.

**Fha44 biogenesis requires expression of *fhaC*.** The N-termi-

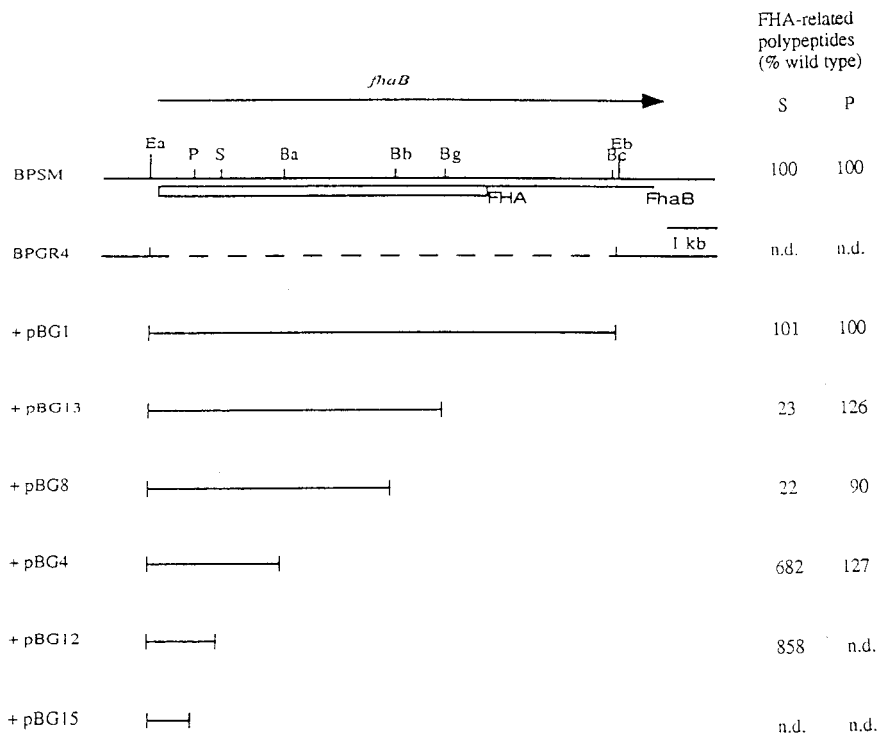


FIG. 2. Partial restriction map of *fhaB* and localization of the various deletions. The arrow indicates the length and direction of the *fhaB* gene. Strain BPSM contains the full-length *fhaB* gene in the chromosome. The open box (FHA) designates the coding region of the mature FHA protein, and the line (FhaB) designates the coding region of the FhaB precursor protein. The following restriction sites are indicated: Ba, Bb, and Bc, the first, second, and third *Bam*HI sites; Bg, *Bgl*II; Ea and Eb, the first and second *Eco*RI sites; P, the first *Pst*I site; S, the first *Sal*I site. Strain BPGR4 contains the Ea/Eb deletion, as indicated by the broken line. Plasmids pBG1, pBG13, pBG8, pBG4, pBG12, and pBG16 are pBBR122 derivatives containing the portions of the *fhaB* gene indicated by the horizontal lines. The production of secreted (S) or cell-associated (P) FHA analogs is given at the right as percent FHA polypeptides produced by the different strains compared with that produced by the wild-type strain BPSM (100% reference) on a molar basis. The material in the culture supernatant was quantified by densitometric scanning of Coomassie blue-stained gels. The cell-associated material was quantified by densitometric scanning of Western blots, using polyclonal anti-FHA or anti-Fha44 antibodies, in comparison with the scanning of Western blots containing secreted FHA polypeptides and probed with the same antibodies. n.d., not detectable.

nal domain of FHA contains sequence similarities with the N-terminal regions of the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins Sh1A and HpmA, respectively (4). Previous work has suggested that, like in the hemolysins, this region is involved in FHA biogenesis (32). The results described above indicate that the N-terminal domain of FHA that includes this homologous sequence is sufficient for efficient secretion of truncated FHA derivatives. Since FHA secretion depends on expression of *fhaC*, it was of interest to investigate whether the secretion of Fha44 also requires the expression of *fhaC*.

pBG4 was therefore introduced into *B. pertussis* BPMC, a strain lacking both the *fhaB* gene and the expression signals of *fhaC*. Consequently, this strain does not express *fhaB* or *fhaC* (14). As shown in Fig. 5, no Fha44 was detected in the BPMC(pBG4) culture supernatant after SDS-PAGE and Coomassie blue staining, indicating that secretion of Fha44 requires the expression of *fhaC*. This finding is consistent with the notion that the *fhaC* gene product interacts, directly or indirectly, with the N-terminal region of FHA and that this interaction is required for secretion of FHA into the culture supernatant, similar to what has been proposed to be the mechanism of Sh1A secretion in *S. marcescens*.

To further investigate whether the presence of the N-terminal box homologous to the N-terminal part of Sh1A is essential for the secretion of truncated FHA, we constructed pBG7, which corresponds to pBG4, containing an in-frame deletion of the 471-bp *Pst*I fragment encoding the homologous region. This plasmid was then introduced into BPGR4, and the result-

ing strain was found to not produce any detectable extracellular FHA-related polypeptides, as analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining of culture supernatants (Fig. 5). This result was very similar to those obtained earlier with the full-length mutant FHA in *B. pertussis* BPGR7 (32) and confirms the importance of the hemolysin-homologous sequences in FhaC-mediated FHA secretion.

**Fha44 export in other *Bordetella* strains.** To assess whether Fha44 can be produced and secreted by other *Bordetella* species, pBG4 was transferred into *B. parapertussis*. The culture supernatant of *B. parapertussis*(pBG4) was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 6, lane 4); the results indicated that *B. parapertussis* is able to efficiently secrete Fha44, suggesting that *B. parapertussis* expresses an accessory gene similar to *fhaC*. However, similar to what is observed for full-length FHA, *B. parapertussis*(pBG4) produces somewhat less secreted Fha44 than *B. pertussis* BPSM(pBG4). Also, in contrast to *B. pertussis*(pBG4), Fha44 in the culture supernatants of *B. parapertussis*(pBG4) appeared to be much more stable, since the lower- $M_r$  form was not detected in fresh culture supernatants.

When pBG4 was introduced into *B. pertussis* BPSM, both FHA and Fha44 were well secreted into the culture medium (Fig. 6, lane 5), demonstrating that the production and secretion of Fha44 do not affect the production and secretion of the natural FHA and reciprocally, and that therefore the export machinery in BPSM is not saturated by the natural *fhaB* gene expression.

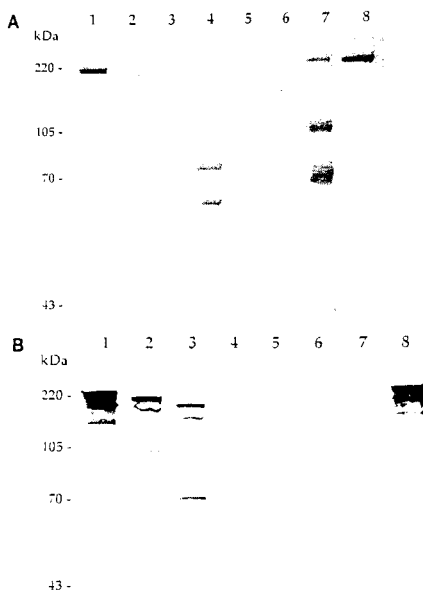


FIG. 3. SDS-PAGE and immunoblot analyses of *B. pertussis* strains containing various deletions in the 3' end of *fhaB*. One hundred-microliter aliquots of culture supernatants of the different *B. pertussis* strains were analyzed. Lanes 1 through 7 contain the supernatants of BPGR4 harboring pBG1 (lanes 1), pBG15 (lanes 2), pBG8 (lanes 3), pBG4 (lanes 4), pBG12 (lanes 5), and pBG15 (lanes 6). Lanes 8 contain culture supernatants from strain BPSM, and lanes 7 contain size markers, the sizes of which are given at the left. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie blue (A) or transferred to nitrocellulose and developed with anti-FHA polyclonal antibodies (B).

**Functional roles of the N-terminal domain of FHA encoded by pBG4.** Mature FHA from wild-type *B. pertussis* harbors at least three binding sites responsible for the bacterial attachment to different cell types (13). Two of these sites, an RGD sequence responsible for binding to CR3 integrins on macro-

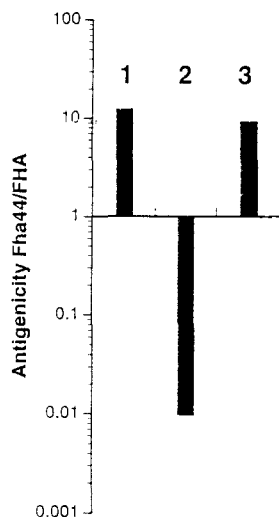


FIG. 4. Relative immunoreactivities of FHA and Fha44 with various antibodies. Densitometric scanning was applied on immunoblot blots containing FHA and Fha44 incubated with monoclonal antibody 12.2H5 (column 1), anti-FHA polyclonal antibodies (column 2), or anti-Fha44 polyclonal antibodies (column 3). After scanning, the areas (intensity and width of the peaks) corresponding to the immunoreactivity of Fha44 were compared with those corresponding to the immunoreactivity of FHA on a molar basis, and the results are expressed as immunoreactive ratios of Fha44 to FHA.

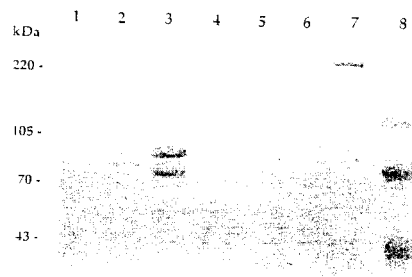


FIG. 5. SDS-PAGE analysis of several *B. pertussis* culture supernatants. One hundred-microliter aliquots of culture supernatants from BPGR7 (lane 1), BP-  
MC(pBG4) (lane 2), BPGR4(pBG4) (lane 3), BPMC (lane 4), BPGR4(pBG7) (lane 5), BPGR4 (lane 6), and BPSM (lane 7) were analyzed by SDS-PAGE. The size markers are shown in lane 8. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie blue. The sizes of the markers are given at the left.

phages and a carbohydrate-binding site responsible for binding to epithelial cilia, have previously been mapped outside the Fha44 domain (21, 23). The heparin-binding site has not been precisely mapped but was suggested to be close to the N-terminal region of FHA (7, 17).

To characterize the heparin-binding property of Fha44 and to compare it with that of mature FHA produced by BPSM, the Fha44 molecule was purified on heparin-Sepharose. As described for the purification of FHA by Menozzi et al. (16), a culture supernatant from BPGR4(pBG4) was directly applied onto the heparin-Sepharose matrix. Fha44 was completely retained on the column and was eluted from the matrix by 300 mM NaCl, similar to what has been observed previously for full-length FHA. This result demonstrates that the N-terminal portion of FHA contains the heparin-binding site present in native FHA.

The hemagglutination property of purified Fha44 was also examined and compared with that of purified full-length FHA. The results demonstrate that the N-terminal portion of FHA retains the ability to hemagglutinate sheep erythrocytes. However, at the same concentration, the hemagglutination activity obtained with purified Fha44 was weaker than obtained with native FHA, suggesting that other regions in native FHA are also involved in this activity or that the folding of Fha44 is sufficiently different from that of native FHA to interfere somewhat with hemagglutination.

**Antigenicity and immunogenicity of Fha44.** Mature FHA

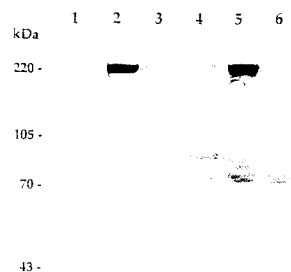


FIG. 6. Immunoblot analysis of *Bordetella* culture supernatants. Culture supernatants from *B. pertussis* BPSM (lane 2), BPGR4 (lane 3), BPSM(pBG4) (lane 5), and BPGR4(pBG4) (lane 6) and from *B. parapertussis*(pBG4) were analyzed by immunoblotting using polyclonal anti-FHA antibodies. The numbers at the left indicate the sizes of the markers.

contains an immunodominant region localized at the C terminus of the mature protein. As shown above, anti-FHA antibodies recognize Fha44 very weakly, in agreement with previous results (4). Quantification of the immunoblots indicated that the reactivity of anti-FHA antibodies was approximately 100-fold weaker against Fha44 than against FHA (Fig. 4). Hyperimmunized animals, however, are able to produce antibodies that also recognize the N-terminal region (12), indicating that it is not devoid of epitopes. Nevertheless, this finding suggests either that the N-terminal region of FHA is not very immunogenic or that the immunodominant part of the molecule somehow masks the N-terminal domain.

To distinguish between these two possibilities, rats were immunized with heparin-purified Fha44, and the rat anti-Fha44 antibodies were analyzed for their recognition of Fha44 and native FHA by quantitative slot blot analysis. As shown in Fig. 4, immunization with Fha44 induces antibodies that recognize mainly Fha44 and, more poorly (approximately 10-fold less), native FHA. This finding indicates that the isolated N-terminal portion of FHA is also immunogenic and suggests that this region is masked by the C-terminal immunodominant part in full-length FHA.

Differential reactivity of monoclonal antibody 12.2H5 further defines one of the N-terminal regions of FHA that are masked by the C-terminal domain. Epitope mapping using recombinant FHA fragments fused to the *E. coli* maltose-binding protein have indicated that the 12.2H5 epitope is located in the domain that contains sequence similarities with the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins (11a). This antibody was found to react more strongly with the Fha44 polypeptide than with full-length FHA (Fig. 4), consistent with the notion that its epitope is located in the N-terminal domain but that it is somewhat masked by the C-terminal domain.

## DISCUSSION

FHA is the major secreted protein produced by *B. pertussis*. The mature form has a molecular mass of 220 kDa and is a filamentous molecule approximately 2 nm wide and 50 nm long (for a recent review, see reference 13) folded into a monomeric hairpin (15). Despite its size, it is extremely efficiently secreted into the extracellular milieu. FHA secretion requires at least one accessory protein, encoded by *fhaC*, a gene located 3' of the structural *fhaB* gene within a polycistronic operon that also contains accessory genes necessary for the biogenesis of *B. pertussis* fimbriae (32). The N-terminal region of FHA contains approximately 100 amino acid residues homologous to the *S. marcescens* and *P. mirabilis* calcium-independent hemolysins (4). As with these hemolysins, this domain is thought to play an important role in the secretion of FHA, because an in-frame deletion of this region completely abolishes FHA biogenesis (32). The current model implies interaction of this N-terminal domain of FHA with FhaC, located in the outer membrane. We have recently been able to secrete FHA peptides from *E. coli* strains that also express *fhaC* in *trans* (9), suggesting that no additional *B. pertussis*-specific factor is required for FHA export through the outer membrane and that the FHA-FhaC interaction may be direct.

In this study, we found that the C-terminal domain of the FHA precursor FhaB is important for efficient secretion of full-length FHA but not for the secretion of truncated FHA derivatives of smaller size (80 kDa and less). According to the three-dimensional model recently proposed by Makhov et al. (15) on the basis of ultrastructural analysis of purified FHA, these smaller FHA analogs make up only part of one side of the FHA hairpin rod. The secretion of these smaller polypep-

tides still depends on FhaC and on the N-terminal region of FHA that is homologous to the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins.

Several other virulence factors produced by gram-negative pathogens have also been shown to undergo significant C-terminal truncations of their precursors during biogenesis. However, in these cases, the C-terminal domain of the precursor plays an active role in targeting the protein for secretion, as exemplified by the immunoglobulin A protease of *Neisseria gonorrhoeae* (19). This domain inserts into the outer membrane and probably serves as an essential channel for the translocation of the protein through the membrane. Because of the very high secretion efficiency of Fha44 and because of the diminished but still detectable secretion of longer FHA analogs, the C-terminal domain of FhaB must play a different role in FHA biogenesis.

Polyclonal anti-FHA antibodies were found to poorly recognize Fha44, a C-terminally truncated FHA polypeptide, and conversely, polyclonal anti-Fha44 antibodies poorly recognize full-length mature FHA. These immunogenicity and antigenicity studies of full-length and truncated FHA molecules suggest that the N-terminal domain of mature FHA is largely masked by its C-terminal domain. Antigenicity studies with monoclonal antibody 12.2H5 further indicated that at least the part containing the domain with sequence similarities to the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins is masked in the mature protein. This observation is consistent with the rigid hairpin rod model proposed by Makhov et al. (15). The masking of the N-terminal region by the C-terminal domain might render the former domain unavailable for productive interaction of mature FHA with another protein such as FhaC. Obviously, in the case of Fha44, the N-terminal region of FHA is not masked by the C-terminal domain and consequently would be free to interact with FhaC during the export process. Therefore, it is conceivable that the role of the C-terminal domain of FhaB is to prevent the premature formation of the rigid hairpin. This role as an intramolecular chaperone could be achieved by protein-protein interactions between the C-terminal domain of FhaB and that of FHA within the same molecule, as proposed in the working model depicted in Fig. 7. This would keep the N-terminal domain of FHA free to interact with FhaC during biogenesis. Once the FHA part of FhaB reaches the outside of the bacterial cell, the C-terminal domain of FhaB is removed and the hairpin of the mature molecule can be formed spontaneously. Such an intramolecular chaperone activity of the C-terminal domain of the precursor on the C-terminal domain of the mature part of the protein would explain the requirement of the C-terminal domain of FhaB for efficient secretion of full-length FHA and larger truncated forms but not for that of smaller truncated forms, as found in this study. Of course, it may also be possible that the polypeptides encoded by pBG13 and pBG8 are more susceptible to degradation than FHA or Fha44. Although this possibility cannot be ruled out at this point, it should be noted that the amounts of cell-associated FHA-related polypeptides were roughly similar in BPGR4 strains containing either pBG1, pBG13, or pBG8 (Fig. 2), and there was no evidence of more degradation in BPGR4(pBG13) or BPGR4(pBG8) than in BPGR4(pBG1).

Chaperones are commonly involved in protein transport across membranes. In the general secretion pathway through the bacterial cytoplasmic membrane, the SecB molecular chaperone is required to retard folding of secreted proteins (22). The formation of Sec-dependent type 1 or Pap pili requires additional, periplasmic chaperones that prevent premature periplasmic aggregation of pilin subunits prior to their incorporation into pilus structures (10). Sec-independent secretion

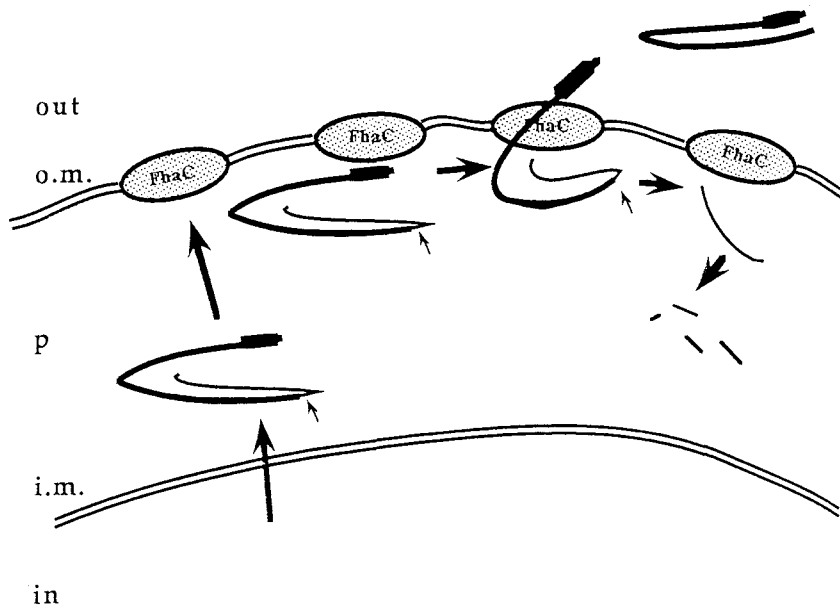


FIG. 7. Model for a potential role of the C-terminal domain of FhaB. The bacterial cell envelope is represented by the inner membrane (i.m.), periplasm (p), and the outer membrane (o.m.). FhaC is shown embedded in the outer membrane as a stippled oval. in and out designate the inside and outside of the cell, respectively. The proposed trafficking of FHA during its biogenesis is indicated by the large arrows. FHA and FhaB are represented by the black line containing a black box at one end. The FHA portion of FhaB is indicated by the thickened line. This box represents the N-terminal sequence homologous to the *S. marcescens* and *P. mirabilis* hemolysins. The small arrows indicate the cleavage site of FhaB to generate FHA. After its translocation through the inner membrane, the C-terminal domain of FhaB covers the C-terminal half of the mature portion of the protein, thereby leaving the N-terminal domain free to interact with FhaC. Upon interaction with FhaC, the N-terminal domain crosses the outer membrane first, followed by the C-terminal domain of the mature portion. Finally, the C-terminal domain of the precursor is cleaved off, allowing mature FHA to fold into its hairpin structure at the outside of the cell. The C-terminal domain of FhaB stays in the cell and is eventually degraded.

of the *Yersinia* Yop proteins also requires chaperones, called Syc proteins, to prevent premature folding of the Yop proteins (29). In all of these cases, however, and in contrast to the proposed FHA model, the chaperones are distinct molecules and not translationally fused to their protein substrates. Interestingly, the Yop chaperones contain leucine-rich motifs resembling leucine zippers. Leucine-rich repeats are also found in mature FHA (15) and can be extended into the C-terminal domain of FhaB (12a). The leucine-rich repeats of mature FHA have been proposed to play a role in the formation of the hairpin structure (15). It is therefore not unreasonable to speculate that the chaperone mechanism needed to prevent premature hairpin formation similarly involves the leucine-rich repeats. We are currently testing the intramolecular chaperone model for the C-terminal domain of FhaB through protein-protein interaction studies and genetic complementation.

Whatever the role played by the C-terminal domain of FhaB, it apparently does not require the last 330 amino acid residues. This extreme C-terminal domain of FhaB contains proline-rich sequences and the  $(PK)_5$  peptide. This sequence has previously been proposed to anchor FHA within the cell envelope, perhaps by spanning the periplasmic space and linking the inner and outer membranes (5). Obviously, the contributions of these structures to the biogenesis of FHA are at most only minor.

Not all of the activities of the N-terminal domain of FHA appeared to be masked by its C-terminal domain. Fha44 was found to bind to heparin-Sepharose in a similar fashion as full-length FHA. Both can be eluted by approximately 300 mM NaCl, suggesting that their affinities for heparin are very similar. This finding indicates that in full-length FHA, the N-terminal heparin-binding site is not masked by the C-terminal domain of the protein. It also confirms our previous studies (7), suggesting that the heparin-binding domain of FHA is

located in the N-terminal half of the molecule. The hemagglutination activity of FHA was previously suggested to involve its heparin-binding site (16). This notion was confirmed in this study by the finding that Fha44 is able to hemagglutinate rabbit erythrocytes. Thus, both the heparin-binding and the hemagglutination activities involving the N-terminal domain of FHA are not inhibited by the hairpin folding of the complete protein.

Because the genetic constructs described in this report do not insert an in-frame stop codon at the precise site of gene truncation, 43 amino acid residues were added to the FHA-related peptides. This addition does apparently not dramatically affect the secretion of the FHA polypeptide, which suggests that the FHA secretion mechanism can be used to carry foreign proteins or peptides along with FHA. The binding activity of Fha44 to heparin provides a convenient purification method for such recombinant fusion proteins. Work is in progress to evaluate the potential of the FHA secretion mechanism for the export of foreign proteins either in *B. pertussis* or in other gram-negative organisms.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Brennan and I. Heron for monoclonal antibodies, R. Antoine for help in densitometric scanning, E. Fort for photography, and F. Jacob-Dubuisson for critically reading the manuscript.

The work was supported by a European Community Biotechnology grant, by INSERM, Institut Pasteur de Lille, and by the Région-Nord-Pas de Calais. G.R.-M. held a fellowship from the Fondation Marcel Mérieux, and N.M. holds a fellowship from the Région-Nord-Pas de Calais.

#### REFERENCES

1. Antoine, R., et al. Unpublished data.
- 1a. Antoine, R., and C. Loch. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host range plasmid of *Bordetella bronchiseptica* with sequence

- similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* **6**:1785-1799.
2. Baulard, A., P. Bertin, V. Dartois, and C. Locht. 1994. Reincarnation of plasmids from dead bacteria by electroduction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **4**:177-179.
  3. Bordet, J., and O. Gengou. 1906. Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **20**:731-741.
  4. Delisse-Gathoye, A.-M., C. Locht, F. Jacob, M. Raaschou-Nielsen, I. Heron, J.-L. Ruelle, M. de Wilde, and T. Cabezon. 1990. Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **58**:2895-2905.
  5. Domenighini, M., D. Reiman, C. Capiati, S. Falkow, A. Prugnola, V. Scarlato, and R. Rappuoli. 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* **4**:787-800.
  6. Glaser, P., H. Sakamoto, J. Bellalou, A. Ullmann, and A. Danchin. 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* **7**:3997-4004.
  7. Hannah, J. H., F. D. Menozzi, G. Renauld, C. Locht, and M. J. Brennan. 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesive filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* **62**:5010-5019.
  8. Imaizumi, A., Y. Suzuki, S. Ono, H. Sato, and Y. Sato. 1983. Heptakis(2,6-O-dimethyl) $\beta$ -cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase 1. *J. Clin. Microbiol.* **17**:781-786.
  9. Jacob-Dubuisson, F., C. Buisine, N. Mielcarek, E. Clément, F. D. Menozzi, and C. Locht. Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.*, in press.
  10. Jacob-Dubuisson, F., M. Kuehn, and S. J. Hultgren. 1993. A novel secretion apparatus for the assembly of adhesive bacterial pili. *Trends Microbiol.* **1**:50-55.
  11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
  - 11a. Leininger, E., et al. Unpublished data.
  12. Leininger, E., P. L. Probst, M. J. Brennan, and J. G. Kenimer. 1993. Inhibition of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin-mediated cell adherence with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**:31-38.
  - 12a. Locht, C. Unpublished data.
  13. Locht, C., P. Bertin, F. D. Menozzi, and G. Renauld. 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.* **9**:653-660.
  14. Locht, C., M.-C. Geoffroy, and G. Renauld. 1992. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J.* **11**:3175-3183.
  15. Makhov, A. M., J. H. Hannah, M. J. Brennan, B. L. Trus, E. Kocsis, J. F. Conway, P. T. Wingfield, M. N. Simon, and A. C. Steven. 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J. Mol. Biol.* **241**:110-124.
  16. Menozzi, F. D., C. Gantiez, and C. Locht. 1991. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**:59-64.
  17. Menozzi, F. D., R. Mutombo, G. Renauld, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Locht. 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**:769-778.
  18. Nordmann, P., B. François, F. D. Menozzi, M. C. Commare, and A. Barois. 1992. Whooping cough associated with *Bordetella parapertussis* in an HIV-infected child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**:248.
  19. Pohlner, J., R. Hatler, K. Beyreuther, and T. F. Meyer. 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature (London)* **325**:458-460.
  20. Poole, K., E. Schiebel, and V. Braun. 1988. Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **170**:3177-3188.
  21. Prasad, S. M., Y. Yin, E. Rodzinski, E. I. Tuomanen, and H. R. Masure. 1993. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **61**:2780-2785.
  22. Pugsley, A. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.
  23. Reiman, D., E. Tuomanen, S. Falkow, D. T. Golenbock, K. Saukkonen, and S. D. Wright. 1990. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 (a $\beta$ 2,CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**:1375-1382.
  24. 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.
  25. Schiebel, E., H. Schwarz, and V. Braun. 1989. Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* **264**:16311-16320.
  26. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
  27. Uphoff, T. S., and R. A. Welch. 1990. Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shlA* and *shlB*). *J. Bacteriol.* **172**:1206-1216.
  28. Vaitukaitis, J., J. B. Robbins, E. Nieschlag, and T. G. Ross. 1971. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.* **33**:988-991.
  29. Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslée, T. Michiels, and G. R. Cornelis. 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10493-10497.
  30. Weiss, A. A., F. D. Johnson, and D. L. Burns. 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2970-2974.
  31. Welch, R. A. 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:521-528.
  32. Willems, R. J. L., C. Geuijen, H. G. J. van der Heide, G. Renauld, P. Bertin, W. M. R. van den Akker, C. Locht, and F. R. Mooi. 1994. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol.* **11**:337-347.
  33. Willems, R. J. L., H. G. J. van der Heide, and F. R. Mooi. 1992. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol. Microbiol.* **6**:2661-2671.
  34. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

Dans l'article précédent, nous avons pu montrer que, bien que le domaine C-terminal du précurseur soit clivé au cours de la maturation de la FHA, il joue un rôle important dans la sécrétion de l'adhésine. Cependant, cette région ne semble pas nécessaire à la sécrétion d'une protéine tronquée (Fha44) d'environ 80 kDa. Cette Fha44, correspondant à la partie N-terminale de la FHA, possède un domaine de 115 acides aminés homologue aux hémolysines ShIA et HpmA de *Serratia marcescens* et de *Proteus mirabilis* dont l'activité est indépendante de la présence de calcium. De plus, la sécrétion de la Fha44 dépend d'une protéine accessoire, nommée FhaC, qui est homologue aux protéines de membrane externe ShIB et HpmB impliqués dans la sécrétion respective de ShIA et HpmA. Un mécanisme de sécrétion impliquant une interaction entre les régions N-terminales de la FHA, de la ShIA et de la HpmA, avec leur protéine accessoire respective a été proposé. Cependant, la comparaison de la séquence en acides aminés de la partie N-terminale de la FHA avec celle de ShIA et HpmA, fait apparaître quelques différences laissant présager un mécanisme de sécrétion particulier à la FHA.

Dans la publication suivante, intitulée "Amino-terminal maturation of the *Bordetella filamentous* haemagglutinin" et réalisée en collaboration avec F. Jacob-Dubuisson et C. Buisine, un modèle de sécrétion de la FHA est proposé impliquant une modification de la région N-terminale du précurseur suivie par un clivage préalable au passage de la FHA à travers les deux membranes de *B. pertussis*.

La protéine Fha44 a servi de base à l'étude du rôle de la région N-terminale de la FHA dans sa sécrétion. Une analyse par SDS-PAGE de différents polypeptides dérivés de la FHA montre qu'ils présentent à chaque fois une taille inférieure de 8 à 9 kDa à celle attendue, déduite de la séquence nucléotidique. D'autre part, l'analyse de la fraction protéique associée aux cellules BPSM(pBG4), par immunoblot en utilisant un anticorps anti-Fha44 polyclonal, nous permet de visualiser les deux protéines majeures attendues, ainsi qu'une protéine de taille supérieure qui n'est pas présente dans le surnageant de culture. Ces observations semblent indiquer la présence d'un précurseur au niveau de la



fraction associée aux cellules, la forme sécrétée résultant d'un clivage d'un fragment de 8-9 kDa au niveau de ce précurseur.

Afin de déterminer si la maturation de la Fha44 a lieu côté N- ou C-terminal du précurseur, une courte séquence nucléotidique codant pour un peptide immunodominant de la Sm28GST, le peptide 190-211, est fusionnée à la région 3' terminale du gène *fha44*. Une souche de *B. pertussis*, contenant la construction décrite, sécrète une protéine hybride reconnue par un anticorps anti-Sm28GST indiquant qu'il n'y a pas de clivage côté C-terminal de la protéine mature.

Dans le but de faciliter l'étude de la maturation N-terminale de la Fha44, une souche d'*E. coli* contenant deux plasmides compatibles, l'un portant le gène *fhaC* et l'autre le gène *fha44*, a été construite. Une absence de sécrétion de la Fha44 est observée suggérant que la région N-terminale de FhaB n'agit pas comme un signal d'exportation efficace chez *E. coli*. Une fusion protéique entre les 84 premiers acides aminés de FhaB et la  $\beta$ -galactosidase montre une activité chez *E. coli*, laissant supposer une localisation cytoplasmique ou sur la face cytoplasmique de la membrane interne. Une fusion protéique entre la même région de FhaB et la phosphatase alcaline est inactive. Un phénotype opposé est mis en évidence chez *B. pertussis*. Ces résultats suggèrent que la région N-terminale de FhaB est incapable ou n'est pas suffisante à la translocation efficace de la protéine à travers la membrane cytoplasmique d'*E. coli*.

La faible efficacité de la région N-terminale de FhaB comme signal permettant l'exportation de la protéine, pourrait expliquer le faible taux de sécrétion de la Fha44 chez *E. coli*. Pour répondre à cette hypothèse, les premiers résidus N-terminaux de FhaB ont été remplacés par un peptide signal d'*E. coli* (OmpA). Les protéines hybrides OmpA/Fha44 sont alors produits chez *E. coli* exprimant FhaC, et la taille de la FHA44 exprimée par *E. coli* est identique à celle sécrétée par *B. pertussis*. La maturation N-terminale ne dépend donc pas d'un facteur spécifique de *B. pertussis*. D'autre part, la Fha44, de la même manière que la FHA, semble inaccessible au séquençage N-terminal, suggérant l'existence d'une modification covalente non encore caractérisée.

# Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin

Françoise Jacob-Dubuisson,<sup>1</sup> Corinne Buisine,<sup>1</sup>  
Nathalie Mielcarek,<sup>2</sup> Eve Clément,<sup>1</sup>  
Franco D. Menozzi<sup>1</sup> and Camille Locht<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM C9F9109, and <sup>2</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

## Summary

The 220 kDa filamentous haemagglutinin (FHA) is a major adhesin of *Bordetella pertussis* and is produced from a large precursor designated FhaB. Although partly surface associated, it is also very efficiently secreted into the extracellular milieu. Its secretion depends on the outer membrane accessory protein FhaC. An 80 kDa N-terminal derivative of FHA, named Fha44, can also be very efficiently secreted in a FhaC-dependent manner, indicating that all necessary secretion signals are localized in the N-terminal region of FhaB. A comparison of predicted and apparent sizes of FHA derivatives, in addition to immunoblot analyses of cell-associated and secreted FHA polypeptides, indicated that FhaB undergoes N-terminal maturation by the cleavage of an 8–9 kDa segment. However, phenotypic analyses of translational *lacZ* and *phoA* fusions showed that this segment does not function as a typical signal peptide. Co-expression of the Fha44-encoding gene with *fhaC* also did not allow for secretion of Fha44 in *Escherichia coli*. High levels of secretion could, however, be observed when the OmpA signal peptide was fused to the N-terminal end of Fha44. Regardless of the OmpA signal peptide-Fha44 fusion point, the *E. coli*-secreted Fha44 had the same  $M_r$  as that secreted by *B. pertussis*, indicating that the N-terminal proteolytic maturation does not require a *B. pertussis*-specific factor. Similar to FHA, the *B. pertussis*-secreted Fha44 contains an as yet uncharacterized modification at its N-terminus. This modification did not occur in *E. coli* and is therefore not required for secretion. The N-terminus of Fha44 secreted by *E. coli* was determined and found to correspond to the 72nd residue after the first in-frame methionine of FhaB. The N-terminal modification was

also found not to be required for haemagglutination or interaction with sulphated glycoconjugates.

## Introduction

All cells rely on specialised machineries to target their macromolecules to the appropriate compartments. The secretion of proteins requires the crossing of one or more biological membranes. Gram-negative bacteria must guide their secreted and outer-surface proteins across two membranes, the cytoplasmic membrane and the outer membrane. In these organisms, most secreted proteins transit through the General Secretory Pathway (GSP) and cross each membrane separately using two distinct machineries called the Sec apparatus and the terminal branch of the GSP, respectively (for an extensive review see Pugsley, 1993). Alternative, Sec-independent, pathways have also been described, as exemplified by the secretion of the *Escherichia coli* haemolysin A (Koronakis and Hughes, 1993) or that of the Yop proteins of *Yersinia* species (Forsberg *et al.*, 1994).

Pathogenic microorganisms are particularly valuable models with which to study protein secretion because they often secrete enzymes, toxins, adhesins, and invasins that are necessary for the expression of their virulence. Accordingly, *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, secretes several virulence factors including pertussis toxin, adenylate cyclase/haemolysin, filamentous haemagglutinin (FHA), and fimbriae (Weiss and Hewlett, 1986). Among them, the 220 kDa FHA, the main adhesin of *B. pertussis*, is the major secreted polypeptide product (Locht *et al.*, 1993).

The structural gene of FHA, *fhaB*, has a coding potential for a 367 kDa protein (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990; Domenighini *et al.*, 1990), referred to as FhaB. The mature form of the protein corresponds to the N-terminal region of the precursor and has been proposed to fold into a rigid hairpin (Makhov *et al.*, 1994). Although the C-terminal domain of FhaB is cleaved off during the maturation of FHA, it plays an important role in FHA secretion (Renauld *et al.*, 1996). However, it is not required for the secretion of truncated, up to 80 kDa, derivatives that correspond to the N-terminal region of FHA (Renauld *et al.*, 1996). These derivatives contain a 115-residue-long domain homologous to ShIA and HpmA, which are the  $Ca^{++}$ -independent haemolysins of *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*, respectively (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990), found to be essential

for the secretion of the corresponding proteins (Schönherr *et al.*, 1993, Willems *et al.*, 1994). In addition, the secretion of the three polypeptides depends on homologous outer membrane accessory proteins called FhaC, ShIB and HpmB in *B. pertussis*, *S. marcescens* and *P. mirabilis*, respectively (Willems *et al.*, 1994; Uphoff *et al.*, 1990; Poole *et al.*, 1988). It has been proposed that the secretion of FHA, ShIA and HpmA involves interactions between their N-terminal homologous region and the respective accessory proteins. This suggests similarities in their secretion mechanisms and the existence of a novel branch of the GSP. However, the N-terminus of FHA was found to be blocked (Domenighini *et al.*, 1990; Jacob *et al.*, 1988), whereas N-terminal sequence determination of ShIA indicated that the first residue of the mature protein immediately follows the predicted signal-peptide cleavage site (Poole *et al.*, 1988). Furthermore, the deduced amino acid sequence of FhaB predicts, at best, an atypical signal peptide containing an unusually long polar domain followed by a hydrophobic domain (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990). These observations suggest important differences between the secretion mechanism of FHA and those of ShIA and HpmA.

In this work, the N-terminal maturation of FhaB was investigated using an 80 kDa C-terminally truncated FHA polypeptide, named Fha44 (Renaud *et al.*, 1996). It was found that the first 71 residues are removed during FHA biogenesis, but that this region does not function as a typical signal peptide in *E. coli*. The addition of the OmpA signal peptide allowed high levels of FhaC-dependent Fha44 secretion in *E. coli*. As for Fha44 secreted by *B. pertussis*, the N-terminal maturation beyond this signal-peptide cleavage site was also found in *E. coli*. In contrast to that of *B. pertussis*, however, Fha44 secreted by *E. coli* had no N-terminal modification. This modification was apparently not required for FHA secretion, haemagglutination, or interaction with sulphated carbohydrates.

## Results

### The apparent $M_r$ of truncated N-terminal FHA polypeptides are smaller than expected

The initiation codon of FhaB has not been identified with certainty among three possible in-frame AUG codons, and FhaB does not possess a typical signal-peptide sequence. In addition, the N-terminus of the mature protein could not be determined by Edman degradation, suggesting that the first residue of FHA is modified (Domenighini *et al.*, 1990; Jacob *et al.*, 1988). To facilitate the study on the role of the N-terminal region of FHA in its secretion, we used truncated FHA derivatives produced by *B. pertussis* strains containing 3' deletions in *fhaB*. These polypeptides are efficiently secreted in a FhaC-dependent manner

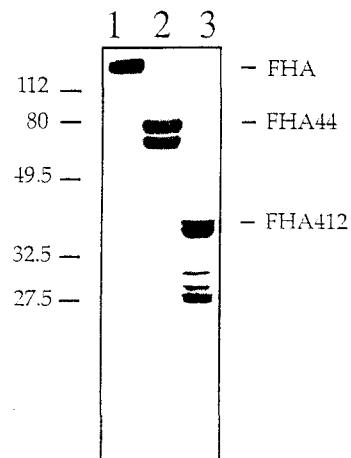


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of truncated FHA polypeptides. FHA (lane 1), Fha44 (lane 2), and Fha412 (lane 3) were affinity purified from culture supernatants of *B. pertussis* BPSM, BPGR4(pBG4), and BPGR4(pBG12), respectively, and analysed by 12% SDS-PAGE. Each lane contained 5 µg of purified protein. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the left margin.

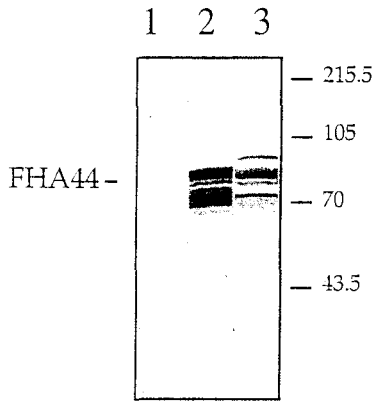
(Renaud *et al.*, 1996). The plasmid-borne truncated genes containing the 5' 2.5 kb (pBG4) or 1.3 kb (pBG12) of *fhaB*, were introduced into BPGR4, a *B. pertussis* strain in which chromosomal *fhaB* was deleted (Locht *et al.*, 1992). The FHA polypeptides in the culture supernatant of the transformed strains were purified by heparin-Sepharose chromatography. The sizes of the purified proteins, designated Fha44 and Fha412, were estimated by SDS-PAGE (Fig. 1). The largest FHA-related polypeptides were found in each case to be significantly (approximately 8–9 kDa) smaller than expected from their amino acid sequences, if one considers the first in-frame AUG as being the start codon (Table 1). This observation suggested that these polypeptides either migrated abnormally during SDS-PAGE or were subjected to proteolytic processing. In

Table 1.  $M_r$  of FHA and FHA derivatives.

Strain	Calculated $M_r$ (kDa)	Estimated $M_r$ (kDa) of the largest FHA polypeptide	
		secreted	cell-associated
<i>B. pertussis</i>			
BPSM	ND <sup>a</sup>	219	
BPGR4(pBG12)	49.1	41	ND
BPGR4(pBG4)	89.5	80	89
<i>E. coli</i>			
UT5600(pFJD11)	88.5 (86.4 <sup>b</sup> )	80	89
UT5600(pFJD12)	84.9 (82.9 <sup>b</sup> )	80	84.5
UT5600(pFJD13)	81.2 (79.2 <sup>b</sup> )	80	80

a. Not determined because the C-terminal end of mature FHA is unknown.

b. Size calculated after cleavage of the OmpA signal peptide.



**Fig. 2.** Immunoblot analysis of the cell-associated Fha44. Whole cell extracts of liquid cultures of *B. pertussis* BPGR4 (lane 1) and BPGR4(pBG4) (lane 3) were analysed by 12% SDS-PAGE and immunoblotting using the rat anti-Fha44 polyclonal antiserum. Equivalent amounts of total proteins corresponding to 100  $\mu$ l of bacteria grown to an  $A_{600}$  of 5 were loaded in lanes 1 and 3. Lane 2 contains 100  $\mu$ l of unconcentrated culture supernatant from *B. pertussis* BPGR4(pBG4). The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the right margin.

addition to the largest polypeptide, one or several other polypeptides of smaller sizes were present in the purified preparations. In particular, two major protein bands were usually detected in the Fha44 fraction. These are probably proteolytic cleavage products from the larger forms, because it has been documented that FHA is highly susceptible to proteolysis (Domenighini *et al.*, 1990).

When whole cell extracts of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) were analysed by immunoblotting using anti-Fha44 antiserum, two major proteins of sizes similar to those of the extracellular Fha44 polypeptides were detected. In addition, a larger protein, absent in the culture supernatant, was detected in whole cell extracts (Fig. 2, lane 3; Table 1). Neither of these polypeptides were found in cell extracts of untransformed *B. pertussis* BPGR4 (Fig. 2, lane 1), confirming that they are FHA-related. Higher resolution SDS-PAGE indicated that the  $M_r$  of the additional cell-associated protein was approximately 8–9 kDa larger than that of the largest extracellular product. The 89 kDa size of this cell-associated polypeptide is in accordance with the calculated  $M_r$  (Table 1), and it therefore probably represents a precursor of the secreted forms. This suggests that the secreted forms had undergone proteolytic maturation.

#### N-terminal maturation of Fha44

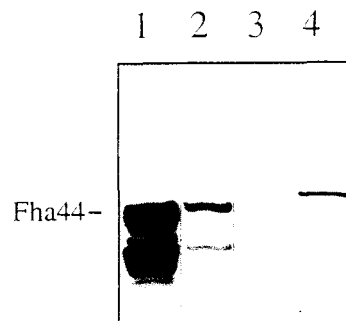
To determine whether the maturation of Fha44 occurred at the N-terminal or at the C-terminal end of its precursor, a short nucleotide sequence coding for an immunodominant epitope of the *Schistosoma mansoni* glutathione-S-transferase (Sm28GST, peptide 190–211) was fused to the 3' end of *fha44*. The resulting plasmid, named pNJ1

and encoding a Fha44-Sm28GST chimera, was introduced into *B. pertussis* BPGR4, and the culture supernatant of the transformed strain was analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-Sm28GST antibodies. As shown in Fig. 3, lane 4, these antibodies strongly recognized the Fha44-Sm28GST chimera. Only the largest secreted polypeptide was recognized by the antibodies. This hybrid protein was slightly larger than the largest Fha44 polypeptide secreted by BPGR4(pBG4), but was still significantly smaller than expected from the amino acid sequence (not shown), indicating that its proteolytic maturation had occurred at the N-terminal end. In addition, the smaller  $M_r$  forms, having lost the Sm28GST epitope, must have been processed at their C-terminal end (Fig. 3, lane 2).

These results, together with the presence of a cell-associated precursor, indicate that the larger secreted form of Fha44 (Figs 1 and 2 and Table 1) results from an N-terminal proteolytic maturation of the precursor by the removal of a 8–9 kDa fragment. The smaller secreted forms probably result from additional cleavages at the C-terminal end of Fha44.

#### Poor FhaC-dependent secretion of Fha44 in *E. coli*

To facilitate further investigations on the N-terminal maturation of Fha44, attempts were made to secrete this protein in *E. coli*. As secretion of Fha44 requires the expression of *fhaC* (Renauld *et al.*, 1996), we first needed to express this accessory gene in *E. coli*. To develop specific antibodies for the detection of FhaC, the major portion of *fhaC* was expressed as a hybrid protein with an N-terminal His-6 tag. High levels of expression were readily achieved upon induction with isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG), and the recombinant protein was purified by Ni-nitrilotriacetic acid agarose chromatography (data not shown). The purified protein was then used for the production of anti-FhaC



**Fig. 3.** Immunoblot analysis of the Fha44-Sm28GST hybrid protein secreted by *B. pertussis*. Culture supernatants of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) (lanes 1 and 3) and BPGR4(pNJ1) (lanes 2 and 4) were analysed by immunoblotting using the anti-Fha44 polyclonal antibodies (lanes 1 and 2) and the anti-Sm28GST polyclonal antiserum (lanes 3 and 4). Each lane contained 100  $\mu$ l of unconcentrated culture supernatant.

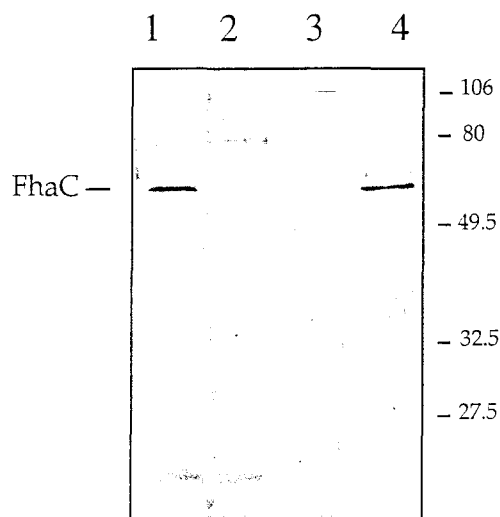


Fig. 4. Immunoblot detection of FhaC. Outer membrane preparations of *B. pertussis* BPSM (lane 1), *B. pertussis* B177 (lane 2), *E. coli* XL1-Blue(pQE32) (lane 3), and *E. coli* XL1-Blue(pFJD6) (lane 4) were analysed by immunoblotting using the anti-FhaC polyclonal antiserum. Equivalent amounts of total proteins were loaded in all lanes. The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the right margin.

antibodies. As shown in Fig. 4, the anti-FhaC antibodies reacted with an approximately 60 kDa protein in outer membrane preparations of *B. pertussis* BPSM (FhaB<sup>+</sup> FhaC<sup>+</sup>). This is the expected size of FhaC. In contrast, no anti-FhaC reactive protein was detected in outer membrane preparations of *B. pertussis* B177, a strain containing a kanamycin-resistance gene insertion in *fhaC* (Willems *et al.*, 1994).

To express full-length *fhaC* in *E. coli*, pFJD6 was constructed, in which *fhaC* was cloned under the control of an inducible promoter. The recombinant plasmid was introduced into *E. coli* XL1-Blue, and outer membrane fractions of the transformed cells were prepared and analysed by immunoblotting using the anti-FhaC antibodies. As shown in Fig. 4, a protein of the same size as the *B. pertussis* FhaC was detected in the outer membrane fractions of *E. coli* XL1-Blue(pFJD6), whereas no immunoreactive protein was detected in outer membrane fractions of *E. coli* XL1-Blue transformed with the vector lacking *fhaC*.

The co-expression of *fhaC* and *fha44* was then attempted in *E. coli* using pFJD6 together with pFJD9, which is a pFJD6-compatible pMMB91 derivative containing the *fha44* gene under the control of the *tac* promoter. No Fha44 was detected by immunoblotting of culture supernatants or whole cell extracts of IPTG-induced *E. coli* XL1-Blue(pFJD6, pFJD9). Identical results were obtained using *E. coli* UT5600, a strain deficient for the production of the outer membrane protease OmpT. This latter strain was chosen for use in further experiments.

To test whether the *fhaC* gene construction under the

control of the IPTG-inducible promoter was able to provide a functional product, we used pFJD8 to complement the *fhaC* mutation in *B. pertussis* B177. This plasmid is a pMMB67-derivative that can autonomously replicate in *Bordetella*. Transformation of *B. pertussis* B177 with pFJD8 was able to restore the secretion of FHA (not shown), indicating that functional expression of *fhaC* was achievable from such a construct.

#### Lack of protein export in *E. coli* using the N-terminal region of FhaB

The lack of Fha44 secretion in *E. coli* described above suggests that the N-terminal sequence of FhaB might not function as an efficient export signal in *E. coli*. This hypothesis was tested using translational gene fusions between the 5' end of *fhaB* (252 bp of the coding region) and the *lacZ* gene or the part of the *phoA* gene encoding the mature protein. The constructions gave rise to protein chimeras fusing the first 84 amino acid residues of FhaB to  $\beta$ -galactosidase (FHA $\beta$ Gal) or alkaline phosphatase (FHAPhoA) as depicted in Fig. 5. The corresponding plasmids, pFHA $\beta$ gal and pFHAphoA, were introduced into *E. coli* XL1-Blue and CC118, respectively, either alone or *in trans* with pQHB, a compatible plasmid containing *bvgA* (Boucher *et al.*, 1994), the product of which is required for transcriptional activation of *fhaB*. As the *bvgA* gene in this plasmid was under the control of an IPTG-inducible promoter, this combination allowed for transcription of the chimeric genes from the promoter of *fhaB* upon induction with IPTG. When plated onto Luria-Bertani (LB) agar containing Xgal and IPTG, the *E. coli* XL1-Blue(pFHA $\beta$ gal) colonies were light blue and the *E. coli* XL1-Blue(pQHB, pFHA $\beta$ gal) were dark blue, indicating that active  $\beta$ -galactosidase was produced, and, therefore, that the chimeric protein must be located in the cytoplasm or on the cytoplasmic side of the inner membrane. No apparent toxicity of this construct was observed in *E. coli*, suggesting that the N-terminal part of FhaB did not direct the  $\beta$ -galactosidase to the export machinery (Bieker and Silhavy, 1989). These results were confirmed by liquid cultures. After induction of *bvgA* expression, the  $\beta$ -galactosidase activity in *E. coli* XL1-Blue(pFHA $\beta$ gal, pQHB) was found to be of the same order of magnitude as that of positive control *E. coli* XL1-Blue(pBBR1MCS, pQHB), and over 10-fold higher than that of *E. coli* XL1-Blue(pFHA $\beta$ gal), whereas almost no activity was detected in untransformed cell extracts (Fig. 6).

The opposite phenotype was observed with the FHA-PhoA hybrid. No significant alkaline-phosphatase activity was found in *E. coli* CC118(pFHAphoA) regardless of the presence of pQHB within the same cell, although high levels of PhoA activity were found in the positive-control strain *E. coli* CC118 transformed with pEL1, encoding

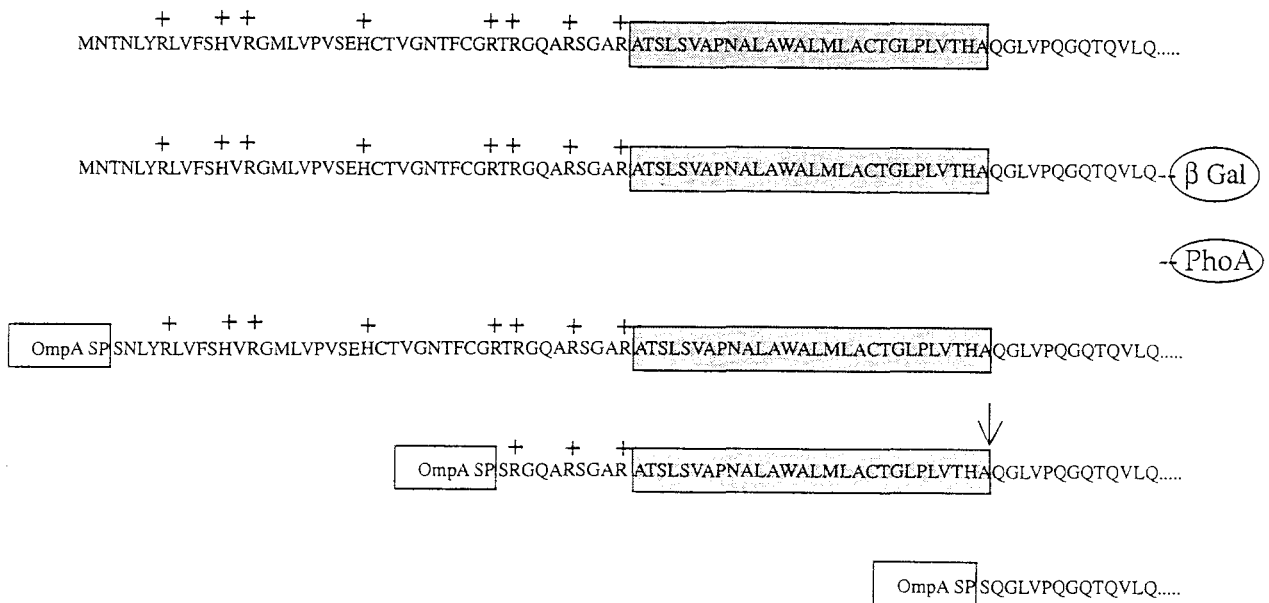


Fig. 5. Schematic representation of the various translational chimeras. The top line represents the N-terminal sequence of FhaB starting with the first of three possible in-frame methionines. The second line depicts the translational fusions between the N-terminal region of FhaB and either  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal in oval) or alkaline phosphatase (PhoA in oval). The third, fourth and fifth lines depict the translational fusions between the OmpA signal peptide (OmpA SP in white box) and the various FhaB peptides. The '+' designates positively charged residues, and the hydrophobic segment is boxed in dark grey. The arrow in the fourth line indicates the cleavage site generating the N-terminus of Fha44 secreted by *E. coli*.

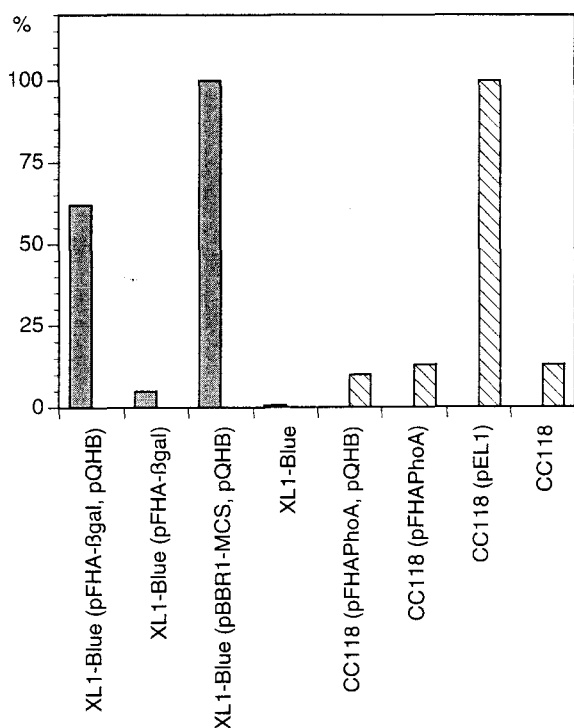
the complete *phoA* gene (Fig. 6). The absence of PhoA activity and the presence of  $\beta$ -galactosidase activity indicate that the 84 N-terminal residues of FhaB do not function as an efficient signal peptide in *E. coli*.

When the plasmids containing the hybrid genes were introduced into *B. pertussis*, pFHA $\beta$ gal yielded extremely low transformation rates. None of the few chloramphenicol-resistant clones that could be grown in liquid medium had measurable  $\beta$ -galactosidase activity, and, in all cases, the reisolated plasmid differed from the original construct, indicating that genetic rearrangements had occurred (not shown). These observations suggest that the product of the chimeric *fhaB-lacZ* gene was toxic to *B. pertussis*, possibly by jamming of the translocase, since  $\beta$ -galactosidase is incompatible with export (Bieker and Silhavy, 1989). In contrast, pFHaphoA could easily be introduced into *B. pertussis*. PhoA activity could be detected in *B. pertussis* BPSM(pFHaphoA), but no activity was detected when pFHaphoA was introduced into *B. pertussis* BP347, an avirulent strain containing a Tn5 insertion in the *bvgA* gene (Weiss *et al.*, 1983). This indicates that the PhoA activity detected in BPSM(pFHaphoA) was under the control of the BvgA transactivator, as expected for the *fhaB* promoter. However, even in BPSM(pFHaphoA), the PhoA activity was weak compared to that detected in *B. pertussis* SK39, a strain containing a Tn $phoA$  insertion in the pertussis-toxin operon (Knapp and Mekalanos, 1988) (not shown). This suggests that the first 84 residues of

FhaB constitute a weak or incomplete export signal in *B. pertussis*.

#### Efficient FhaC-dependent Fha44 secretion in *E. coli* by the addition of the OmpA signal peptide

As the N-terminal domain of FhaB did not appear to function as an efficient export signal, we reasoned that this could be one of the reasons for poor secretion in *E. coli*. Therefore, the *E. coli* OmpA signal peptide was fused to the Fha44 sequence. Three different translational gene fusions were constructed and cloned into pMMB91 under the control of the *tac* promoter to yield pFJD11, pFJD12, and pFJD13. These plasmids gave rise to hybrid proteins in which, respectively, the first 2, 33 or 70 N-terminal residues of FhaB were replaced by the 21 residues corresponding to the OmpA signal peptide (Fig. 5). These plasmids were introduced into *E. coli* UT5600 either alone or *in trans* with the compatible pFJD6 containing *fhaC*. The recombinant cells were grown in liquid medium and expression was induced by the addition of IPTG. The culture supernatants were separated from the cells and analysed by immunoblotting using anti-Fha44 antibodies. Polypeptides recognised by anti-Fha44 antibodies were detected in the supernatants of the strains co-expressing *fhaC* and either one of the three *ompA-fha44* fusions (Fig. 7A, lanes 6–8). There were, however, significant quantitative differences between the three



**Fig. 6.** Relative  $\beta$ -galactosidase and alkaline-phosphatase activities of the hybrid proteins in *E. coli*. The  $\beta$ -galactosidase (grey bars) and alkaline phosphatase (striped bars) activities in *E. coli* cell extracts of the indicated strains were determined as described in the *Experimental procedures*. The activities are displayed as the per cent of residual activities relative to the positive controls, *E. coli* XL1-Blue(pBBR1MCS, pQHB) and *E. coli* CC118(pEL1), respectively. The experiments were performed 3–5 times with variations in the absolute values, but not in the relative values.

constructs. The hybrid protein encoded by pFJD12 reproducibly yielded 8–10-fold more secreted Fha44 than the hybrid proteins encoded by pFJD11 and pFJD13, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (not shown). The yield of Fha44 from this construction was typically about 20% of that of *B. pertussis*-produced Fha44. Remarkably, all three extracellular Fha44 proteins produced in *E. coli* had the same apparent  $M_r$  as the major secreted form of Fha44 in *B. pertussis* (see below and Table 1). This was unexpected, as the cleavage of the OmpA signal peptide should have resulted in different sizes of proteins for the three constructs. This finding suggests that the Fha44 polypeptides had undergone proteolytic maturation in addition to the removal of the OmpA signal peptide. The Fha44 secretion was, in all three cases, dependent on the presence of *fhaC* (Fig. 7A, compare lanes 2–4 with lanes 6–8). Very small amounts of Fha44 were occasionally detected in the supernatant of *E. coli* UT5600(pFJD12) in the absence of FhaC, suggesting, perhaps, partial cell lysis or a weak leakage through the outer membrane (Fig. 7A, lane 3). In this case, the Fha44 produced had the same size as that produced by

*B. pertussis*, indicating that the proteolytic maturation beyond the removal of the signal peptide did not depend on FhaC.

Anti-Fha44-reactive proteins of the same size as those found in the culture supernatants were detected in whole cell extracts of the various *E. coli* strains. Interestingly, larger cell-associated immunoreactive proteins were also present in some of these strains (Fig. 7B, lanes 3–5; Table 1). They were particularly abundant in cell extracts of *E. coli* UT5600(pFJD11) regardless of the presence of FhaC (Fig. 7B, lanes 3 and 4). These proteins probably correspond to precursor forms of the secreted proteins.

All three Fha44 proteins secreted by *E. coli* UT5600 (pFJD6) containing pFJD11, pFJD12, or pFJD13, could be purified by heparin–Sepharose chromatography (Fig. 7C). Similar to the *B. pertussis* Fha44, the *E. coli* Fha44 was able to agglutinate rabbit red blood cells, albeit with a somewhat lower titre than Fha44 produced by *B. pertussis*, possibly because of the presence of abundant degradation fragments contaminating the *E. coli* purified preparation (Fig. 7C). Both *B. pertussis* and *E. coli* proteins readily lost their haemagglutination titres upon storage, which was not observed with full-length FHA.

Attempts were made to introduce pFJD11, pFJD12 and pFJD13 into *B. pertussis* BPSM, BPGR4 and BPMC. BPMC lacks *fhaB* and is also defective for the production of FhaC (Locht *et al.*, 1992). In spite of repeated attempts, pFJD13 could not be introduced into *B. pertussis*. In the other cases, most transformants grew very poorly on solid medium. *B. pertussis* BPMC(pFJD11) and BPMC (pFJD12), the only ones able to grow in liquid culture, were then retransformed with pFJD16, which is a compatible plasmid encoding FhaC. Approximately 1% of these double transformants were recognized by the anti-Fha44 antiserum in colony immunoblots. Fha44 detected in the supernatant of these clones was of the same size as Fha44 from *B. pertussis* BPGR4(pBG4), as estimated by SDS–PAGE and immunoblot analyses (not shown). Again, the apparent  $M_r$  of the secreted polypeptides did not depend on the site of the OmpA signal peptide fusion.

Attempts to determine the N-terminal sequences of the Fha44 proteins from the various sources suggested that Fha44 produced by *B. pertussis* is modified, as was previously found for full-length FHA. In contrast, the four N-terminal residues of the *E. coli*-produced Fha44 from strain UT5600(pFJD6, pFJD12) were unambiguously determined as Gln–Gly–Leu–Val. This sequence can be found at positions 72–75 of the FhaB sequence (Fig. 5). The apparent  $M_r$  of Fha44 estimated by SDS–PAGE analysis is compatible with a mature protein starting at position 72.

## Discussion

For most secreted proteins of Gram-negative bacteria, the

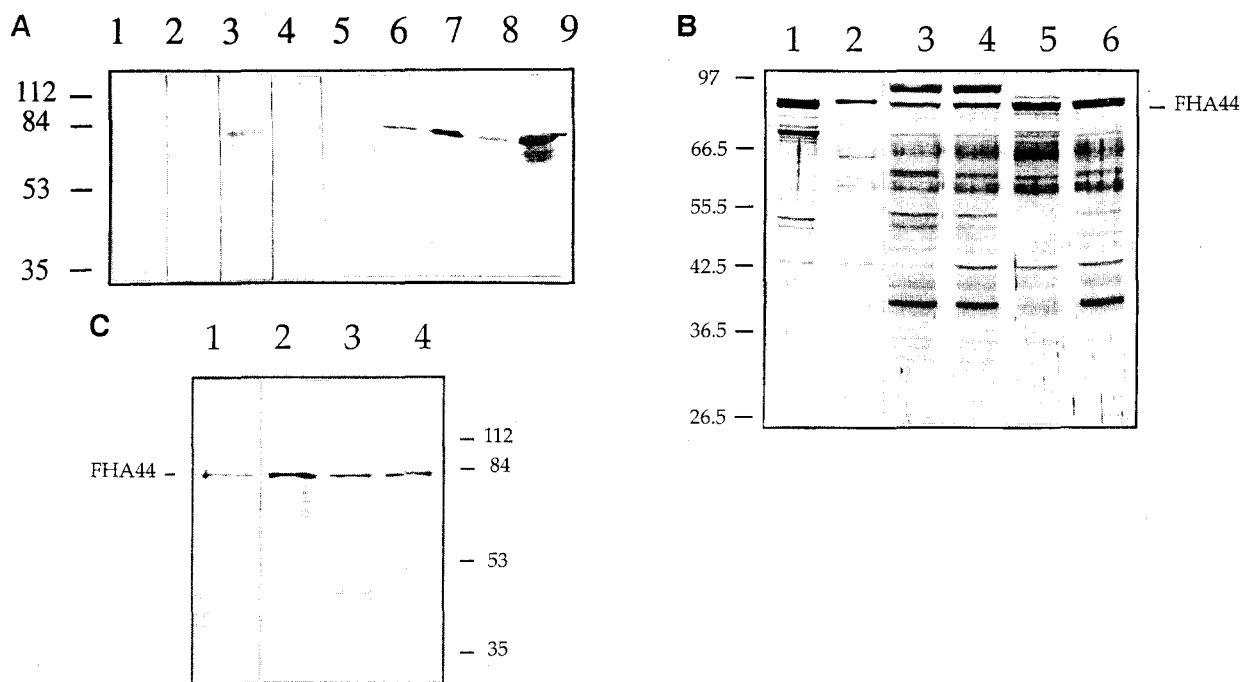


Fig. 7. Immunoblot analyses of Fha44 produced by *E. coli*.

A. Culture supernatants of *E. coli* UT5600(pFJD9) (lane 1), UT5600(pFJD11) (lane 2), UT5600(pFJD12) (lane 3), UT5600(pFJD13) (lane 4), UT5600(pFJD6, pFJD9) (lane 5), UT5600(pFJD6, pFJD11) (lane 6), UT5600(pFJD6, pFJD12) (lane 7), and UT5600(pFJD6, pFJD13) (lane 8) were analysed by immunoblotting using the anti-Fha44 polyclonal antibodies. Lane 9 contains 15  $\mu$ l of culture supernatant of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) as a positive control. Lanes 6–8 contain 15  $\mu$ l of unconcentrated culture supernatant, whereas in lanes 1–4, the culture supernatants were concentrated 20-fold by precipitation. The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the left margin.

B. Cell-associated Fha44 was detected by immunoblotting of whole cell extracts of *E. coli* UT5600(pFJD11) (lane 3), UT5600(pFJD6, pFJD11) (lane 4), UT5600(pFJD12) (lane 5), and UT5600(pFJD13) (lane 6). Equivalent amounts of total proteins were loaded in lanes 3–6. Lanes 1 and 2, respectively, contain 2  $\mu$ g and 500 ng of Fha44 purified from *B. pertussis* BPGR4(pBG4) and *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD12), respectively. The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the left margin.

C. Approximately 500 ng of affinity-purified Fha44 from *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD12) (lane 2), UT5600(pFJD6, pFJD11) (lane 3), and UT5600(pFJD6, pFJD13) (lane 4) were analysed by immunoblotting using the anti-Fha44 polyclonal antiserum. Unconcentrated culture supernatant (5  $\mu$ l) of *B. pertussis* BPGR4(pBG4) (lane 1) was used as a control. The  $M_r$  of the markers are given in kDa in the right margin.

secretion mechanism comprises two distinct steps, termed the GSP (Pugsley, 1993). The first step allows the protein to be transported through the inner membrane and it normally depends on the presence of a cleavable N-terminal signal peptide and the Sec apparatus (Pugsley, 1993), and has been studied extensively. The details of the second step, responsible for the transport through the outer membrane, are much less well characterized. The mechanisms of protein secretion across the outer membrane fall within a small number of categories (Lory, 1992; Salmond and Reeves, 1993), requiring between zero to over a dozen accessory proteins. These accessory proteins may express their assistance in secretion with more or less specificity for their cognate substrates. Secretory intermediates between the first and second steps may sometimes be detected in the periplasmic space following cleavage of the signal peptide. Besides the GSP, some Gram-negative microorganisms also use totally different, Sec-independent secretion mechanisms, without a periplasmic intermediate (Van Gijsegem *et al.*, 1993; Wandersman, 1992).

The *B. pertussis* FhaB possesses an unusual N-terminal sequence. As shown in Fig. 5, this sequence contains a 43 residue-long hydrophilic segment with many charged amino acid residues, followed by a 28 residue-long hydrophobic segment. Unlike typical signal peptides, this sequence did not allow export of PhoA through the cytoplasmic membrane of *E. coli*, but allowed low levels of PhoA export in *B. pertussis*. However, this export in *B. pertussis* was much less efficient than that observed for PhoA fused to a typical signal peptide, such as that of the S1 subunit of pertussis toxin. This contrasts with the highly efficient secretion of FHA by *B. pertussis* and suggests, therefore, that additional signals may be important for FHA translocation, even through the inner membrane. Unlike classical signal peptides, these additional signals are probably located downstream of the first 80 residues of FHA.

In contrast to the first FHA residues, other *B. pertussis* signal peptides, such as those of the pertussis-toxin subunits, allow for efficient Sec-dependent export of proteins into the *E. coli* periplasm (Burnette *et al.*, 1988),



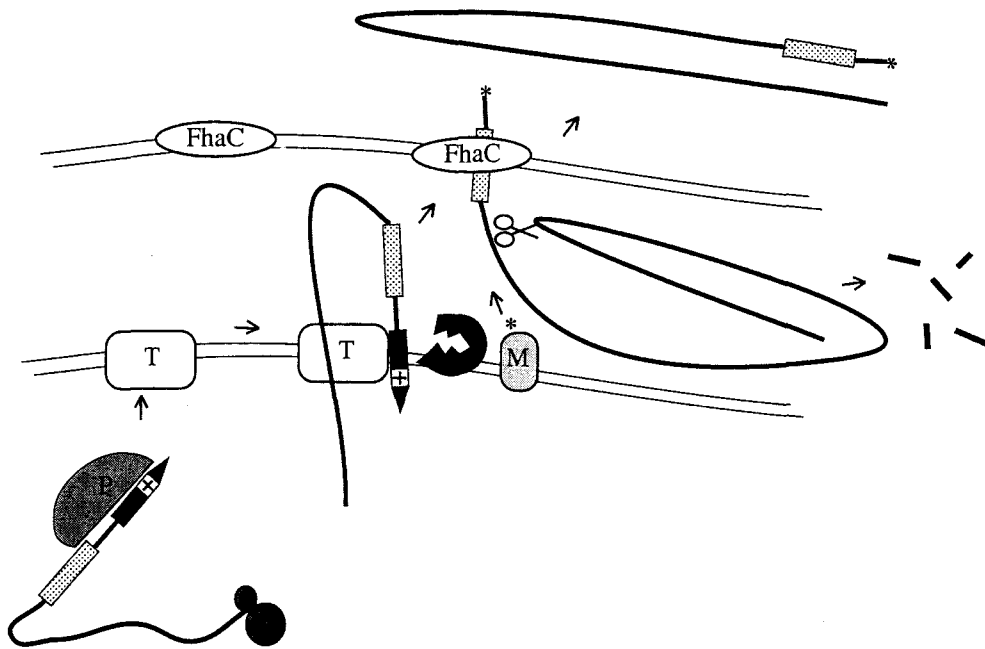
suggesting that *B. pertussis* also contains a Sec-like secretion pathway. With the native N-terminal region of Fha44, only very low secretion levels were achieved in *E. coli*. However, the addition of a canonical *E. coli* signal peptide allowed efficient Fha44 secretion into the *E. coli* culture supernatant in a FhaC-dependent manner. For one of the constructs, the secretion level approached the order of magnitude found in *B. pertussis*. Interestingly, the highest level of secretion in *E. coli* was obtained when the FHA N-terminal hydrophobic region was maintained in addition to the hydrophobic region of the OmpA signal peptide. Furthermore, the final proteolytic processing of that protein in *E. coli* was shown to take place immediately behind the hydrophobic segment of Fha44 rather than behind that of the OmpA signal peptide (Fig. 5). At present, it is unknown whether this processing takes place in several consecutive steps. The lack of the hydrophobic segment in the shorter construct was detrimental to secretion both in *E. coli* and in *B. pertussis*. Together these results suggest that the export/secretion of FHA either represents a novel pathway which remains to be characterized or, alternatively, that FHA is exported in a Sec-dependent manner but has additional, untypical features and possibly additional targeting factors.

As expected, efficient extracellular secretion of Fha44, even when fused to the OmpA signal peptide, requires the presence of FhaC, the outer membrane protein homologous to the *S. marcescens* and *P. mirabilis* haemolysin accessory proteins. However, in contrast to what has been observed for ShIA, secretory intermediates of Fha44 have not been isolated yet and do not seem to accumulate in the periplasm in the absence of FhaC (F. Jacob-Dubuisson, unpublished data). This suggests that FHA export through the cytoplasmic membrane and secretion through the outer membrane may be coupled. Recently, a new member of the FhaC-like outer membrane protein family has been identified in *Haemophilus influenzae* (Barenkamp and St Geme, 1994). This protein, named HMWB, is required for the secretion of HMWA, an adhesin that shares some homology with FHA and is recognized by at least one anti-FHA monoclonal antibody (Barenkamp and Leininger, 1992). FHA, HMWA, ShIA and HpmA all share the five-amino acid motif Asn-Pro-Asn-Gly-Ile which is probably involved in interactions with their respective outer membrane accessory proteins (Locht *et al.*, 1993). FHA and HMWA share additional homology over 22 residues at the N-terminus of their precursors, which is not found in ShIA and HpmA. Furthermore, the regions that follow this N-terminal homology show strikingly similar hydrophilicity profiles, composed of a long, positively charged segment preceding a long hydrophobic domain. This is also not found in ShIA and HpmA. These observations suggest that FHA and HMWA form a sub-family within the family of proteins secreted via FhaC-like outer

membrane proteins. Interestingly, secretion of the *H. influenzae* adhesin was demonstrated to require the accessory protein HMWC in addition to the FhaC-homologue HMWB (Barenkamp and St Geme, 1994). Although the subcellular location of HMWC has not been determined yet, it is probably located within the cytosol since it does not possess a signal peptide. HMWC has been hypothesized either to act as a transcriptional activator, or to stabilize HMW mRNA or HMWA itself (Barenkamp and St Geme, 1994). Alternatively, such a subcellular location would be compatible with a role played in the first, trans-cytoplasmic membrane step of secretion. In that case, a protein homologous to HMWC might be involved in the first step of secretion of FHA in *B. pertussis*. This accessory protein would not be required when a Sec-dependent signal peptide is fused to FHA. It could recognize the export signals of FHA and pilot it to the translocator, reminiscent of the function of the Yop-specific Syc chaperones (Wattiau *et al.*, 1994).

Regardless of the presence of the OmpA signal peptide, and regardless of its location in the N-terminal domain of Fha44, the extracellular Fha44 peptides all had the same apparent  $M_r$  in both *E. coli* and *B. pertussis*. The presence of anti-Fha44-reactive cell-associated proteins with apparent  $M_r$  corresponding to the size expected from the respective protein sequences indicates that Fha44 is produced as a precursor and undergoes an extensive N-terminal proteolytic maturation beyond the OmpA signal peptide cleavage. This maturation occurs in *E. coli* as well as in *B. pertussis* and appears to be independent of FhaC. Therefore, it is probably catalysed by ubiquitous envelope proteases, or perhaps by autoproteolysis, albeit no protease activity has yet been associated with FHA. When the OmpA signal peptide was fused to the N-terminus of the Fha44 precursor, the processing in *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD11) was less efficient and the secretion was impaired compared with that in *E. coli* UT5600(pFJD6, pFJD12) (see Fig. 7, A and B), indicating that the N-terminal maturation of FHA is intimately linked to its secretion. Interestingly, the N-terminal sequence of the *E. coli*-secreted Fha44 corresponds to the residues immediately following the 28-residue-long hydrophobic domain (Fig. 5), and this processing site matches the signal-peptide cleavage site predicted by Delisse-Gathoye *et al.* (1990). Although the N-terminus of the *B. pertussis* Fha44 could not be determined, it is likely that its N-terminal processing takes place at the same position as that in *E. coli* Fha44, or very close to it, since the size of the *B. pertussis* Fha44 is indistinguishable from that of *E. coli* Fha44 within the resolution of SDS-PAGE analysis.

The inaccessibility of FHA and Fha44 purified from *B. pertussis* to N-terminal sequencing suggests a covalent modification of the N-terminal residue of the mature protein. This modification remains, as yet, uncharacterized.



**Fig. 8.** Working model for FHA secretion in *B. pertussis*. FhaB would be synthesized with an N-terminal region comprising a 22-residue segment homologous to that of HMWA, as represented by the black triangle; a positively charged segment, as represented by the '+' sign; a hydrophobic segment, as represented by the black box; and a 115-residue-long region homologous to ShIA and HpmA, as represented by the dotted box. Some, or all, of these segments form part of the secretion signals of FhaB. The N-terminus would be recognised by a cytoplasmic pilot protein (P) and targeted to a translocase (T) located in the cytoplasmic membrane. During or after translocation, the N-terminal region of FHA is proteolytically cleaved and the resulting N-terminal residue is modified (indicated by the asterisk) by a 'modifying enzyme' (M). The 115-residue segment homologous to ShIA and HpmA interacts with FhaC to allow secretion of the protein across the outer membrane. The 150 kDa C-terminal portion of FhaB is removed and the mature FHA is released in the extracellular milieu.

Although N-terminal proteolytic maturation may be required for FHA secretion, this modification is not essential for extracellular secretion, at least in *E. coli*. It is also not essential for the haemagglutination activity, or for FHA adherence to sulphated carbohydrates, the binding-site of which has recently been assigned to the N-terminal region of FHA (Hannah *et al.*, 1994). In addition to its nature, the function of this modification remains to be investigated. It could conceivably be involved in the stability of the protein, its interaction with other molecules or the membranes of *B. pertussis*, folding of full-length FHA, or binding activities other than the interaction with sulphated carbohydrates.

In addition to its N-terminal maturation, FHA is also subjected to an extensive C-terminal maturation, in which the approximately 150 kDa C-terminal domain is removed from the 367 kDa FhaB. This 150 kDa domain may perhaps act as an intramolecular chaperone, maintaining FHA in a secretion-competent state. In our current working model depicted in Fig. 8, FhaB, devoid of a typical signal peptide, is first targeted to the inner membrane with the help of a cytoplasmic factor (pilot, 'P') that has yet to be identified. This step is followed by translocation across the inner membrane and N-terminal processing.

In *B. pertussis*, a covalent modification of the N-terminus of the mature protein then occurs either directly after N-terminal proteolytic maturation or after interaction with FhaC. FhaB interacts with FhaC allowing it to be translocated through the outer membrane. During or after translocation, the C-terminal 150 kDa domain of FhaB is cleaved off, allowing the mature FHA molecule to fold as a hairpin rod, as described by Makhov *et al.* (1994).

FHA is one of the major antigens used in the new acellular vaccines against whooping cough (Sato *et al.*, 1984). Various attempts have been described to express FHA in heterologous hosts for the purpose of developing recombinant vaccines containing FHA (Brown and Parker, 1987; Molina and Parker, 1990; Guzman *et al.*, 1991). In all cases, FHA could be produced in a recombinant form, but remained intracellular. Efficient secretion of FHA in heterologous hosts, as described here, will considerably simplify the purification of this antigen free of other, toxic *B. pertussis* compounds. Moreover, FHA has also been produced in attenuated *Salmonella* strains to develop live mucosal vectors delivering this antigen for the production of a mucosal immune response (Guzman *et al.*, 1991). Since *Salmonella* is phylogenetically very close to *E. coli*,

it is likely that the fusion of the OmpA signal peptide to FHA, together with the co-expression of *fhaC*, will result in high levels of secretion in this organism. This might be of considerable advantage for the induction of high levels of mucosal immune responses against FHA. Finally, we are currently exploring the possibility of using the FHA secretion mechanism for the extracellular secretion of biotechnologically valuable, heterologous proteins in *B. pertussis*, *E. coli* and other Gram-negative organisms.

## Experimental procedures

### Strains, plasmids and culture conditions

The *B. pertussis* and *E. coli* strains as well as the plasmids used in this study are listed in Table 2. Transformations of *B. pertussis* were performed by electroporation (R. Antoine and C. Locht, manuscript in preparation). Growth conditions for *B. pertussis* were described previously (Locht *et al.*, 1992). Liquid cultures were typically grown for 48–60 h prior to analysis. When relevant, antibiotics were added at a final concentration of 100 µg ml<sup>-1</sup> for streptomycin, and 20 µg ml<sup>-1</sup> for ampicillin, kanamycin or chloramphenicol. *E. coli* strains producing Fha44 were grown in liquid LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) supplemented with 0.1% dimethyl-β-cyclodextrin (Teijin Ltd.). The production of recombinant Fha44 was achieved by the addition of IPTG (Promega) to a final concentration of 1 mM after the cultures had reached an optical density of 1–1.2 at 600 nm. The IPTG-treated cultures were then incubated under agitation for an additional three hours prior to analysis.

### Plasmid constructions

Standard procedures described by Sambrook *et al.* (1989) were used for cloning. pFHAβgal was constructed as follows. A 500 bp *EcoRI*–*PstI* fragment containing the promoter region and the 5' end of *fhaB* was isolated from pRIT13122 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) and cloned into the corresponding sites of pNM482 (Minton, 1984) to create a *fhaB*–*lacZ* translational fusion. The resulting plasmid was named pFHA2. The 5.5 kb *EcoRI*–*StuI* fragment of pFHA2 containing the *fhaB*–*lacZ* fusion was then cloned into *EcoRI*/*SmaI*-digested pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994). The resulting plasmid was named pFHAβgal.

To construct pFHAphoA, the 500 bp *EcoRI*–*PstI* fragment isolated from pRIT13122 was first cloned into pUC8 to create pFHA1. The 500 bp *EcoRI*–*HindIII* fragment from pFHA1 containing the promoter region, and the 5' end of *fhaB* was cloned into the corresponding sites of the polylinker of pBBR1MCS. The resulting plasmid was named pFHA4. The signal peptide-less *E. coli phoA* gene was obtained as a 4.4 kb *SmaI* fragment from pEL1 (Kremer *et al.*, 1994) and cloned into the *SmaI* site of pUC19 to yield pPhoA19. This fragment was then recovered as a *Sall*–*Asp718* fragment and cloned in-frame with the 5' end of *fhaB* into the corresponding sites of pFHA4 to yield pFHAphoA.

pQE9::PstI codes for a protein composed of most of FhaC fused to a 6-histidine residue motif at its N-terminus. It was obtained by cloning a 2.2 kb *PstI* fragment from pRIT12990

(Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) into the same site of pQE9 (Diagen).

pFJD6 and pFJD16 contain the entire *fhaC* gene under the control of IPTG-inducible promoters in two different vectors. *fhaC* was obtained as a 2.3 kbp *BclI* fragment from pRIT12990 and cloned into the *BamHI* site of pQE32 (Diagen) such that the 3' end of the *fimD* gene, which precedes *fhaC*, formed a translational fusion with the polyhistidine motif of the vector. This resulted in pFJD6. To construct pFJD16, the same *BclI* fragment was cloned into the *BamHI* site of pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994) and its orientation was verified by restriction endonuclease digestion.

pFJD8, which encodes *fhaC* under the control of the *tac* promoter in the broad-host-range, low-copy-number vector pMMB67EH (Fürste *et al.*, 1986), was obtained as follows. During the construction of pFJD6, one additional plasmid (pFJD2) was isolated that contained two *fhaC* inserts in tandem. The 2.3 kb *EcoRI*–*BclI* fragment encoding *fhaC* was isolated from pFJD2 and cloned into *EcoRI*/*BamHI*-restricted pMMB67EH.

pFJD9, which contains the promoter region and the 5' 2.5 kb of *fhaB* up to the first *BamHI* site downstream of the vector *tac* promoter, was constructed by cloning the 2.8 kb *EcoRI*–*BamHI* of pBG4 (Renauld *et al.*, submitted) into the same sites of pMMB91.

pNJ1 was constructed as follows. The synthetic oligonucleotides TAGGATCCGGGCCGGGGCCCGAAAATCTGT-AGCC containing a *BamHI* site (underlined) and TAAGATCT-CCCGGGCCCGGGAAGGGAGTTGCAGG containing a *BglII* site (underlined) were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification from plasmid pEV28, kindly provided by R. Pierce (Institut Pasteur de Lille). This plasmid is a pBR322-derivative containing the cDNA encoding the *S. mansoni* glutathione-S-transferase (Sm28GST) (Balloul *et al.*, 1987). The amplified DNA corresponded to the region of the Sm28GST gene encoding peptide 190–211 flanked by short linker sequences composed of prolines and glycines. Forty cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 60°C) and extension (1 min at 72°C) were performed. The PCR product was purified, digested by *BamHI* and *BglII* and cloned into the *BamHI* site of pBG4. Altogether, 29 residues were introduced in-frame at the C-terminal end of Fha44.

pEC1 was obtained by cloning the 100 bp *XbaI*–*BamHI* fragment of pIN-OmpAIII-Hind (Rentier-Delrue *et al.*, 1988) into the corresponding sites of pACYC184. This fragment codes for the *E. coli* OmpA signal peptide followed by a short polylinker with a unique *HindIII* site. pEC11 was constructed as follows. A 615 bp fragment containing the 5' end of *fhaB* was amplified from plasmid pRIT13130 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990) by PCR using the oligonucleotides TTTAACCGATGCGGCCGCGCTTG, which contains a *NotI* (underlined) site, and TATAAGCTTCGAACCTGTACAGGC-GGTC, containing a *HindIII* site (underlined). Next, 35 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 58°C) and DNA polymerization (1 min at 72°C) were performed. The PCR product was purified, digested with *NotI* and *HindIII* and used in a three-way ligation with *HindIII*/*BamHI*-digested pEC1 and the 2 kb *NotI*–*BamHI* fragment isolated from pRIT13197 (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990). The resulting plasmid encodes a translational fusion in which the OmpA signal peptide was substituted for the first two residues of Fha44

Table 2. Strains and plasmids used in this study.

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Reference/Source
<b>Strain</b>		
<i>B. pertussis</i>		
BPSM	Sm <sup>R</sup> Nai <sup>R</sup> Tohama I derivative	Menozzi <i>et al.</i> (1994)
BPGR4	BPSM derivative with a chromosomal deletion of <i>fhaB</i>	Locht <i>et al.</i> (1992)
BPMC	BPSM derivative with a chromosomal deletion of <i>fhaB</i> and <i>fimA</i>	Locht <i>et al.</i> (1992)
B177	B112 derivative <i>fhaC::kan</i>	Willems <i>et al.</i> (1994)
SK39	18323 derivative <i>ptx::TnPhoA</i>	Knapp and Mekalanos (1988)
BP347	<i>bvg::Tn5</i> Vir <sup>-</sup> Tohama I derivative	Weiss <i>et al.</i> (1983)
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	F' ( <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10)	Stratagene
UT5600	Δ <i>ompT</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center (Yale University)
CC118	Δ <i>lac</i> Δ <i>phoA</i>	Manoil and Beckwith (1985)
<b>Plasmid</b>		
<b>Cloning vectors</b>		
pBBR1MCS	Broad-host-range cloning vector derived from pBBR122	Kovach <i>et al.</i> (1994)
pIN-III-OmpA-Hind	Vector for translational fusions with OmpA signal sequence	Rentier-Delrue <i>et al.</i> (1988)
pMMB67EH	Broad-host-range vector containing the <i>tac</i> promoter, Amp <sup>R</sup>	Fürste <i>et al.</i> (1986)
pMMB91	Broad-host-range vector containing the <i>tac</i> promoter, Km <sup>R</sup>	Fürste <i>et al.</i> (1986)
pQE9, pQE32	Expression vectors containing the T5 promoter and <i>lac</i> operator sequences	Diagen
<b>Constructs</b>		
pBG4	2.8 kb <i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> ( <i>fha44</i> ) in pBBR122	Renauld <i>et al.</i> (1996)
pBG12	1.57 kb <i>EcoRI</i> - <i>Sal</i> I fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pBBR122	Renauld <i>et al.</i> (1996)
pEC1	100 bp <i>Xba</i> I- <i>Bam</i> HI fragment of pIN-III-OmpA-Hind in pACYC184	This work
pEC11	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3-862) in pEC1	This work
pEC12	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 34-862) in pEC1	This work
pEC13	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 71-862) in pEC1	This work

Table 2. Continued.

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	Reference/Source
pEL1	<i>phoA</i> in <i>E. coli</i> -mycobacteria shuttle vector	Kremer <i>et al.</i> (1995)
pEV28	pBR322 derivative containing the Sm28GST-coding sequence (Balloul <i>et al.</i> , 1987)	R. Pierce, Institut Pasteur de Lille
pFHA1	0.5 kb <i>EcoRI</i> - <i>Pst</i> I fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pUC8	This work
pFHA2	Translational fusion encoding the first 84 residues of FhaB plus β-gal in pNM482	This work
pFHA4	0.5 kb <i>EcoRI</i> - <i>Hind</i> III fragment of pFHA1 in pBBR1MCS	This work
pFHAβgal	Translational fusion encoding the first 84 residues of FHAB plus β-gal in pBBR1MCS	This work
pFHAphoA	Translational fusion encoding the first 84 residues of FhaB plus PhoA in pBBR1MCS	This work
pFJD2	Two <i>fhaC</i> inserts in tandem in pQE32	This work
pFJD6	<i>fhaC</i> in pQE32	This work
pFJD8	<i>fhaC</i> in pMMB67EH	This work
pFJD9	<i>fha44</i> in pMMB91 under the control of <i>Ptac</i>	This work
pFJD11	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 3-862) in pMMB91	This work
pFJD12	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 34-862) in pMMB91	This work
pFJD13	Translational fusion encoding OmpA signal peptide plus Fha44 (residues 71-862) in pMMB91	This work
pFJD16	<i>fhaC</i> in pBBR1MCS	This work
pNJ1	Translational fusion encoding Fha44 plus Sm28GST (residues 190-211) in pBBR122	This work
pNM482	Vector for <i>lacZ</i> translational fusion	Minton (1984)
pPHOA19	Signal peptide-less <i>phoA</i> in pUC19	This work
pQE9::PstI	Translational fusion His-6-FhaC in pQE9	This work
pQHB	<i>bvgA</i> cloned in pQE9	Boucher <i>et al.</i> (1994)
pRIT13122	2.3 kb <i>EcoRI</i> - <i>Pst</i> I fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pUC18	Delisse-Gathoye <i>et al.</i> (1990)
pRIT13130	1.5 kb <i>EcoRI</i> - <i>Sal</i> I fragment containing 5' end of <i>fhaB</i> in pUC8	Delisse-Gathoye <i>et al.</i> (1990)
pRIT13197	6.3 kb <i>EcoRI</i> - <i>Bgl</i> II fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> in pUC8	Delisse-Gathoye <i>et al.</i> (1990)
pRIT12990	<i>fimB</i> <i>fimC</i> <i>fimD</i> <i>fhaC</i> in pBR327	Delisse-Gathoye <i>et al.</i> (1990)

Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistant; Km<sup>R</sup>, kanamycin resistant; β-gal, β-galactosidase.

(Fig. 5). The entire *NotI*–*HindIII* PCR fragment was sequenced using the sequencing kit of Pharmacia to ensure that no mutation had occurred. pEC11 was digested with *XbaI*, the site was filled in using Klenow and the linearized plasmid was redigested with *Bam*HI. The 2.9 kb fragment containing the fusion was cloned into the *Eco*RI (blunted) and *Bam*HI sites of pMMB91, placing the chimeric gene under the control of the *tac* promoter. Because of the absence of a translational stop in the *Bam*HI site of *fhaB*, 18 amino acid residues encoded by vector DNA were added at the C-terminal end of Fha44.

pEC12 and pEC13, pFJD12 and pFJD13 were constructed in a similar fashion to pEC11 and pFJD11, respectively, except that the *HindIII* primers used with the *NotI* primer to amplify the 5' end of *fhaB* were TCAAAGCTTCGCGTGGT-AAGCGCGAAG for pEC12 (yielding a PCR product of 520 bp) and ATTAAGCTTCCCAGGGCTTGGTTCCTCAG for pEC13 (yielding a PCR product of 410 bp). pEC12 and pFJD12 encode a translational fusion in which the OmpA signal peptide is substituted for the first 33 residues of Fha44, whereas pEC13 and pFJD13 encode a translational fusion in which the OmpA signal peptide is substituted for the first 70 residues of Fha44 (Fig. 5).

#### Cell fractionation

To obtain cellular extracts enriched in outer membrane proteins, liquid *B. pertussis* cultures were centrifuged after reaching an optical density of approximately 2 at 600 nm. Cells were washed in 50 mM Hepes (pH 7.4), resuspended in a small volume (1/10 of the original culture volume) of the same buffer and lysed by sonication on ice. A 15 min centrifugation at 8000 × *g* was performed at 4°C to pellet the cell debris. The supernatant was then centrifuged at 100 000 × *g* for 60 min at 15°C, and the resulting membrane pellet was frozen, thawed and resuspended in the same volume of 50 mM Hepes (pH 7.4) buffer containing 1% sarkosyl. After a 30 min incubation at 20°C, the suspension was centrifuged at 100 000 × *g* for 60 min at 15°C. The resulting pellet was enriched in outer membrane proteins, as shown by the presence of a strong porin band upon analysis of the preparation by SDS–PAGE. A similar procedure was used to prepare outer membrane extracts of *E. coli* strains containing *fhaC* after the cultures had been treated for 2–3 h with IPTG (Promega).

#### Protein analyses

Where stated, proteins of *E. coli* supernatants were concentrated by precipitation using 6% trichloroacetic acid and 20 mM deoxycholate prior to SDS–PAGE analysis. They were resuspended in a small volume of 100 mM Tris–HCl (pH 8) and electrophoresis buffer according to Laemmli (1971).

Proteins were separated by SDS–PAGE using 12% polyacrylamide gels, unless otherwise stated, and stained with Coomassie brilliant blue. Alternatively, proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) for immunoblotting. The blots were developed using rat anti-Fha44 (Renaud *et al.*, submitted) or anti-FhaC antiserum diluted 500-fold in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween and 1% BSA, followed by alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rat immunoglobulin G.

Colony immunoblots were developed as described above except that colonies were lifted onto nitrocellulose sheets directly from agar plates containing 10 μM IPTG in addition to the required antibiotics.

#### Purification of Fha44

The purification of FHA and Fha44 was performed by affinity chromatography as described by Menozzi *et al.* (1991). Briefly, culture supernatants of *B. pertussis* or of IPTG-treated *E. coli* were collected, filtered on 0.45 μm membranes and loaded onto a 3 ml heparin–Sephrose column equilibrated in PBS. The columns were washed extensively in PBS, and the bound proteins were eluted by 500 mM NaCl in PBS. The fractions corresponding to the elution peak were collected and analysed by SDS–PAGE and immunoblotting.

#### N-terminal sequencing

After SDS–PAGE using a 12% acrylamide gel, liquid electrotransfer of Fha44 onto PVDF was performed in 50 mM Tris, 50 mM boric acid at 18°C overnight. The membranes were then stained with H<sub>2</sub>O:methanol:acetic acid (45:45:10) containing 0.003% Amido Black, and destained in distilled water. N-terminal sequence determinations were performed at the Laboratoire de Microséquence des Protéines, Institut Pasteur à Paris, using an Applied Biosystems 476 sequencer.

#### Production of anti-FhaC antibodies

*E. coli* TG1 (pQE9::Pst) was grown in LB until the optical density at 600 nm reached 0.6. IPTG was then added to a final concentration of 2 mM, and incubation was continued for an additional 5 h. The cells were then harvested by centrifugation and frozen to –20°C, thawed and resuspended in 6 M guanidinium chloride, 100 mM sodium phosphate, 10 mM Tris–HCl (pH 8) (lysis buffer). After stirring for 1 h at room temperature, the cell lysate was centrifuged, and the supernatant was slowly loaded onto a Ni-nitrilotriacetic acid agarose column previously equilibrated in lysis buffer. The column was washed with 10 vol. of lysis buffer; 5 vol. of 8 M urea, 100 mM sodium phosphate, 10 mM Tris–HCl (pH 8) (urea buffer); and several volumes of urea buffer at pH 6.3. Elution of the recombinant protein was performed by urea buffer at pH 5.9. The eluted fractions were analysed by SDS–PAGE and Coomassie-brilliant-blue staining. The fraction containing the highest amount of purified protein was extensively dialysed against 0.9% NaCl and used to immunize 3 male Fischer rats (50 μg per rat). A booster injection was performed after 6 weeks, and serum was taken 5 weeks after boosting. The antisera of the immunized animals were found to react with the recombinant His-6–FhaC protein in contrast to those of non-immunized animals, as determined by immunoblotting.

#### Other immunological techniques

ELISA was performed according to standard procedures (Harlow and Lane, 1988) using 96-well Immunoplates (Nunc). The Fha44 samples were analysed in serial two-fold dilutions by directly coating 50 μl of unconcentrated culture supernatant per well. The anti-Fha44 antiserum was used at a 500-fold

dilution and the goat anti-rat alkaline-phosphatase conjugated immunoglobulin G at a 5000-fold dilution.

#### Haemagglutination assays

A 1% suspension of rabbit red blood cells in PBS was distributed in the rounded-bottom well microtitre plates, and serial two-fold dilutions of Fha44 in PBS were added. The titre was determined as the maximal dilution at which positive haemagglutination was detected.

#### Determination of enzymatic activities

The  $\beta$ -galactosidase phenotype of *E. coli* was detected on LB agar plates supplemented with 0.5 mM IPTG and  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (Xgal, Promega). The PhoA phenotype of *E. coli* was assayed on LB agar plates containing 0.5 mM IPTG and  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Promega). The procedure used to measure  $\beta$ -galactosidase activity in liquid cultures was adapted from Miller (1972). *E. coli* cells were grown in LB. The expression of *bvgA* was induced using 1 mM IPTG for 2–3 h and the cells were harvested by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 1/5 vol. of 100 mM sodium phosphate (pH 7) containing 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$  and 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and sonicated. Aliquots of the clarified sonicates were incubated with ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (Sigma) at 30°C. The enzymatic reaction was followed spectrophotometrically at  $A_{420}$  and the initial velocity was calculated using the linear portion of the kinetic curve.

Alkaline-phosphatase activity was measured as described by Manoil (1991). Liquid cultures of *B. pertussis* or IPTG-treated *E. coli* were centrifuged, the cell pellet was resuspended in 1/10 vol. of 1 M Tris-HCl (pH 8). Cells were sonicated and clarified sonicates used for the enzymatic reaction. Paranitrophenyl phosphate was added to a final concentration of 2.5 mM and the enzymatic reaction was followed at spectrophotometrically at  $A_{420}$ . Initial velocities were determined as above. The enzymatic activities were standardized by the determination of protein concentrations using the Bio-Rad protein assay kit. When applicable, the determination of the plasmid-borne chloramphenicol-transferase activity ensured approximately equal plasmid copy numbers in the different strains. This assay was performed as described by Shaw (1975). Briefly, aliquots of the cell extracts were diluted in 100 mM Tris-HCl (pH 7.8) and mixed with 0.1 mM acetylcoenzyme A (Sigma), 0.4  $\text{mg ml}^{-1}$  5,5' dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Sigma) and 0.1 mM chloramphenicol (final concentrations). The reaction was followed at  $A_{412}$ .

#### Acknowledgements

We wish to thank V. Germain and J. Cornette for the production of anti-FhaC antibodies; N. P. Minton, M. Kovach, M. Bagdasarian, J. Martial, and R. Pierce for plasmids; C. Manoil for *E. coli* CC118; J. J. Mekalanos for *B. pertussis* SK39; A. Weiss and S. Falkow for *B. pertussis* BP347; E. Fort for photography; and E. Pradel for critical reading of the manuscript. Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin was kindly provided by H. Ikeda (Teijin Ltd.). C.B. and N.M. hold fellowships of the Region Nord-Pas de Calais, and F. J.-D. holds an INSERM post-doctoral fellowship.

The work was supported by a European Community Biotechnology grant, by INSERM, Institut Pasteur de Lille, and Région Nord-Pas de Calais.

#### References

- Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. (1987) Molecular cloning of a protective antigen of Schistosomes. *Nature* **326**: 149–153.
- Barenkamp, S., and Leininger, E. (1992) Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **60**: 1302–1313.
- Barenkamp, S.J., and St Geme, III, J.W. (1994) Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun* **62**: 3320–3328.
- Bieker, K.L., and Silhavy, T.J. (1989) PrlA is important for the translocation of exported proteins across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 968–972.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1994) The modular architecture of bacterial response regulator. Insight into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**: 363–367.
- Brown, D.R., and Parker, C.D. (1987) Cloning of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 154–161.
- Burnette, W.N., Mar, V.L., Cieplak, W., Morris, C.F., Kaljot, K.T., Marchitto, K.S., Sachdev, R.K., Locht, C., and Keith, J.M. (1988) Direct expression of *Bordetella pertussis* toxin subunits to high levels in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **6**: 699–706.
- Delisse-Gathoye, A.-M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., De Wilde, M., and Cabezon, T. (1990) Cloning, partial sequence, expression and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **58**: 2895–2905.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., and Rappuoli, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* **4**: 787–800.
- Forsberg, A., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1994) Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol* **2**: 14–19.
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., and Lanka, E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* **48**: 119–131.
- Guzman, C.A., Brownlie, R.M., Kadurugamuwa, J., Walker, M.J., and Timmis, K.N. (1991) Antibody responses in the lungs of mice following oral immunization with *Salmonella typhimurium aroA* and invasive *Escherichia coli* strains expressing the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **59**: 4391–4397.
- Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renaud, G., Locht, C., and Brennan, M.J. (1994) Sulfated glycoconjugate receptors for

- the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* **62**: 5010–5019.
- Hartow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jacob F., Capiou, C., Gathoye, A.-M., Locht, C., and Cabezon, T. (1988) Molecular cloning of the filamentous hemagglutinin structural gene from *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli*. In *FEMS Symposium on pertussis*. Mebel, S., Stompe, H., Drescher, M., and Rustenbach, S. (eds). Berlin: Society of Microbiology and Epidemiology of the GDR, pp. 62–68.
- Knapp, S., and Mekalanos, J.J. (1988) Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **170**: 5059–5066.
- Koronakis, V., and Hughes, C. (1993) Bacterial signal-peptide independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. *Seminars Cell Biol* **4**: 7–15.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M.I., and Peterson, K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Bio/Techniques* **16**: 800–802.
- 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.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Locht, C., Geoffroy, M.C., and Renaud, G. (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* **11**: 3175–3183.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D., and Renaud, G. (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**: 653–660.
- Lory, S. (1992) Determinants of extracellular protein secretion in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **174**: 3423–3428.
- Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Wingfield, P.T., Simon, M.N., and Steven, A.C. (1994) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a bacterial adhesin formed as a 50 nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in  $\beta$ -strands and turns. *J Mol Biol* **241**: 110–124.
- Manoil, C. (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase gene fusions. *Meth Cell Biol* **34**: 61–75.
- Manoil, C., and Beckwith, J. (1985) *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8129–8133.
- Menozzi, F.D., Gantiez, C., and Locht, C. (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* **78**: 59–64.
- Menozzi, F.D., Mutombo, R., Renaud, G., Gantiez, C., Hannah, J., Leininger, E., Brennan, M., and Locht, C. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**: 769–778.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minton, N.P. (1984) Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lac* gene fusions. *Gene* **31**: 269–273.
- Molina, C., and Parker, C.D. (1990) Murine antibody response to oral infection with live *aroA* recombinant *Salmonella dublin* vaccine strains expressing filamentous hemagglutinin antigen form *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **58**: 2523–2528.
- Poole, K., Schiebel, E., and Braun, V. (1988) Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **170**: 3177–3188.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50–108.
- Renaud-Mongénie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D., and Locht, C. (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *J Bacteriol*, in press.
- Rentier-Delrue, F., Swennen, D., and Martial, J. (1988) pIN-III-*ompA* secretion vectors: modification of the *ompA* signal peptide sequence for easier insert cloning. *Nucl Acids Res* **16**: 8726.
- Salmond, G.P.C., and Reeves, P.J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* **18**: 7–12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, Y., Kimura, M., and Fukumi, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **i**: 124–126.
- Schönherr, R., Tsolis, R., Focareta, T., and Braun, V. (1993) Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol Microbiol* **9**: 1229–1237.
- Shaw, W.V. (1975) Chloramphenicol acetyl transferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Meth Enzymol* **43**: 737–755.
- Uphoff, T.S., and Welch, R.A. (1990) Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shIA* and *shIB*). *J Bacteriol* **172**: 1206–1216.
- Van Gijsegem, F., Genin, S., and Boucher, C. (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol* **1**: 175–180.
- Wandersman, C. (1992) Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet* **8**: 317–322.
- Wattiau, P., Bernier, P., Deslé, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10493–10497.
- Weiss, A.A., and Hewlett, E.L. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol* **40**: 661–686.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., and Falkow, S. (1983) Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **42**: 33–41.
- Willems, R.J.L., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renaud, G., Bertin, P., van der Akker, W.M.R., Locht, C., and Mooi, F.R. (1994) Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol* **11**: 337–347.

L'ensemble des résultats présentés précédemment nous permet de proposer un modèle de mécanisme de sécrétion de la FHA à travers les deux membranes de *B. pertussis*. La FHA va ainsi subir une maturation protéolytique côté N-terminal, et également une maturation côté C-terminal au cours de laquelle un domaine d'environ 150 kDa sera clivé du précurseur de 367 kDa.

Dans notre modèle, le domaine N-terminal de FhaB pourrait être reconnu par une protéine "pilote" et ainsi amené jusqu'à une translocase située sur la membrane interne de la bactérie. Au cours de la translocation, la région N-terminale subirait un clivage protéolytique, et la partie N-terminale résultante serait modifiée enzymatiquement. Au niveau périplasmique, la région C-terminale de FhaB "couvrirait" la partie C-terminale de la protéine mature, laissant ainsi la région N-terminale (les 115 acides aminés homologues à ShIA et HpmA) libre d'interagir avec FhaC, ceci afin de permettre la sécrétion de la protéine à travers la membrane externe. Finalement, les 150 kDa du précurseur seraient clivés, permettant à la FHA mature d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire et de prendre sa conformation en "épingle-à-cheveux".

## **B. Applications: utilisation de la FHA en vaccinologie.**

L'objectif de ces deux articles était d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de sécrétion de la FHA. Trois applications directes de ces résultats ont des orientations dans le domaine de la vaccinologie.

La FHA est un des antigènes majeurs utilisé dans les nouveaux vaccins acellulaires contre la coqueluche. Une sécrétion efficace de la FHA par des microorganismes hétérologues simplifierait considérablement la purification de cet antigène, sans risque de



contamination par d'autres composés toxiques de *B. pertussis*. D'autre part, des souches atténuées de *S. typhimurium* exprimant la FHA sont capables d'induire une réponse immune muqueuse spécifique (Guzman *et al.* 1991). *Salmonella* étant très proche phylogénétiquement d'*E. coli*, la fusion OmpA/FHA, en présence de FhaC, devrait se traduire par un taux élevé de sécrétion de la FHA dans cette bactérie. Ceci pourrait se révéler très avantageux pour l'obtention d'une forte réponse immune muqueuse contre la FHA.

Le mécanisme de sécrétion de la FHA peut également être exploité afin d'exprimer des antigènes hétérologues en fusion avec la FHA, soit par une souche recombinante de *B. pertussis*, soit par une autre bactérie Gram négative.

Enfin, les propriétés d'adhésion et potentiellement d'adjuvantité de la FHA peuvent être mises à profit pour le ciblage de vecteurs synthétiques vers les muqueuses des voies respiratoires.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'administrer par voie intranasale à des souris des liposomes contenant de la rSm28GST et présentant à leur surface de la FHA purifiée (liposomes Sm28GST/FHA).

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec O. Poulain-Godefroy et est présenté dans l'article intitulé "Enhanced immunogenicity of glutathion S-transferase liposomes by addition of filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*" qui est en préparation et a fait l'objet du dépôt d'un brevet .

Dans un premier temps, nous avons montré que l'incorporation de la FHA ne modifiait pas la qualité d'incorporation de la Sm28GST dans les liposomes et que la FHA était présente à la surface de ces liposomes. Par la suite, la réponse immune sérique spécifique de la Sm28GST a été évaluée après administration intranasale de ces liposomes Sm28GST/FHA et comparée à celle obtenue à l'aide de liposomes Sm28GST. La quantité de Sm28GST utilisée dans les deux préparations liposomales est identique et correspond à une dose minimale (40 µg) permettant de déterminer l'effet de la FHA sur la réponse anticorps dirigée contre la Sm28GST. L'analyse de la réponse sérique montre que la présence de la FHA à la surface des liposomes induit une augmentation de la réponse sérique dirigée contre la Sm28GST en fonction de la quantité de FHA incorporée. D'autre part, la présence de la FHA (à la dose la plus élevée) à la surface des liposomes

Sm28GST permet d'obtenir la production d'anticorps anti-Sm28GST pour la totalité de la population immunisée.

La présence de la FHA à la surface des liposomes a donc permis d'augmenter la réponse sérique obtenue contre la Sm28GST, probablement du fait d'une augmentation de l'adhésion aux muqueuses entraînant une meilleure stimulation du système immunitaire.



## **ABBREVIATIONS**

Sm28GST *Schistosoma mansoni* 28 kDa Glutathione S-Transferase

DMPC Dimyristoylphosphatidylcholine

DPPC Dipalmitoylphosphatidylcholine

DMPG Dimyristoylphosphatidylglycerol

FHA Filamentous Hemagglutinin

## ABSTRACT

Glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST), which bears protective properties against schistosomiasis, was previously demonstrated to be immunogenic by oral route and to protect against parasitic challenge when used in association with liposomes. Recent studies have shown that our liposome formulations represent an effective delivery system for mucosal immunization to mice by nasal route. To enhance immune response to the parasite antigen delivered by nasal route, we developed new liposome formulation containing a bacterial adhesin, the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* (FHA), together with Sm28GST in order to promote liposome mucosal adherence. Liposomes containing constant suboptimal dose of Sm28GST and increasing doses of FHA were prepared. Accessibility of FHA at the surface of the liposomes to specific antibodies was controlled, and analysis of liposome-associated antigen indicated that similar incorporation of Sm28GST was obtained whatever the FHA dose used. Analysis of sera of mice immunized with Sm28GST/FHA liposomes demonstrated a dramatic increase of the specific immune response together with the increase in FHA dose. The presence of FHA did not interfere in the nature of the humoral immune response and specific antibody isotypes IgG1, IgG2a and IgG2b were detected. Individual analysis demonstrated that for the highest dose of FHA, all mice were positive for FHA and for Sm28GST. Our results show the potential role of FHA in terms of targeting molecule for mucosal synthetic delivery system presenting a multivaccine potential.

## INTRODUCTION

New formulations of multilamellar liposomes adapted for mucosal immunization composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DPPC) and of dipalmytoylphosphatidyl glycerol (DMPG) have been recently developed (9; 25). We have explored the feasibility of such a safe mucosal vaccine against one of the main parasitic disease, the schistosomiasis. Glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST), which is one of the selected candidate by WHO for vaccine development against schistosomiasis (6), has been shown to reduce worm burden and female fecundity in rodents, cattle or monkeys after systemic administration (4; 7). We demonstrated that the association of Sm28GST with liposomes was able to provoke a protective immune response when given by oral route (16). The immunity and protection induced by this association encouraged us to develop new formulations of liposomes used as mucosal vaccine against schistosomiasis. In this context, we studied the impact of nasal administration of Sm28GST-liposome construction. We then developed new formulations to target liposomes to the mucosa with the aim to enhance their uptake and then to reduce the amount of antigen required for induction of an immune response. Our strategy was to incorporate in liposomes, together with the parasite antigen, a protein with mucosa attachment properties. Filamentous hemagglutinin (FHA) of *Bordetella pertussis*, the ethiological agent of whooping cough, possesses several sites of adhesion. Carbohydrate binding sites interfere with cilia, while an heparin binding site is implied in adhesion to epithelial cells and to extracellular matrix, and an RGD sequence promotes adhesion to macrophages (14; 15; 19). We demonstrated here that the use of FHA together with Sm28GST in the liposomes has led to the enhancement of the immune response to Sm28GST in a dose dependent manner, with no change in the orientation of the isotypic profile.

## MATERIAL AND METHODS

### \* Reagents and bacterial strains

Recombinant Sm28GST (rSm28GST) was produced in yeast and provided by Transgène (S.A., Strasbourg, France) after affinity purification as previously described (31). FHA was purified as described elsewhere (20) from *B. pertussis* BPRA, a strain in which the pertussis toxin gene had been deleted (2).

Streptomycin- and nalidixic acid-resistant *B. pertussis* BPSM (Sm<sup>r</sup> Nal<sup>r</sup>) (21) were grown at 36°C on Bordet-Gengou agar (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 5% glycerol and 20% defibrinated sheep blood, and containing 100 mg/ml of streptomycin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 25 mg/ml of nalidixic acid (Sigma).

### \* Liposomes fabrication and analysis

Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), were obtained from Genzyme.

Liposome preparation was carried out using a modification of the thin film hydration method (5). A thin film (20 µmol lipid) consisting of molecular mixture of the two lipid components in a 9:1 molar ratio in tertbutanol were deposited on the surface of suitable glass vessels. After freezing, samples were lyophilised to remove the solvent. Liposomes were formed by hydration of the lipid films with 1 ml of phosphate buffered saline (10 mM, pH 7.2) (PBS) alone or PBS containing either Sm28GST alone or a mixture of Sm28GST and FHA. Concentration that were used as well as percentage of incorporation will be discussed in the Results section. Hydration was carried out with continuous shaking of vessels and at 60°C for 45 seconds; then the suspension was allowed to cool and incubated for 30 minutes at room temperature. The liposomes were then washed by centrifugation at 10,000 x g for 30 minutes and the pellet resuspended in PBS.

Immunoblot analysis of liposomes was performed using 12% SDS-polyacrylamide gels that were transferred onto nitrocellulose sheets. 10 µl of liposomes suspension used for intranasal administration were simply diluted in sample buffer and boiled for 3 minutes before deposition. Free antigens were run as a control. After saturation in 5% dry fat milk, the nitrocellulose was incubated with rat polyclonal antibodies (hyperimmune anti-Sm28GST or anti-FHA). Between incubation with

different specific antibodies, nitrocellulose was washed in PBS, Tw (Tween 1‰). Labeling was detected with an anti-rat coupled to alkaline phosphatase and revealed with BCIP/NBT/

#### \* Immunizations

6-week-old female OF1 mice (Iffa Credo, L'Arbesle, France) were anaesthetized with 200  $\mu$ l per 10 g of body weight of a solution of 5% sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) given intraperitoneally. Mice were immunized by the intranasal route with 40  $\mu$ l of the liposomes suspension or PBS deposited in the nostrils. This corresponds to 2  $\mu$ M of phospholipids at each administration; the dose of antigen administered is given in the Results section for each experiment.

Boosting of FHA response was performed using intranasal infection with wild type *B. pertussis*. After 48 h of culture, *B. pertussis* were resuspended at a concentration of approximately  $1.10^8$  colony-forming units (CFU)/ml in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Infections were performed by the intranasal route with 50  $\mu$ l of the bacterial suspension deposited in the nostrils.

#### \* Sample analysis

Mice were bled by tail puncture and sera were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed for the presence of specific antibodies. BAL fluids were recovered by three consecutive lavages with 0.5 ml of PBS through cannulated trachea of mice killed by pentobarbital overdose. BAL fluids were centrifuged at  $4,000 \times g$  for 10 min to remove cells and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The level of antibodies to FHA and Sm28GST in sera were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Microtiter plates (Immulon III; Dynatech Laboratories, Virginia, USA) were coated for 2 h 30 at  $37^{\circ}\text{C}$  with 50  $\mu$ l/well of 5  $\mu\text{g/ml}$  of FHA or 10  $\mu\text{g/ml}$  of Sm28GST diluted in PBS. Pooled serum samples serially diluted in PBS containing 0.1% Tween (PBS/Tw) and containing 0.5% gelatine (PBS/Tw/g) were added to the coated plates after 3 washes in PBS/Tw and were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The plates were incubated for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and washed three times in PBS/Tw before adding the goat horse radish peroxidase conjugate anti-mouse Ig(H+L) or IgG1 or IgG2a or IgG2b or IgG3 (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA) and incubating for 1 h 30 at  $37^{\circ}\text{C}$ . After 6 washes



with PBS/Tw, 1 mg/ml ABTS (Sigma) in 0.1 M citrate buffer (pH 4), containing 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and incubated for 1 hour at room temperature. The optical density (O. D.) was measured using a Titertek Multiscan MCC/340 reader at 405 nm. For IgA determination, anti-mouse IgA-biotin conjugates (Amersham, Bucks., U.K.) diluted in PBS/Tw/g were added and incubated for 1 h 30 at 37°C. After 5 washes with PBS/Tw, the streptavidin-HRP conjugate (Amersham) was added. After 6 washes with PBS/Tw, 1 mg/ml orthophenyldiamine (Sigma) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5;5), containing 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 50 µl of 2N HCl. For lung antibody determination, the BAL fluids were added to the coated plates and incubated for one night at 4°C in PBS/Tw after 30 min saturation with PBS containing 0.5% gelatine and 3 washes with PBS/Tw. Detection of specific IgA antibodies was performed according to the same procedure used for sera. The optical density (O. D.) was measured using a Titertek Multiscan MCC/340 reader at 492 nm. A linear regression curve of log (O. D.) versus the serum dilution was plotted. Results were expressed in titers, reported as the reciprocal of the dilution giving an optical density three times that of the conjugate control for the pooled serum samples.

## RESULTS

### **Immune response obtained with intranasal administration of Sm28GST-liposomes.**

Liposomes were prepared using three different concentrations of Sm28GST in the rehydration solution (0.2 mg/ml; 1 mg/ml; 5 mg/ml), and given twice intranasally at 2 weeks interval. Since percentage of protein incorporation in liposomes is not linear but increases at low concentrations these values correspond to respectively 15 µg, 70 µg and 300 µg of Sm28GST administered at each instillation for each mouse. Specific immune response in sera was analyzed (Table 1), 1 and 2 weeks after the second instillation (respectively day 20 and day 27). Anti-Sm28GST IgG1 and IgG2a were detected in significant amount at day 27, and antibody levels increased together with the dose of Sm28GST administered. In the aim to detect an effect of FHA associated with Sm28GST in liposomes, on the anti-Sm28GST antibody response, we worked with an intermediate low concentration of 40 µg of Sm28GST administered at each instillation.

### **Characterization of Sm28GST/FHA liposomes**

Increasing doses of FHA were added to Sm28GST liposomes in order to evaluate the impact of the presence of this bacterial adhesin on the enhancement of anti-Sm28GST antibody responses. Three groups of mice were intranasally instilled with liposomes containing the same amount of Sm28GST together with increasing doses of FHA. The immune responses in these animals were compared to that induced after instillation with liposomes containing Sm28GST alone. Control group of mice received PBS by intranasal route. Liposomes were prepared as previously described by rehydration of a lyophilised phospholipid film. Sm28GST and FHA were mixed together in the rehydration solution with the following concentrations: 0.8 mg/ml Sm28GST as a constant, and 60 or 6 or 0.6 or 0 µg/ml FHA.

We first demonstrated that the presence of FHA, whatever its concentration, did not seem to interfere with the incorporation of Sm28GST in liposomes. Indeed, the different preparations of liposomes were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using polyclonal anti-FHA or

anti-Sm28GST antibodies. As shown in Fig. 1, anti-Sm28GST antibodies recognized similarly the different liposomes preparations containing an increasing amount of FHA, suggesting similar levels of incorporation of Sm28GST. The 28 kDa protein was detected with this antiserum, as well as upper bands which could correspond to multimeric forms of the Sm28GST and/or to associations of the parasite antigen with lipid components. In contrast, FHA (220 kDa) was only detected in liposomes preparations with the highest concentration of the bacterial adhesin (60 µg/ml). The lower band probably corresponded to a degradation product of FHA.

The concentration of 0.8 mg/ml of Sm28GST in rehydration solution corresponded to 40 µg antigen administered at each instillation. On the same basis of level of incorporation, the immunization dose of FHA at each instillation were 3 µg, 0.3 µg and 0.03 µg according to the initial concentrations used for liposomes preparations.

### **Comparative immune response obtained after intranasal administration of Sm28GST/FHA liposomes containing increasing doses of FHA**

OF1 mice were twice immunized intranasally at two weeks interval with either PBS, Sm28GST liposomes or with Sm28GST:FHA liposomes previously described. Two weeks after the second instillation, the isotypic profile of anti-Sm28GST and anti-FHA antibody responses were analyzed in pooled sera of immunized-mice (Table 2). We observed a dramatic increase in production of antibodies specific to both antigens correlated with the amount of FHA used together with Sm28GST in liposomes. The antibody responses to Sm28GST obtained after intranasal administration of liposomes were mixed with presence of IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies. The profile of the response seemed not to be affected by the presence of FHA, since the response was already mixed after instillation of mice with Sm28GST liposomes. A general increase in production of all anti-Sm28GST isotypes was observed in parallel of the use of FHA. Serum IgA was detected in the sera of mice immunized with the two highest doses of FHA, whereas it remained undetectable in sera of animals immunized with Sm28GST liposomes alone or with Sm28GST liposomes containing the lowest amount of bacterial

adhesin. IgG3 remained undetectable in sera of mice whatever the liposomes preparations administered.

Presence of anti-FHA antibodies was showed only in sera of mice immunized with liposomes containing the highest dose of FHA together with Sm28GST. This immune response is mixed with the presence of IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies. No IgG3, nor IgA specific for FHA were detected.

In order to determine if the presence of this bacterial adhesin could improve the homogeneity of the antibody response against Sm28GST, analysis of individual sera was performed for specific anti-Sm28GST or anti-FHA IgG antibodies (Table 3). Samples were considered as positive when the titer of antibodies in sera of mice was higher than 40. In the group corresponding to the highest concentration of FHA in Sm28GST liposomes, all animals were positive for anti-Sm28GST antibodies production. This proportion decreased with the dose of FHA incorporated in liposomes. In a similar way, each mice of group receiving liposomes preparations with the highest amount of FHA was considered as positive for anti-FHA antibodies production, while there was only one mouse positive in the group with an intermediate dose of FHA.

No anti-Sm28GST nor anti-FHA was detected in the broncho-alveolar lavage fluids of all groups of mice, 27 days after intranasal instillation

### **Neutralization of the enzymatic activity with Sm28GST:FHA liposomes induced antibodies.**

Protective immunity against schistosomiasis has been correlated with inhibition of the enzymatic activity of Sm28GST (Grzych *et al.* 1993). We have then analyzed the ability of the sera of Sm28GST:FHA liposomes-immunized mice (with the highest dose of FHA) to neutralize this glutathione *S*-transferase activity. 42% ( $\pm 27\%$ ) of neutralization was obtained with 20  $\mu$ l per 230  $\mu$ l of reaction mix of sera from 5 out of 7 mice. Two mice did not produce significant levels of neutralizing antibodies even at comparable IgG anti-Sm28GST antibody levels (data not shown). 69% inhibition was obtained with 20  $\mu$ l of serum from *S. mansoni* infected-mice (24

days after percutaneously infection with 25 cercariae). In contrast, no significant inhibition was observed with sera obtained from mice immunized with empty liposomes.

## DISCUSSION

Reduction of the amount of antigen needed to obtain an immune response is one of the main objectives for the development of synthetic vectors. In this paper, we showed that addition of a bacterial adhesin to liposomes, administered by intranasal route and containing suboptimal dose of a vaccine antigen enhanced specific antibody responses, probably by promoting adherence of liposomes to mucosal tissues.

We have chosen, as model antigen, the Sm28GST which is one of the vaccine candidate selected by WHO against schistosomiasis. This parasitic disease, caused by *Schistosoma mansoni*, affects 200 millions people in tropical regions, and number of studies are in progress to develop a vaccine using this glutathione *S*-transferase of 28 kDa (Riveau and Capron. 1996). Recently, it has been shown that oral immunization with Sm28GST:liposomes (5 mg/ml of Sm28GST used in the rehydration solution) induced both mucosal and systemic anti-Sm28GST antibody responses, and promoted protective activity against *S. mansoni* challenge (Ivanoff *et al.* 1996). An alternative route of mucosal immunization is the intranasal administration of vaccines. This route presents the advantage to be more effective than oral route in terms of antigen dose used (Hirabayashi *et al.* 1990), and to avoid the proteolytic and acidic environment of the stomach. We have then explored the ability of Sm28GST:liposomes to enhance specific immune responses after intranasal administration in mice.

In this paper, we showed that few amount of Sm28GST (until 15 µg of antigen at each instillation) was needed to obtain a weak but significant serum antibody response. We have previously demonstrated that Sm28GST could be detected inside lung tissue during several days after intranasal administration of Sm28GST-liposomes (Ivanoff *et al.* in preparation). Our hypothesis was that most efficient adhesion to the mucosal tissues of the respiratory tract could improve specific immune response. This high efficiency would protect liposomes from degradation, and would enhance their rapid accessibility to specialized immune cells. In this study, we used a filamentous bacterial protein which bears multiple adhesion sites to several types of cells constituting the mucosal tissue of the respiratory tract. FHA: liposomes could then potentially adhere to a large spectrum of cells. We demonstrated that association of FHA to

Sm28GST could increase systemic response to Sm28GST in a dose-dependent manner. These serum antibody responses obtained is Th1/Th2 type mixed with presence of specific IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies. Isotypic anti-Sm28GST profile was not affected by the presence of FHA in liposomes. Intranasal immunisation with Sm28GST recombinant *B. pertussis* has recently shown protective capacity in terms of reduction in worm burden and worm fecundity (22). Mice presenting a similar mixed anti-Sm28GST antibodies profile have been able to undergo *S. mansoni* protection. In addition, anti-Sm28GST antibodies elicited after intranasal administration of FHA:Sm28GST liposomes (containing the highest dose of FHA) were able to efficiently neutralize the Sm28GST enzymatic activity, which has been found to correlate with protection against *S. mansoni* in humans (refs). Our immunization strategies by intranasal administration of FHA:Sm28GST liposomes seems then to be promising in terms of protection towards schistosomiasis infection.

In addition, it will be interesting to analyze epitopic response to Sm28GST in term of peptides since it has already been well studied and has an incidence in term of protection properties (32; 33; 34). The peptidic specificity analysis of sera obtained from mice immunized with liposomes containing Sm28GST alone or with Sm28GST/FHA liposomes could demonstrated whether or not FHA presence is masking Sm28GST epitopes or interfering with the presentation.

Moreover, presence of anti-Sm28GST IgA has been correlated with protection in humans against pathology caused by a massive egg output of *S. mansoni* (Grzych 1993). In this context, vaccination via mucosal immunization would be of interest to promote an IgA response towards Sm28GST. Specific IgA in serum of FHA-Sm28GST liposomes remained low and, one month after intranasal administration, no local antibody response was detected in the BAL fluids. Kinetics of the anti-Sm28GST mucosal antibody response is underway to detect a more precece antibodies production. Optimization of our liposomes preparation to obtain mucosal antibody response against the antigen vectorized could consist in modification of the liposomal charge and/or of the antigen localization in liposomes which has been shown to be crucial in the development of a systemic and/or mucosal response (Aramaki 1994).

In order to elucidate mechanisms of immune enhancement, determination of FHA: liposomes target cells are underway. In addition, use of truncated FHA which do not expressed some of its binding sites could orientate the adhesion of FHA: liposomes to different cells and then modify the immune response obtained. Mutated *B. pertussis* strains expressing truncated forms of FHA have already been designed (27).

Bacterial endotoxins are well-known potentiators of the immune response against a coadministered antigen (ref). In order to verify that the enhancement of anti-Sm28GST antibody response observed with FHA:Sm28GST liposomes was not correlate with LPS contamination of our FHA solution, we immunized mice with liposomes preparation containing FHA where LPS has been eliminated by passage through a polymyxin-Sepharose 4B column (23). No significative variations in serum antibodies production has been noticed, implying that the phenomenon observed is not due to the presence of endotoxins in our immunization samples.

Lipid composition of liposomes can also contribute to modulation of the immune response against antigen vectorized. The major protein component of pulmonary surfactant, which functions to keep the alveoli from collapsing at the end of expiration, is the surfactant protein-A (SP-A) (Weaver *et al.* 1985). It has been shown that SP-A enhances the incorporation of DPPC, which is a phospholipid used for our liposomes fabrication, into lamellar bodies (Tsuzuki *et al.* 1993). This efficient incorporation probably facilitates recycling and reutilization of alveolar surfactant by a process involving macrophages and type II pneumocytes, as it has been described in rabbit (28). Mechanism by which SP-A increases the uptake of DPPC and its incorporation into the secretory organelles in type II cells remains to be elucidated. In this context, we must keep in mind potential modulation in presentation pathways related to optimization of liposome design in terms of lipid composition.

Our strategy could be applied to enhance serum antibody responses against vaccine antigen from other pathogens. This adhesin of *B. pertussis* could also be used in liposomes or in other synthetic vectors. In this context, antibodies production to both Sm28GST and FHA detected in all mice immunized with FHA:Sm28GST liposomes containing the highest dose of FHA is essential in our strategy of optimization towards vaccination. In the same way, the use of non-syngenic mice as model was representative of immunization of individuals with different



genetic background. The analysis of individual serum immune response demonstrated a 100% positivity in mice due to a general enhancement of immune response in all mice. Since all over 40, titers varied in a range from 50 to 2000 between different individuals, demonstrating a statistical enhancement of immune response that can be modulated at individual levels.

We have then demonstrated that addition of FHA to liposomes allowed to reduce the dose of vaccine antigen contained in these liposomes to obtain an immune response after intranasal administration. Evaluation of the efficacy of such a liposome preparation after oral administration is underway. The use of bacterial adhesin like FHA, which presents no adverse effect since this molecule is already present in acellular vaccine against whooping-cough (13, 17), could represent a particular interest for optimization of synthetic vectors since it would allow to reduce the amount of vaccine antigen used.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Christelle Leportier and Mohamed Mekranfar for their technical help.

This work was supported by the European Economy Community No. BIO4CT96-0374

N.M. and F.R. hold a fellowship from the Région Nord-Pas-de-Calais and N.I. from the Association Nationale de la Recherche Technique No. 526/92.

## BIBLIOGRAPHY

1. **Abraham, E.** 1992. Intranasal immunization with bacterial polysaccharide containing liposomes enhances antigen-specific pulmonary secretory antibody response. *Vaccine* **10**: 461-468.
2. **Antoine, R. and C. Locht.** 1990. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect. Immun.* **58**: 1518-1526.
3. **Aramaki, Y., Y. Fujii, K. Yachi, H. Kikuchi, and S. Tsuchiya.** 1994. Activation of systemic and mucosal immune response following nasal administration of liposomes. *Vaccine* **12**: 1241-1245.
4. **Balloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron.** 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**: 3448-3453.
5. **Bangham, A. D., M. M. Standish, and J. C. Watkins.** 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**: 238-252.
6. **Bergquist, N. R.** 1995. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? *Parasitol.Today* **11**: 191-194.
7. **Boulanger, D., A. Warter, F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, F. Audibert, D. Couret, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, R. J. Pierce, J. P. Lecocq, B. Sellin, and A. Capron.** 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase clones from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* **17**: 361-369.
8. **Brownlie, R. M., H. N. Brahmhatt, D. C. White, M. W. Fountain, M. Rohde, J. Wehland, and K. N. Timmis.** 1993. Stimulation of secretory antibodies against *Bordetella pertussis* antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome-incorporated cell-surface antigens. *Microb. Pathog.* **14**: 149-160.
9. **Childers, N. K., F. R. Denys, N. F. McGee, and S. M. Michalek.** 1990. Ultrastructural study of liposome uptake by M cells of rat Peyer's patch: an oral vaccine system for delivery of purified antigen. *Reg. Immunol.* **3**: 8-16.

10. **de Haan, A., H. J. Geerligs, J. P. Huchshorn, G. J. M. van Scharrenburg, A. M. Palache, and J. Wilschut.** 1995. Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. *Vaccine* **13**: 155-162.
11. **Grzych, J. M., D. Grezel, C. B. Xu, J. L. Neyrinck, M. Capron, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and D. Capron.** 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **150**: 527-635.
12. **Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, and A. Sher.** 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **146**: 1322-1327.
13. **Gustafsson, L., H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, and J. Storsaeter.** 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* **334**: 349-355.
14. **Hannah, J. H., F. D. Menozzi, G. Renauld, C. Loch, and M. J. Brennan.** 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* **62**: 5010-5019.
15. **Ishibashi, Y., S. Claus, and D. A. Relman.** 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leucocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **180**: 1225-1233.
16. **Ivanoff, N., N. Phillips, A. M. Schacht, C. Heydari, A. Capron, and G. Riveau.** 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm28kDa glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**: 1123-1131.
17. **Kimura, M.** 1991. Japanese clinical experiences with acellular pertussis vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **73**: 5-9.
18. **Kuroki, Y. and T. Akino.** 1991. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **266**: 3068-3073.
19. **Makhov, A. M., J. H. Hannah, M. J. Brennan, B. L. Trus, E. Kocsis, J. F. Conway, P. T. Wingfield, M. N. Simon, and A. C. Steven.** 1994. Filamentous

hemagglutinin of *Bordetella pertussis* : a bacterial adhesin formed as a 50 nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in  $\beta$ -strands and turns. J. Mol. Biol. **241**: 110-124.

20. **Menzio, F. D., C. Gantiez, and C. Locht.** 1991. Interaction of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. FEMS Microbiol. Lett. **78**: 59-64.

21. **Menzio, F. D., R. Mutombo, G. Renaud, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Locht.** 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. **62**: 769-778.

22. **Mielcarek, N., J. Cornette, A.-M. Schacht, R. Pierce, C. Locht, A. Capron, and G. Riveau.** soumis. Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen.

23. **Morrison, D. C. and D. M. Jacobs.** 1976. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. Immunochem. **13**: 813-818.

24. **Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis, and A. Sher.** 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med. **173**: 159-166.

25. **Phillips, N. C., L. Gagné, N. Ivanoff, and G. Riveau.** 1996. Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens. Vaccine **14**: 898-904.

26. **Poulain-Godefroy, O., S. Gaubert, S. Lafitte, A. Capron, and J. M. Grzych.** 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens. Inf. Imm. **64**: 763-768.

27. **Renaud-Mongé, G., J. Cornette, N. Mielcarek, F. D. Menozzi, and C. Locht.** 1996. Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. bacteriol. **178**: 1053-1060.

28. **Rider, E. D., K. E. Pinkerton, and A. H. Jobe.** 1991. Characterization of rabbit lung lysosomes and their role in surfactant dipalmitoylphosphatidylcholine catabolism. J. Biol. Chem. **266**: 22522-22528.

29. **Roberts, M., I. Cropley, S. Chatfield, and G. Dougan.** 1993. Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine* **11**: 866-872.
30. **Shahin, R. D., D. F. Amsbaugh, and M. F. Leef.** 1992. Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* **60**: 1482-1488.
31. **Trottein, F. M., C. Vaney, B. Bachet, R. J. Pierce, N. Colloc'h, J. P. Lecocq, A. Capron, and J. P. Mormon.** 1992. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.* **224**: 515-518.
32. **Wolowczuk, I., C. Auriault, M. Bossus, D. Boulanger, H. Gras-Masse, C. Mazingue, R. Pierce, D. Grezel, G. D. Reid, A. Tartar, and A. Capron.** 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse and monkey. *J. Immunol.* **146**: 1987-1995.
33. **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.
34. **Xu, C. B., C. Verwaerde, H. Gras-Masse, J. Fontaine, M. Bossus, F. Trottein, I. Wolowczuk, A. Tartar, and A. Capron.** 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.
35. **Zhou, F., J.-P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 1995. Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. *Vaccine* **13**: 637-644.

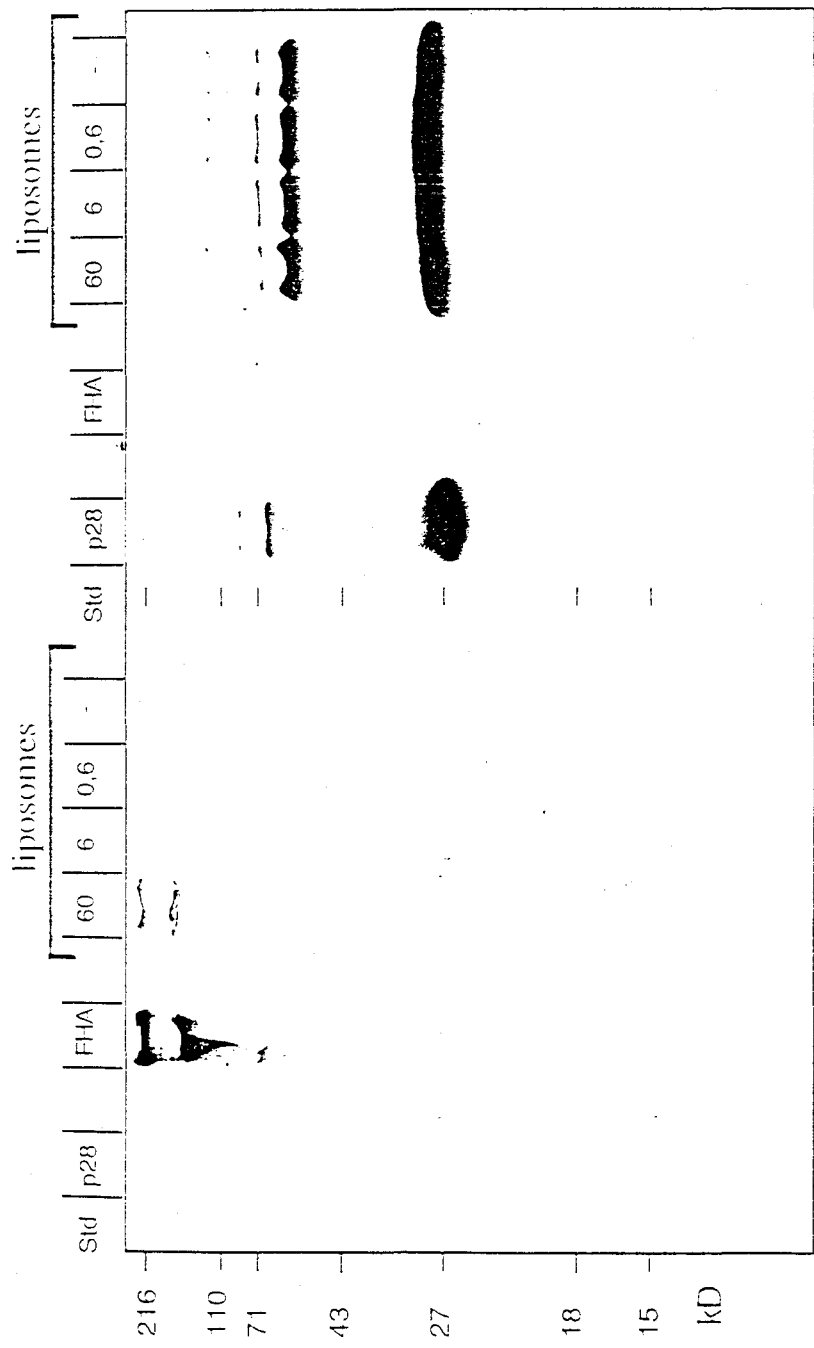
## FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Sm28GST/FHA-liposomes were analyzed by western blot for protein content. 10  $\mu$ l of each liposome suspensions (0.5  $\mu$ mol of phospholipids), prepared with a rehydration solution containing 0.8 mg/ml Sm28GST and respectively 60, 6, 0.6, 0  $\mu$ g/ml FHA, were run on two identical 12% SDS-acrylamide gels; 3  $\mu$ g of free Sm28GST and 1.5  $\mu$ g of free FHA were run as controls. After blotting on nitrocellulose, Sm28GST and FHA were separately revealed using specific rat polyclonal antibodies.

Table 1: Dose-dependent immune response in sera of OF1 mice after nasal administration of Sm28GST-liposomes. Sera were analyzed (pools of 5 animals) 1 and 2 weeks after two intranasal administration of Sm28GST liposomes at two weeks interval. Phospholipids concentration was identical (2 $\mu$ mol each administration) between the different groups. Control group was immunized with the same amount of liposomes reconstituted in PBS. Anti Sm28GST IgG1 and IgG2a levels were evaluated by ELISA assay, and expressed in titer.

Table 2: FHA dose-dependent immune response in sera of OF1 mice after Sm28GST/FHA liposomes. Sera were analyzed (pools of 15 to 16 animals) 2 weeks after two intranasal administration of Sm28GST liposomes at two weeks interval. Liposomes were constituted with constant phospholipids concentration (2 $\mu$ mol each administration) and Sm28GST concentration (40 $\mu$ g each administration) for each group but with different doses of complexed FHA (0, 0.03, 0.3, 3  $\mu$ g each administration). Anti Sm28GST and anti FHA IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgA levels were evaluated by ELISA assay and expressed in titer. Mice in control group were immunized with same volume of PBS.

Table 3: Individual responses of mice immunised intranasally with Sm28GST/FHA liposomes. Sera were analysed individually by an ELISA assay for Sm28GST specific and FHA specific Ig(H+L). Serum response is considered to be positive when titer is higher than 40.



anti-FHA

anti-Sin28GST

5





groups:	number of positive animals	
	for Sm28GST	for FHA
Sm28GST/FHA (40µg; 3 µg)	16/16	16/16
Sm28GST/FHA (40µg; 0,3 µg)	10/16	1/16
Sm28GST/FHA (40µg; 0,03 µg)	5/15	0/15
Sm28GST (40µg)	5/15	0/15
PBS	0/15	0/15

Sm28GST specific antibodies (titer) Mice groups corresponding to different doses of Sm28GST at each instillation	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA
300 µg	228	1062	1090	<40	49
70 µg	191	158	182	<40	<40
15 µg	80	89	<40	<40	<40
0 µg	<40	<40	<40	<40	<40

L'ensemble des propriétés de la FHA (adhésion, sécrétion, immunogénicité) nous a incité à construire des protéines hybrides FHA-protéines hétérologues (en l'occurrence la Sm28GST ou un de ces épitopes majeurs) afin de les présenter aux muqueuses des voies respiratoires par l'intermédiaire de la bactérie *B. pertussis*.

## **II. Construction de souches recombinantes de *B. pertussis* et analyse de la réponse immune induite après administration intranasale.**

### **A. Constructions plasmidiques, expression des protéines hybrides et stabilité plasmidique chez *B. pertussis*.**

Le système efficace de sécrétion de la FHA chez *B. pertussis* a été utilisé afin de faire sécréter un peptide hétérologue par cette bactérie. Le peptide choisi est celui qui correspond à la région C-terminale de la Sm28GST.

Un plasmide recombinant portant la résistance à la kanamycine et contenant la séquence nucléotidique codant pour le peptide en phase avec le cadre de lecture du gène codant pour la Fha44 a donc été construit, et appelé pNJ1. Celui-ci a ensuite été introduit dans la souche BPGR4, dépourvue du gène *fhaB*, de *B. pertussis* par électroporation (cf. annexe technique). Cette souche recombinante a été appelée BPNJ1 (Jacob-Dubuisson, *et al.* 1996). L'analyse du surnageant de culture par Western-blot en utilisant un anticorps polyclonal de rat contre la Fha44 et un anticorps polyclonal de rat contre le peptide 190-211 met en évidence une protéine chimérique Fha44/peptide 190-211 efficacement sécrétée où les deux composés de la protéine hybride gardent leur antigénicité.

Le passage du surnageant de culture de BPNJ1 sur une colonne d'héparine Sépharose montre que la totalité de la protéine hybride est retenue sur colonne (résultats

non présentés).

Afin de déterminer la stabilité de pNJ1 dans la souche BPNJ1 de *B. pertussis*, celle-ci est mise en culture sur milieu solide BG (Bordet-Gengou) en absence d'antibiotiques. Après 4 jours d'incubation à 37°C, 20 colonies isolées sont inoculées dans un milieu liquide SS (Stainer-Scholte) sans ou avec (25 µg/ml) kanamycine. La comparaison du nombre de colonies s'étant multipliées dans le milieu avec kanamycine par rapport à celui dans le milieu sans kanamycine est réalisée après 4 jours de culture à 37°C. Ce nombre étant identique, il semble que le plasmide pNJ1 soit stable *in vitro* chez *B. pertussis*.

La stabilité de ce plasmide a également été évaluée *in vivo*. Des souris OF1 ont été infectées par voie intranasale avec  $5 \times 10^6$  bactéries BPNJ1. Les poumons de 3 souris sont prélevés 3h après injection, puis 7 et 14 jours plus tard. Les poumons sont alors homogénéisés dans 5 ml de PBS stérile, puis les broyats sont étalés sur milieu BG solide avec ou sans kanamycine. Après 4 jours de culture à 37°C, le nombre de bactéries hémolytiques et résistantes à la kanamycine est comparé au nombre de bactéries hémolytiques et sensibles à la kanamycine. Le résultat indique que, dès 7 jours après administration de la souche BPNJ1, environ 95% des bactéries ont perdu la résistance à l'antibiotique et donc le plasmide, les 100% de perte étant atteints à 14 jours.

L'ensemble de ces résultats montrent que le plasmide pNJ1 est stable *in vitro* chez *B. pertussis*, mais perd sa stabilité *in vivo* chez la souris.

Par la suite, il nous faudra donc introduire les différentes constructions dans le génome de *B. pertussis* afin d'obtenir une stabilité d'expression des protéines de fusion.

## **B. Constructions chromosomiques de souches recombinantes de *B. pertussis* exprimant la Sm28GST en fusion avec la FHA.**

Plusieurs souches recombinantes de *B. pertussis* exprimant des protéines hybrides FHA-Sm28GST ont été construites. Pour introduire la construction génétique de façon dirigée au locus chromosomique *fhaB*, une stratégie de double recombinaison homologue est appliquée (cf. annexe technique).

Les fusions génétiques de la Sm28GST sont réalisées dans la région C-terminale immunodominante de la FHA. Une première construction a été réalisée dans laquelle un fragment contenant l'ADNc complet de la Sm28GST muni de son codon de fin de traduction a été fusionné au cadre de lecture du gène *fhaB* de façon à ce que ce cadre soit interrompu

juste derrière l'insertion du gène codant pour la Sm28GST. La souche de *B. pertussis* contenant cette construction est appelée BPGR5. Elle exprime faiblement une protéine hybride qui n'est pas détectée dans le surnageant de culture. Ce résultat confirme le rôle important du domaine C-terminal du précurseur de la FHA dans la sécrétion.

Afin d'exprimer la totalité du précurseur FhaB et favoriser ainsi l'exportation de la protéine de fusion à travers les deux membranes de *B. pertussis*, une autre construction a été réalisée dans laquelle la région 3' du gène codant pour la Sm28GST et contenant le codon stop a été enlevée. Cette souche (BPGR6) exprime une protéine chimérique FHA-Sm28GST qui est présente à la surface de la bactérie et qui est faiblement sécrétée. Cependant, cette protéine est moins bien reconnue par un anticorps anti-Sm28GST que celle produite par la souche BPGR5, peut être parce que la région C-terminale immunodominante de la Sm28GST n'est pas produite avec la souche BPGR6. D'autre part, la meilleure efficacité de la sécrétion de la protéine hybride chez BPGR6, comparée à BPGR5, pourrait être due soit à l'expression de la région C-terminale du précurseur de la FHA, soit à la délétion de la partie C-terminale de la Sm28GST.

Une troisième souche (BPGR60), contenant le gène entier de la Sm28GST, a donc été construite. Une cystéine (en position 140) de la protéine parasite, impliquée dans la dimérisation de la Sm28GST et qui pourrait être un facteur limitant dans l'exportation efficace de la protéine hybride, est remplacée par une sérine. La souche BPGR60 produit une protéine hybride FHA-Sm28GST détectée dans la fraction protéique associée aux cellules mais qui reste faiblement sécrétée. Ce résultat suggère que l'efficacité de la sécrétion de la protéine chimérique dépend davantage de la présence du domaine C-terminal du précurseur de la FHA, plutôt que de la délétion de la région C-terminale de la Sm28GST.

La BPGR60 est également capable de s'autoagglutiner quand les bactéries sont mises en culture dans un milieu liquide SS, indiquant la présence de la protéine FHA/Sm28GST à la surface de la bactérie. D'autre part, contrairement à la souche sauvage BPSM, l'autoagglutination de BPGR60 est observée même en présence de cyclodextrine. La fusion de la Sm28GST à la FHA semble donc réduire la libération de la protéine hybride dans le surnageant de culture.

Après administration intranasale, cette souche colonise le tractus respiratoire des souris de façon similaire à la souche sauvage, ce qui implique que les fonctions biologiques de la FHA ne sont pas altérées chez la souche BPGR60.

Des anticorps (IgA et IgG) dirigés spécifiquement contre la Sm28GST sont détectés dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des souris immunisées intranasalement par la souche recombinante BPGR60, alors qu'aucune réponse n'est décelable dans le sérum, suggérant que la réponse locale est d'origine muqueuse.

Ceci démontre pour la première fois qu'un pathogène recombinant du tractus respiratoire peut induire une réponse immune muqueuse contre un antigène hétérologue et peut ainsi constituer une première étape dans le développement d'un vaccin vivant administré par voie nasale.

L'ensemble des résultats obtenus en collaboration avec G. Renauld-Mongénie est présenté dans l'article intitulé "Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*".

# Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*

(heterologous expression/28-kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase)

GENEVIÈVE RENAULD-MONGÉNIE<sup>†‡§</sup>, NATHALIE MIELCAREK<sup>†</sup>, JOCELYNE CORNETTE<sup>†</sup>, ANNE-MARIE SCHACHT<sup>†</sup>,  
ANDRÉ CAPRON<sup>†</sup>, GILLES RIVEAU<sup>†</sup>, AND CAMILLE LOCHT<sup>†¶</sup>

<sup>†</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U167 and <sup>‡</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U447, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

Communicated by Jean Dausset, Fondation Jean Dausset, Paris, France, April 12, 1996 (received for review November 28, 1995)

**ABSTRACT** Live vaccine vectors are usually very effective and generally elicit immune responses of higher magnitude and longer duration than nonliving vectors. Consequently, much attention has been turned to the engineering of oral pathogens for the delivery of foreign antigens to the gut-associated lymphoid tissues. However, no bacterial vector has yet been designed to specifically take advantage of the nasal route of mucosal vaccination. Herein we describe a genetic system for the expression of heterologous antigens fused to the filamentous hemagglutinin (FHA) in *Bordetella pertussis*. The *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase (Sm28GST) fused to FHA was detected at the cell surface and in the culture supernatants of recombinant *B. pertussis*. The mouse colonization capacity and autoagglutination of the recombinant microorganism were indistinguishable from those of the wild-type strain. In addition, and in contrast to the wild-type strain, a single intranasal administration of the recombinant strain induced both IgA and IgG antibodies against Sm28GST and against FHA in the bronchoalveolar lavage fluids. No anti-Sm28GST antibodies were detected in the serum, strongly suggesting that the observed immune response was of mucosal origin. This demonstrates, to our knowledge, for the first time that recombinant respiratory pathogens can induce mucosal immune responses against heterologous antigens, and this may constitute a first step toward the development of combined live vaccines administrable via the respiratory route.

The mucosal surfaces are the port of entry of most infectious agents and constitute, therefore, the first line of the host defense against many pathogens. Consequently, the mucosal immune system has attracted much attention over the last decade with the aim of developing efficient mucosal vaccine delivery systems. The gut-associated immune system has been most extensively explored, and several oral vaccine vehicles including live vectors, generally derived from oral pathogens, have been developed for the presentation of heterologous antigens (1).

An alternative route of mucosal immunization is the intranasal administration of vaccines. This route presents several advantages over the oral route. It avoids the encounter of the antigens with the acidic and proteolytic environment of the stomach. On a dose basis, nasal administrations appear, therefore, to be more effective than oral administrations (2). Since the respiratory tract is less colonized by commensal microorganisms than the gut, live vaccine vectors will meet less competition to establish themselves. Although there is evidence for the existence of a common mucosal immune system (3), local exposure to an antigen appears to induce higher levels of specific antibodies at site of exposure than at distant

sites (4). Thus, efficient mucosal immunity against respiratory pathogens may be best achieved by the nasal administration of vaccines. While considerable effort has been devoted to the development of live vectors for the colonization of the gastrointestinal tract, no vector has so far been designed to specifically colonize the respiratory tract.

In this study, we explored the potential of *Bordetella pertussis*, the etiologic agent of whooping cough, to serve as a live antigen delivery system for the nasal route, since *B. pertussis* very efficiently colonizes the human respiratory tract. This property is most likely related to the numerous virulence-associated adhesins this organism produces. One of them is the filamentous hemagglutinin (FHA), the major adhesin that expresses at least three distinct binding activities (for review, see ref. 5). FHA is also a potent immunogen, capable of inducing high levels of mucosal and systemic antibodies of long persistence after natural infection in humans (6, 7) or experimental infection in mice (8).

To assess whether the intranasal administration of recombinant *B. pertussis* can induce a mucosal immune response against heterologous antigens, we chose the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase (Sm28GST) as a model antigen and genetically fused it to FHA. The gene encoding this antigen has been cloned and sequenced (9), and protection in humans against the pathology caused by a massive egg output of *S. mansoni* has been correlated with the presence of IgA antibodies against Sm28GST (10). Immunogenicity of the Sm28GST coupled to fragment C of tetanus toxin produced in a live attenuated *Salmonella* vaccine strain has been recently demonstrated after oral immunization (11), whereas oral or nasal administration of purified Sm28GST alone did not induce a significant immune response. In addition, the respiratory tract may represent an important site of elimination of schistosomulae (12), since the life cycle of *S. mansoni* has an important lung stage. For these reasons, we felt that Sm28GST was a good model antigen, and herein we demonstrate that a genetic fusion of Sm28GST to FHA is capable of inducing specific IgA and IgG in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) after a single intranasal administration of recombinant *B. pertussis*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial Strains, Plasmids, Growth Conditions, and DNA Manipulations.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All *B. pertussis* strains were grown at 36°C on Bordet-Gengou agar (18) supplemented with 1%

Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluids; cfu, colony-forming unit(s); FHA, filamentous hemagglutinin; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; Sm28GST, *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase.

<sup>§</sup>Present address: Pasteur-Mérieux-Connaught, 1541 av. Marcel Mérieux, F-69280 Marcy-l'Étoile, France.

<sup>¶</sup>To whom reprint requests should be addressed.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.



Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/plasmid	Relevant phenotype/genotype	Source/ref.
<b>Strains</b>		
<i>B. pertussis</i>		
BPSM	Tohama I-derivative, resistant to streptomycin and nalidixic acid	13
BPGR4	<i>fhaB</i> deletion mutant	14
BPGR5	BPSM-derivative with entire Sm28GST fused with FHA	This study
BPGR6	BPSM-derivative with truncated Sm28GST fused to FHA	This study
BPGR60	BPSM-derivative with entire modified Sm28GST fused to FHA	This study
<i>E. coli</i>		
JM109	e14 <sup>-</sup> ( <i>mcrA</i> ), $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk<sup>-</sup>mk<sup>-</sup></i> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , [F' <i>traD36</i> , <i>lacIq</i> $\Delta$ <i>M15</i> , <i>proAB</i> ]	Stratagene
S17-1	<i>pro</i> , <i>hdsR</i> , <i>res</i> , <i>mod</i> , <i>recA</i> . RP4-2Tc::Mu. Km::Tn7	15
<b>Plasmids</b>		
pRIT13202	<i>EcoRI</i> fragment of <i>fhaB</i> in pUC8	16
pUC8-A	<i>BglII</i> Sm28GST fragment (0.68 kb) in pRIT13202	This study
pUC8-F	<i>BglII</i> - <i>BclI</i> Sm28GST fragment (0.5 kb) in pRIT13202 deleted of its 0.1-kb <i>BglII</i> - <i>BclI</i> fragment	This study
pUC7-28	<i>BamHI</i> Sm28GST fragment (0.64 kb) in pUC7	This study
pUC7-28*	<i>PstI</i> - <i>SalI</i> mutagenized Sm28GST fragment (0.28 kb) in pUC7-28	This study
pUC8-928*	<i>BamHI</i> Sm28GST fragment (0.64 kb) of pUC7-28* in pRIT13202	This study
pGR5	5' end of <i>bvgA/S</i> and 3' end of <i>fhaB</i> in pSS1129	14
pGR53	<i>EcoRI</i> fragment of pUC8-A in pGR5	This study
pGR54	<i>EcoRI</i> fragment of pUC8-F in pGR5	This study
pGR540	<i>EcoRI</i> fragment of pUC8-928* in pGR5	This study

glycerol and 20% defibrinated sheep blood (BG) or in modified Stainer-Scholte medium containing 2,6-*O*-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin at 1 g/liter (19, 20). Antibiotics were used at the following concentrations: streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; gentamycin, 10  $\mu$ g/ml. *Escherichia coli* strains were grown in LB broth (21), and antibiotic-resistant *E. coli* strains were selected with ampicillin (100  $\mu$ g/ml) and/or gentamycin (25  $\mu$ g/ml).

Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and other DNA modifying enzymes were purchased from Boehringer Mannheim, New England Biolabs, or Amersham and were used as recommended by the suppliers. All DNA manipulations were performed under standard conditions as described by Sambrook *et al.* (21). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed on a Perkin-Elmer thermal cycler model 480. Chromosomal DNA was isolated from *B. pertussis* as described by Hull *et al.* (22). Southern blot analyses were performed using nonradioactive DNA probes labeled with digoxigenin-dUTP according to the instructions of the supplier (Boehringer Mannheim).

**Construction of Recombinant *B. pertussis* Strains.** To construct *B. pertussis* BPGR5, a 0.68-kb fragment harboring the Sm28GST-encoding cDNA was amplified by PCR from TG10 (R. J. Pierce, personal communication) using the oligonucle-

otides 5'-TAAGATCTCCATGGCTGGCGAGCAT-3' and 5'-TAAGATCTCCGAGCTTTCTGTTG-3', digested with *BglII*, and cloned into the *BglII* site of *fhaB* in pRIT13202 (16) to yield pUC8-A. The 10.68-kb *EcoRI* fragment from pUC8-A was then inserted into the *EcoRI* site of pGR5, a pSS1129-derivative harboring the 5' and 3' *fhaB* flanking regions (14). The resulting plasmid, named pGR53, was transferred into *E. coli* S17-1 (15). This strain was then conjugated with *B. pertussis* BPGR4, a strain lacking *fhaB*, and two successive homologous recombination events were selected as described (14). The *B. pertussis* exconjugant strains were then screened by colony blot hybridization with a probe corresponding to the 0.68-kb *BglII* fragment harboring the Sm28GST cDNA. One of the positive clones was further examined by Southern blot analysis to ensure that the hybrid gene was correctly inserted into the *fhaB* locus. This strain was named BPGR5.

To construct *B. pertussis* BPGR6, the above described PCR fragment was digested with *BglII* and *BclI*, and the resulting 0.5-kb fragment was inserted into pRIT13202 digested with *BglII* and *BclI* to yield pUC8-F. The 10.4-kb *EcoRI* fragment was then isolated from pUC8-F and cloned into the *EcoRI* site of pGR5. The resulting plasmid was named pGR54 and introduced by conjugation into *B. pertussis* BPGR4 via *E. coli* S17-1, as described above.

To construct *B. pertussis* BPGR60, the Sm28GST cDNA was first mutagenized to replace the TGC triplet coding for Cys-140 by AGC coding for Ser. To mutagenize this TGC triplet, the Sm28GST cDNA was amplified by PCR using the oligonucleotides 5'-TAAGGATCCCCATGGCTGGCGAGCATATCAAG-3' and 5'-CCTGTGCGACCCTTTCAGAGATTTCGCTGATCATATTGAG-3'. The amplified DNA fragment was then digested with *PstI* and *SalI*, and the resulting 0.28-kb fragment was used to replace the 0.28-kb *PstI*-*SalI* fragment of pUC7-28, a pUC7-derivative containing the Sm28GST cDNA as a 0.64-kb *BamHI* fragment. This fragment was generated by PCR using the oligonucleotides 5'-TAAGGATCCCCATGGCTGGCGAGCATATCAAG-3' and 5'-TAAGGATCCCGAAGGGAGT-TGCAGGCCTGTT-3'. The entire DNA insert was then sequenced to ensure that the TGC triplet was replaced by AGC, as expected, and that no other alteration had occurred. The 0.64-kb *BamHI* fragment isolated from the resulting plasmid was inserted into the *BglII* site of pRIT13202 to generate pUC8-928\*. The 10.64-kb *EcoRI* fragment was then isolated from pUC8-928\* and inserted into the *EcoRI* site of pGR5, yielding pGR540. The latter plasmid was introduced into *B. pertussis* BPGR4 by conjugation via *E. coli* S17-1, as described above.

**Protein Techniques.** For the detection of the FHA-Sm28GST hybrid proteins, the culture supernatants or whole cell lysates of the various *B. pertussis* strains were examined by SDS/polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels as described by Laemmli (23) and by immunoblot analysis using anti-FHA monoclonal antibody 12.1.F9 as described by Delisse-Gathoye *et al.* (16) or anti-Sm28GST rabbit polyclonal antibodies, provided by F. Trottein (Institut Pasteur de Lille) at a 1:200 dilution. The FHA-Sm28GST hybrid proteins were purified from culture supernatants by heparin-Sepharose chromatography as described (24).

***B. pertussis* Colonization of the Mouse Respiratory Tract.** The mouse colonization assay was adapted from the method described by Guiso and Khelef (25). Briefly, *B. pertussis* BPSM or BPGR60 were grown for 48 h at 36°C on BG agar supplemented with streptomycin. The bacteria were then scraped off the plates and resuspended in PBS at 10<sup>8</sup> colony-forming units (cfu)/ml. Twenty-five microliters (2.5  $\times$  10<sup>6</sup> cfu) of this bacterial suspension was then instilled into each nostril of 4-week-old female OF1 mice under anesthesia. Infected mice were sacrificed by cervical dislocation 3 h after intranasal injection (time 0) or at indicated time points (weeks 1-5). Four

to seven mice were analyzed per time point. The lungs of the sacrificed mice were removed and homogenized individually in phosphate-buffered saline (PBS) using tissue grinders. Serial dilutions of the lung homogenates were then plated onto BG agar supplemented with streptomycin, and cfu were counted after 3–5 days of incubation at 36°C.

**Analysis of Mucosal Antibody Responses.** After intranasal administration of *B. pertussis* BPGR60, as described above, IgA and IgG responses were analyzed in the BALF using enzyme-linked immunosorbent assays at the indicated time points. Immulon 3 flat-bottom 96-well plates (Dynatech) were coated with 50  $\mu$ l of PBS containing FHA (10  $\mu$ g/ml) or recombinant Sm28GST (0.625  $\mu$ g/ml), provided by Transgene (Strasbourg, France). After blocking with 0.5% gelatin (Sigma) and washing with PBS, 50  $\mu$ l of BALF was added in 1:2 serial dilutions in PBS. The plates were incubated at 37°C and washed, and biotinylated goat anti-IgA or anti-IgE antibodies (Amersham) or peroxidase-conjugated goat anti-IgG antibodies (Pasteur Diagnostic, Marne la Coquette, France) were added at a 1:1000 and 1:10,000 dilution, respectively. Anti-IgA and anti-IgE were detected by the addition of peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham) at a 1:2000 dilution, and *o*-phenylene diamine (Sigma) (1 mg/ml) in 0.1 M citrate buffer (pH 5.5) containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped by the addition of 2 M HCl, and the absorbance was measured at 492 nm using a Titertek Multiskan MCC microplate reader (Labsystems Group, Les Ulis, France). The concentrations of total and specific IgA and IgG antibodies were estimated by comparison to standard curves established with known amounts of antibodies. The results are expressed as the mean values for each time point.

## RESULTS

**Construction of Recombinant *B. pertussis* Strains Producing FHA–Sm28GST Hybrid Proteins.** The unique *Bgl*II site in *fhaB*, the structural FHA gene, was used for the fusion of the Sm28GST coding sequence. This site is located at approximately two-thirds of the FHA coding sequence as indicated in Fig. 1a. The 220-kDa mature form of FHA is encoded by the 5' two-thirds of *fhaB* (16). A genetic fusion at the *Bgl*II site, therefore, generates a hybrid molecule containing most of the mature FHA followed by Sm28GST. Translation of this hybrid gene in BPGR5 terminates at the Sm28GST stop codon (Fig. 1b), and the corresponding chimeric protein is, therefore, composed of the first 1942 amino acid residues of mature FHA followed by a Ser and the 211 Sm28GST residues, including its initiation Met.

Western blot analyses of whole cell extracts using anti-FHA monoclonal antibody 12.1.F9 (Fig. 2A, lane 3) and anti-Sm28GST polyclonal antibodies (Fig. 2B, lane 5) showed that the hybrid protein was produced in *B. pertussis* BPGR5 and also revealed several proteolytic breakdown products. Analyses of the culture supernatant of BPGR5 did not allow detection of the hybrid protein (Fig. 2B, lane 2), suggesting that it was not efficiently secreted.

Since in BPGR5 the translation of the hybrid gene terminates at the Sm28GST stop codon, the C-terminal end of the FHA precursor is not produced. Although this domain is not present in mature FHA, it is important for FHA biogenesis (26). We therefore constructed *B. pertussis* BPGR6. This strain contains the FHA–Sm28GST hybrid gene engineered such that its translation terminates at the stop codon of the FHA precursor (Fig. 1c). The corresponding chimeric protein is similar to that encoded by BPGR5, except that only the first 168 Sm28GST residues are fused to the 1942 FHA residues and that the *fhaB* open reading frame continues after codon 1976, which is spliced downstream of the Sm28GST-encoding DNA.

Immunoblot analyses of whole cell extracts of *B. pertussis* BPGR6 revealed polypeptides that react with both the anti-FHA (Fig. 2A, lane 4) and anti-Sm28GST antibodies (Fig. 2B,

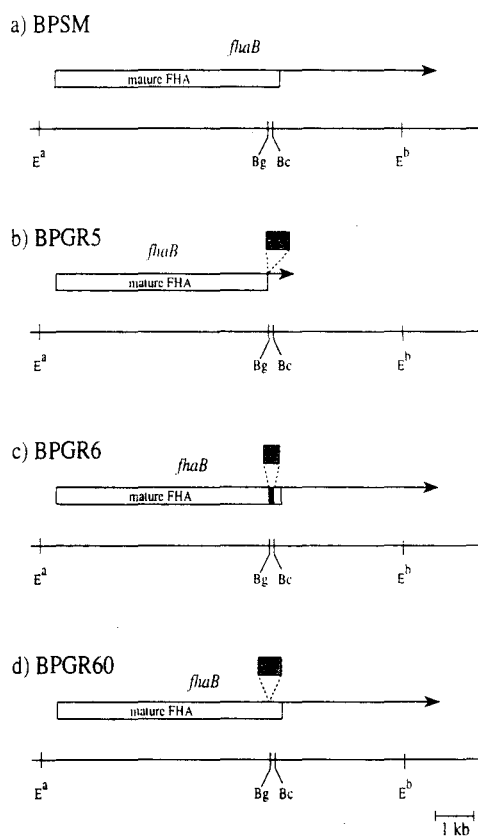


Fig. 1. Physical map of the *fhaB* locus in the various *B. pertussis* strains. The arrow represents the length and direction of the various *fhaB* open reading frames. (a) BPSM contains the wild-type *fhaB* locus coding for a 370-kDa precursor protein indicated by the arrow that includes the 220-kDa mature form indicated by the open box. (b) BPGR5 contains the hybrid gene in the *fhaB* locus with the Sm28GST coding sequence (indicated by the stippled box) inserted at the *Bgl*II site. (c) BPGR6 contains a truncated Sm28GST sequence (stippled box) inserted between the *Bgl*II and *Bcl*I sites of the *fhaB* locus. The small solid box depicts the resulting truncation in *fhaB*. (d) BPGR60 contains the entire modified Sm28GST coding sequence (stippled box) cloned at the *Bgl*II site and containing the TGC to AGC triplet mutation. Bc, *Bcl*I; Bg, *Bgl*II; E<sup>a</sup>, first *Eco*RI site; E<sup>b</sup>, second *Eco*RI site.

lane 4). This FHA–Sm28GST hybrid protein reacted less well with the anti-Sm28GST antibodies than that produced by *B. pertussis* BPGR5, presumably because the C-terminal region of Sm28GST was deleted in BPGR6. This region is known to contain immunodominant epitopes (17). However, in contrast to BPGR5, the hybrid protein could be detected in culture supernatants of BPGR6 after concentration by heparin-Sepharose chromatography (Fig. 2B, lane 1). This observation suggests that the chimeric protein was secreted from *B. pertussis* BPGR6 and associated with the cell surface. The improved secretion in BPGR6 compared with BPGR5 may be due to the expression of the C-terminal domain of the FHA precursor. Alternatively, it could be related to the deletion of the C-terminal end of Sm28GST.

To distinguish between these two possibilities, we constructed BPGR60. In this strain the entire Sm28GST gene was expressed in frame with *fhaB*, such that the hybrid gene was expressed to produce the full-length precursor of FHA (Fig. 1d). The corresponding open reading frame codes, therefore, for the 1942 first residues of mature FHA, followed by Pro, the 211 Sm28GST residues, Gly, and residues 1942–3520 of the FHA precursor. In addition, Cys-140 of Sm28GST was replaced by Ser, because this Cys may induce dimerization of Sm28GST by interchain disulfide bond formation (27) that

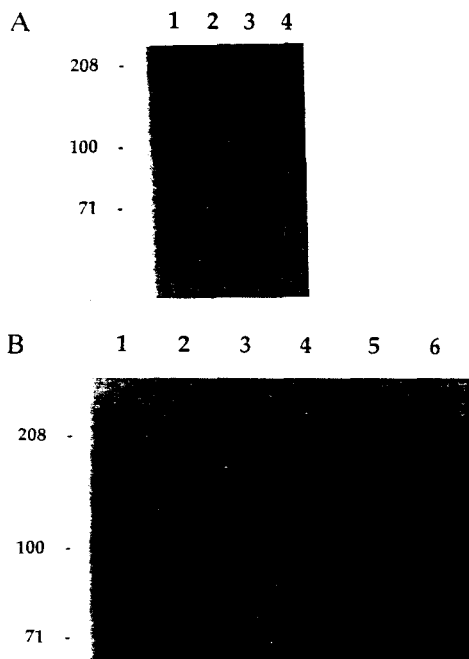


FIG. 2. Immunoblot analyses of *B. pertussis* BPSM, BPGR4, BPGR5, and BPGR6. (A) Whole cell lysates of BPSM (lane 1), BPGR4 (lane 2), BPGR5 (lane 3), and BPGR6 (lane 4) were examined by immunoblot analysis using anti-FHA monoclonal antibody 12.1.F9. (B) Heparin-Sepharose-purified culture supernatants (lanes 1–3) or whole cell lysates (lanes 4–6) of BPGR6 (lanes 1 and 4), BPGR5 (lanes 2 and 5), and BPSM (lanes 3 and 6) were examined by immunoblot analysis using rabbit anti-Sm28GST polyclonal antibodies. The sizes of the molecular mass markers expressed in kDa are given to the left.

may hamper secretion through the outer membrane, as has been shown for other systems (28, 29).

As shown in Fig. 3 lane 2, this hybrid protein was readily detected in whole cell extracts of *B. pertussis* BPGR60 using anti-Sm28GST antibodies. When the culture supernatant was concentrated by heparin-Sepharose chromatography, the se-

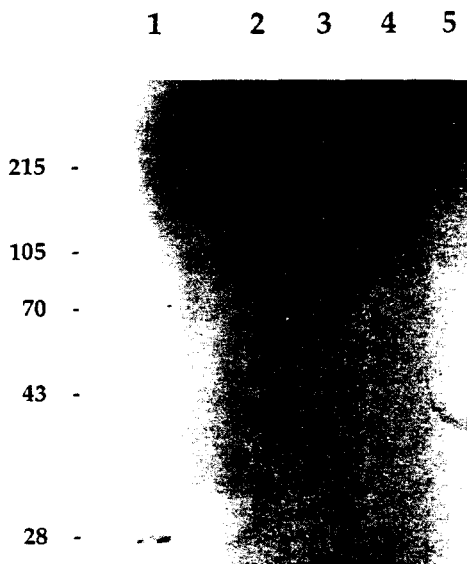


FIG. 3. Immunoblot analysis of *B. pertussis* BPSM and BPGR60. Whole cell extracts (lanes 2 and 4) and culture supernatants (lanes 3 and 5) of BPGR60 (lanes 2 and 3) and BPSM (lanes 4 and 5) were examined by immunoblot analysis using rabbit anti-Sm28GST polyclonal antibodies. Lane 1 contains purified recombinant Sm28GST. The sizes of the molecular mass markers expressed in kDa are given to the left.

creted FHA-Sm28GST hybrid protein was detected by both anti-FHA and anti-Sm28GST antibodies, indicating that it was secreted. This suggests that the addition of the C-terminal domain of the FHA precursor rather than the deletion of the C-terminal end of Sm28GST allows for secretion of the chimera into the culture supernatant. However, compared with native FHA from *B. pertussis* BPSM, the secretion of the hybrid protein appeared to be less efficient and was not detected in unconcentrated culture supernatants with the anti-Sm28GST antibodies (Fig. 3, lane 3).

**Surface Exposure of FHA-Sm28GST.** To determine whether the cell-associated hybrid proteins were surface exposed, we used the autoagglutination phenotype of the recombinant *B. pertussis* strains. Menozzi *et al.* (30) have shown that surface exposure of FHA resulted in autoagglutination of *B. pertussis* when grown in the presence and absence of cyclodextrin. We therefore grew BPGR60 in the presence and absence of cyclodextrin. Macroscopical analysis of the culture revealed autoagglutination of BPGR60, indicating that a significant fraction of the FHA-Sm28GST hybrid protein was surface-exposed in this strain. However, in contrast to the nonrecombinant BPSM strain, autoagglutination of BPGR60 was observed regardless of the presence of cyclodextrin, indicating that the fusion of Sm28GST to FHA affected its release into the culture supernatant.

**Colonization by *B. pertussis* BPGR60.** Kimura *et al.* (31) and Relman *et al.* (32) have demonstrated the crucial role of FHA in colonization of the respiratory tract. Intranasal infection experiments were, therefore, performed in mice to study the ability of *B. pertussis* BPGR60 to colonize the respiratory tract. A suspension containing  $5 \times 10^6$  BPGR60 or BPSM was administered intranasally to OF1 mice. At 1-week intervals ranging from 0 to 5 weeks after the infection, groups of seven mice were sacrificed, and the total cfu in the lung homogenates were measured. As shown in Fig. 4, the total number of cfu in the lungs of the mice infected by BPGR60 increased during the first week after the infection and then decreased steadily over the next 4 weeks until the majority of bacteria were eliminated. The colonization kinetics of *B. pertussis* BPGR60 was very similar to that of the wild-type strain BPSM (Fig. 4) and was consistent with results obtained by Guiso and Khelef (25). These observations indicate that *B. pertussis* BPGR60 possesses *in vivo* growth rates and colonization abilities similar to those of wild-type *B. pertussis* BPSM, implying that the biological functions of FHA are preserved in BPGR60.

**Secretory Immune Responses After Infection with *B. pertussis* BPGR60.** As shown in Table 2, a single nasal administration of  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPGR60 induced a marked

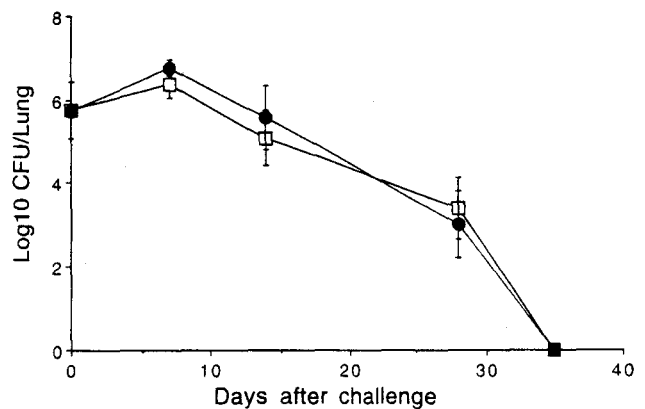


FIG. 4. Colonization by *B. pertussis* BPGR60 and BPSM. OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  cfu of *B. pertussis* BPGR60 (solid circles) or BPSM (open squares). The lungs were harvested at the time points indicated, and total cfu were counted after plating the lung homogenates on BG agar.

increase in total IgA and IgG in BALF after 4 weeks. The elevated levels remained constant at least until day 49. Specific anti-Sm28GST IgA antibodies in BALF were detectable at day 28 and increased gradually until day 42. This was paralleled by the anti-FHA IgA in BALF. However, although we observed a significant drop in the level of anti-Sm28GST IgA at day 49, the anti-FHA IgA levels remained constant. No anti-Sm28GST IgA was detected in mice that received *B. pertussis* BPSM or up to 100  $\mu\text{g}$  of recombinant Sm28GST, whereas high anti-FHA IgA levels were found in BPSM-infected mice.

Specific anti-FHA and anti-Sm28GST IgG were also found in BALF of mice infected with BPGR60, albeit at lower levels than IgA. The total and specific IgE responses in BALF were also investigated. A weak increase of total IgE was observed 35 days after administration, but we were unable to detect specific IgE directed against Sm28GST or FHA. Analyses of serum antibodies in the same mice indicated no detectable levels of anti-Sm28GST IgG and IgA, although anti-FHA IgG and IgA were detected 42 and 49 days after administration of BPGR60.

These results show that a single nasal administration of *B. pertussis* BPGR60 was able to induce the production of anti-Sm28GST IgA and IgG in the BALF, even in the absence of detectable levels of anti-Sm28GST antibodies in the serum.

## DISCUSSION

Mucosal immunization offers several important advantages over parenteral immunization. They include higher efficacy to achieve both mucosal and systemic immunity, minimization of adverse effects, ease of delivery, less interference with maternal antibodies in infants, and perhaps increased effectiveness in the elderly (33). Yet, the vast majority of vaccines are usually administered parenterally. This may be related to the fact that many antigens are poorly immunogenic when given by the mucosal route (34) probably because they fail to interact productively with the mucosa-associated lymphoid tissues (MALT).

Notable exceptions are microorganisms that colonize mucosal surfaces. They are believed to prolong the mucosal exposure of the antigens and thereby to increase the net antigen dose delivered to the MALT. Much attention has been turned to the development of live bacteria, such as *Salmonella typhi*, for the presentation of foreign antigens to the MALT by oral immunization (1). However, oral immunization is complicated by the acidic and proteolytic environment that the vaccines encounter, as well as by the large volumes that are usually required to induce a detectable immune response. Mucosal immunization against typhoid fever requires multiple large doses of *Salmonella typhi* Ty21a, the only licenced live oral vaccine against bacterial diseases.

An interesting alternative to oral vaccines are vaccines that can be delivered by the nasal route. Nasal vaccination against influenza has been successful even in children (35). In addition, nasal administration appears to be significantly more efficacious in inducing antibody responses than oral inoculation, when compared on a dose basis (2). However, although several enteric pathogens have been assessed for their ability to deliver heterologous antigens via the oral route, so far no

microorganism that specifically colonizes the respiratory tract has been investigated in that respect.

The members of the genus *Bordetella* are known to very effectively colonize the upper respiratory tract of their hosts. In this study, we show, to our knowledge, for the first time that a single nasal administration of a recombinant *B. pertussis* strain induces a significant mucosal antibody response against the foreign antigen. A genetic fusion of Sm28GST to the C-terminal region of the mature form of the FHA resulted in a hybrid protein that was surface-exposed on *B. pertussis* BPGR60 and, to a lesser degree than natural FHA, partially secreted into the extracellular milieu. Secretion of the chimeric antigen required the expression of the entire *phaB* gene, including the part that encodes the C-terminal domain of the precursor, which is cleaved off during FHA biosynthesis. Unlike in most live bacterial vectors, where the heterologous genes are expressed from plasmids, this system is based on the integration of the hybrid genes into the bacterial chromosome, thereby stabilizing the constructs even in the absence of selective pressure. A construction that contains the stop codon of the Sm28GST cDNA (*B. pertussis* BPGR5) and, therefore, does not translate the 3' end of *phaB* does not appear to secrete the hybrid protein. This observation confirms previous conclusions regarding the importance of the C-terminal domain of the FHA precursor in the secretion of FHA (26).

Although *B. pertussis* BPGR60 was found to secrete some of the chimeric protein, the secretion level was significantly lower than that of natural FHA. This relatively low level of secretion was independent of the position of the Sm28GST cDNA insertion within the *phaB* gene (unpublished observations) and may, therefore, be related to the intrinsic secretion property of Sm28GST, which has generally proven difficult to secrete in heterologous expression systems (e.g., ref. 36). Therefore, it is anticipated that antigens that naturally cross at least one biological membrane should be secreted at higher levels when genetically fused to FHA.

Nevertheless, nasal administration of *B. pertussis* BPGR60 induced an antibody response against Sm28GST in the BALF, whereas the nonrecombinant isogenic strain BPSM or intranasal inoculation of up to 100  $\mu\text{g}$  of recombinant purified Sm28GST did not. The absence of detectable levels of anti-Sm28GST antibodies in the serum of *B. pertussis* BPGR60-infected mice suggests that the observed antibody response is of mucosal origin. Since the life cycle of *S. mansoni* involves migration to the lungs, the respiratory tract may be one of the sites for immunoprotection against schistosomiasis (12). In addition, the production of anti-Sm28GST IgA has been correlated with protection against egg-induced pathology in humans (10). Therefore, intranasal vaccination against *S. mansoni* may have an impact on parasitemia and on pathology. Preliminary results indicate that infection with *B. pertussis* BPGR60 indeed causes significant reduction in both worm burden and egg output (unpublished observations).

The colonization ability of *B. pertussis* BPGR60 was indistinguishable from that of the isogenic wild-type strain, implying that the biological activities of FHA are preserved in this strain. It is likely that the colonization ability of *B. pertussis* is responsible for the induction of the observed immune re-

Table 2. IgA and IgG levels in BALF after nasal administration of BPGR60

	Day 0	Day 28	Day 35	Day 42	Day 49
Total IgA, $\mu\text{g}/\text{ml}$	110 $\pm$ 27	816 $\pm$ 37*	780 $\pm$ 39*	770 $\pm$ 22*	771 $\pm$ 25*
Total IgG, $\mu\text{g}/\text{ml}$	19	132	162	182	136
Anti-Sm28GST IgA, ng/ml	ND	730 $\pm$ 177	985 $\pm$ 637	1157 $\pm$ 615	579 $\pm$ 51
Anti-Sm28GST IgG, ng/ml	ND	69 $\pm$ 48	79 $\pm$ 32	129 $\pm$ 58	78 $\pm$ 42
Anti-FHA IgA, ng/ml	ND	997 $\pm$ 284	1744 $\pm$ 749	14,244 $\pm$ 6428	13,551 $\pm$ 6064
Anti-FHA IgG, ng/ml	ND	202 $\pm$ 54	379 $\pm$ 89	664 $\pm$ 399	529 $\pm$ 326

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of BALF from five mice per time point. Total IgG levels have been evaluated in pooled BALF. ND, not detectable. \*,  $P < 0.001$ , indicates a significant increase compared to day 0.

sponse. For other systems it has been proposed that the induction of mucosal immunity via the nasal route depends on the amount of antigen reaching the MALT beyond the nasal cavity (37). Since *B. pertussis* is known to colonize the trachea, BPGR60 most likely carries Sm28GST to the trachea-associated lymphoid tissues. One would expect that higher levels of immune responses might be achieved when better secreted antigens are fused to FHA. This is currently being tested in our laboratory.

Heterologous antigens genetically fused to FHA may also benefit from the various binding activities expressed by FHA (for review, see ref. 5), which include binding to alveolar macrophages via a RGD sequence (38, 39). Although it remains to be investigated whether this RGD sequence or other FHA binding activities play a role in antigen presentation by *B. pertussis*, targeting antigens to mononuclear phagocytes including macrophages would be expected to improve antigen presentation to the T helper cells and hence to facilitate the development of antibody responses. On the other hand, alveolar macrophages have been shown to suppress immune responses in rodents (40, 41). It will therefore be interesting to investigate whether *B. pertussis*, perhaps via binding by FHA, is able to inhibit this suppression.

Although the use of *B. pertussis* as a live vaccine carrier is not directly applicable in the field because of the inherent virulence of this microorganism, it is now feasible to genetically attenuate this organism. Over the past decade many *B. pertussis* virulence genes have been cloned, and the molecular mechanisms of pertussis pathogenesis are beginning to be well understood (42). Attenuated *B. pertussis* strains can thus be developed by the allelic exchange of one or several virulence genes with mutant genes. In addition, genetic attenuation has already been achieved by the development of *aroA* mutants of *B. pertussis* that have been shown to induce protective immunity against challenge with a virulent strain (43).

Live recombinant *B. pertussis* may be particularly interesting for the presentation of antigens to protect against respiratory pathogens. However, since B cells stimulated at one mucosal site can migrate to distal mucosal sites presentation of antigens by *B. pertussis* may also be useful for the production of IgA at sites other than the respiratory tract. In addition, as new vaccines are being developed and immunization schedules become more complex, the use of recombinant bacteria offers the opportunity to combine several protective antigens within the same carrier organism and thereby increases considerably the probability to provide complete coverage of populations to be vaccinated.

We thank A. Mercenier for *E. coli* S17-1 strain, R. J. Pierce for TG10, J. Kusnierz for oligonucleotides synthesis, I. Heron for anti-FHA antibodies, F. Trottein for anti-Sm28GST antibodies, and E. Fort for photography. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Institut Pasteur de Lille, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, and the Région Nord Pas-de-Calais and the European Community Biotech program (BIO2CT-CT930111). G.R.-M. holds a fellowship of the Fondation Marcel Mérieux, and N.M. holds one from the Région Nord Pas-de-Calais. 2,6-*O*-Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin was a generous gift from H. Ikeda (Teijin Ltd., Tokyo).

- Cardenas, L. & Clements, J. D. (1992) *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 328-342.
- Hirabayashi, Y., Kurata, H., Funato, H., Nagamine, T., Aizawa, C. & Kurata, T. (1990) *Vaccine* **8**, 243-248.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M. & Kiyono, H. (1992) *Vaccine* **10**, 75-88.
- Haneberg, B., Kendall, D., Amerongen, H. M., Apter, F. M., Kraehenbuhl, J.-P. & Neutra, M. R. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 15-23.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F. & Renauld, G. (1993) *Mol. Microbiol.* **9**, 653-660.
- Zackrisson, G., Arminjon, F., Krantz, I., Lagergard, T., Sigurs, N., Taranger, J. & Trollfors, B. (1988) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 764-770.
- Zackrisson, G., Lagergard, T., Trollfors, B. & Krantz, I. (1990) *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1502-1505.
- Amsbaugh, D. F., Li, Z.-M. & Sahin, R. D. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 1447-1452.
- Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvallo, D., Lecocq, J. P. & Capron, A. (1987) *Nature (London)* **326**, 149-153.
- Grzych, J.-M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J.-L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. & Capron, A. (1993) *J. Immunol.* **150**, 527-535.
- Kahn, C. M. A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Riveau, G., de Hormaeche, R. D., McNeill, H. Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G. & Hormaeche, C. E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11261-11265.
- Wilson, R. A., Coulson, P. S. & Dixon, B. (1986) *Parasitology* **92**, 101-106.
- Menozzi, F. D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J. H., Leininger, E., Brennan, M. J. & Loch, C. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 769-778.
- Locht, C., Geoffroy, M.-C. & Renauld, G. (1992) *EMBO J.* **11**, 3175-3183.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983) *BioTechnology* **1**, 784-791.
- Delisse-Gathoye, A.-M., Loch, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J.-L., de Wilde, M. & Cabezon, T. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 2895-2905.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R. J., Grezel, D., Reid, G. D. F., Tartar, A. & Capron, A. (1991) *J. Immunol.* **146**, 1987-1995.
- Bordet, J. & Gengou, O. (1906) *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **20**, 731-741.
- Stainer, D. W. & Scholte, M. J. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **63**, 211-220.
- Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. & Sato, Y. (1983) *Infect. Immun.* **41**, 1138-1143.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).
- Hull, R. A., Gill, R. E., Hsu, P., Minshew, B. H. & Falkow, S. (1981) *Infect. Immun.* **33**, 933-938.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Menozzi, F. D., Gantiez, C. & Loch, C. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* **78**, 59-64.
- Guiso, N. & Khelef, N. (1992) *Zbl. Bakt. Suppl.* **23**, 263-271.
- Renauld-Mongénie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F. D. & Loch, C. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1053-1060.
- Trottein, F., Vaney, M.-C., Bachet, B., Pierce, R. J., Colloch, N., Lecocq, J.-P., Capron, A. & Mormon, J.-P. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 515-518.
- Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1990) *EMBO J.* **9**, 1991-1999.
- Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1992) *EMBO J.* **11**, 2327-2335.
- Menozzi, F. D., Boucher, P. E., Mutombo, R., Gantiez, C., Riveau, G. & Loch, C. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 4261-4269.
- Kimura, A., Mountzouros, K. T., Relman, D. A., Falkow, S. & Cowell, J. L. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 7-16.
- Relman, D. A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R. & Falkow, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2637-2641.
- Walker, R. I. (1994) *Vaccine* **12**, 387-400.
- de Aizpurua, H. J. & Russell-Jones, G. J. (1988) *J. Exp. Med.* **167**, 440-451.
- Anderson, E. L., Newman, F. K., Maassab, H. F. & Belshe, R. B. (1992) *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2230-2234.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. & Loch, C. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 642-653.
- Yetter, R. A., Lehrer, S., Ramphal, R. & Small P. A. Jr. (1980) *Infect. Immun.* **29**, 654-662.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukonene, K. & Wright, S. D. (1990) *Cell* **61**, 1375-1382.
- Ishibashi, Y., Claus, S. & Relman, D. A. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1225-1233.
- Holt, P. G., Degebrodt, A., O'Leary, C., Krska, K. & Plozza, T. T. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 397-407.
- Thepen, T., Van Rooijen, N. & Krall, G. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 499-509.
- Rappuoli, R. (1994) *Pathogenicity Mechanisms of Bordetella: In Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, ed. Dangel, J. L. (Springer, Berlin), pp. 319-336.
- Roberts, M., Maskell, D., Novotny, P. & Dougan, G. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 732-739.

### **C. Etude de la protéine hybride FHA-Sm28GST produite par la souche BPGR60.**

Nous avons vérifié que la protéine hybride FHA-Sm28GST conservait les propriétés propres de chacune des deux protéines.

Le passage du surnageant de culture de BPGR60 sur une colonne d'héparine Sépharose montre que la protéine de fusion est retenue sur colonne, indiquant que l'insertion de la Sm28GST dans la FHA n'a pas altéré la capacité de fixation de cette dernière à l'héparine.

Par contre, l'analyse de la protéine hybride produite par la souche BPGR60 montre que la Sm28GST ne possède pas d'activité enzymatique lorsqu'elle est fusionnée à la FHA. La mutation créée par remplacement de la cystéine en position 140 par une serine pourrait avoir modifié la structure de la protéine, de même que son insertion dans la FHA. L'analyse par Western-blot montre que la protéine FHA-Sm28GST produite par la souche BPGR60 est reconnue par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le peptide 24-43 correspondant à la région N-terminale de la Sm28GST. Cette protéine est également reconnue par un anticorps polyclonal de rat dirigé contre le peptide 190-211 (partie C-terminale de la Sm28GST). Les sites impliqués dans l'activité enzymatique semblent donc accessibles dans la protéine FHA-Sm28GST mais peuvent se retrouver éloignés par rapport à la distance qui les séparent dans la protéine Sm28GST native. Cette modification conformationnelle entrainerait une perte du site enzymatique tout en gardant les épitopes protecteurs correspondants.

La présence de certains microorganismes ou même de microparticules au niveau des muqueuses pulmonaires peut provoquer une réaction inflammatoire liée à la présence et au recrutement de cellules (macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales, etc...) capables de produire, après stimulation, des cytokines pro-inflammatoires.

Connaissant l'implication importante des cytokines inflammatoires dans l'induction et l'orientation de la réponse immune, notamment pour la production d'IgA (Kramer *et al.* 1995), nous avons étudié le profil de production de ces cytokines obtenu suite à l'administration de la souche BPGR60 de *B. pertussis*.

#### **D. Production de cytokines inflammatoires au niveau pulmonaire après administration nasale de la souche recombinante BPGR60.**

L'article précédent a permis de mettre en évidence la production d'anticorps au niveau des muqueuses du tractus respiratoire, consécutive à l'administration par voie nasale de la souche BPGR60. Nous avons poursuivi l'étude de la régulation locale de la réponse immune en évaluant la production de certaines cytokines inflammatoires connues pour être impliquées dans l'établissement d'une réponse de type IgA.

L'analyse histologique réalisée sur des coupes de poumons des souris immunisées intranasalement avec la souche BPGR60 a permis de montrer la production locale de  $TNF\alpha$ , d'IL-6 et de  $TGF\beta$ . La présence de ces cytokines inflammatoires dans les LBA a été détectée par ELISA et les résultats obtenus nous indiquent une sécrétion ponctuelle de  $TNF\alpha$  et d'IL-6. La production et la sécrétion de ces cytokines inflammatoires sont précoces et transitoires au niveau des tissus pulmonaires. En effet, leur présence n'a été observée que pendant la première semaine après l'administration de *B. pertussis* alors que les

bactéries persistent pendant environ un mois dans les poumons. Par contre, deux semaines après l'inoculation, une sécrétion d'IL-10, connue pour son rôle dans la réponse IgA chez l'homme, a été détectée au niveau pulmonaire ce qui pourrait expliquer, en partie, l'inhibition de la production de ces cytokines inflammatoires.

La présence et la régulation de ces cytokines au niveau pulmonaire, induite après administration de *B. pertussis*, pourraient donc intervenir directement dans le processus aboutissant à la réponse immune locale.

L'ensemble de ces résultats est détaillé dans l'article qui suit et qui a été soumis à "Microbiol Pathogenesis " : "Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration with recombinant *B. pertussis*", réalisé en collaboration avec F. Remoué et O. Poulain-Godefroy.



1 **LOCAL TRANSIENT INDUCTION OF INFLAMMATORY CYTOKINES**  
2 **AFTER INTRANASAL ADMINISTRATION OF RECOMBINANT**  
3 ***BORDETELLA PERTUSSIS* .**

4  
5  
6 Authors : Franck Remoué<sup>1</sup>, Odile Poulain-Godefroy<sup>1</sup>, Nathalie  
7 Mielcarek<sup>1</sup>, Raymond Pierce<sup>1</sup>, André Capron<sup>1</sup>, Camille Locht<sup>2</sup>, and  
8 Gilles Riveau<sup>1\*</sup>.

9  
10 Address : Laboratoire INSERM U167<sup>1</sup> and Laboratoire INSERM U447<sup>2</sup>,  
11 Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex,  
12 France.

13  
14  
15 \* Corresponding author : Tel # (33) 03.20.87.77.81  
16 Fax # (33) 03.20.87.78.88

17  
18  
19 Short title: Cytokines after nasal administration with r*B. pertussis*

**1 ABSTRACT**

2 Inflammatory cytokines have been described to play a critical  
3 role in the orientation and amplification of the IgA immune  
4 response. In this study, we show that the intranasal administration  
5 of a *Bordetella pertussis* strain expressing the protective antigen  
6 glutathione-S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST)  
7 induced an inflammatory response in the lungs of mice,  
8 characterized by the production of inflammatory cytokines, such as  
9 Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Interleukin-6 and Transforming-Growth  
10 Factor  $\beta$ . The production and the secretion of these cytokines in  
11 lung tissues was early and transient. Their presence was observed  
12 only during the first week after administration despite the  
13 persistence of the bacteria for one month. Two weeks after  
14 inoculation, Interleukin-10 secretion was detected in the lungs,  
15 which could explain the decrease in the production of inflammatory  
16 cytokines. These inflammation-regulating cytokines, induced in the  
17 lungs by the presence of the bacterial vector, could be part of the  
18 process generating the local immune response, in particular the  
19 anti-Sm28GST IgA response.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

**Key words :** Inflammation  
Cytokines  
*Bordetella pertussis*  
Intranasal administration  
Lung

## 1 INTRODUCTION

2 Gram negative bacterial products like endotoxin have been  
3 known to induce the initiation of inflammation by promoting  
4 inflammatory cytokine production by macrophages, lymphocytes  
5 and epithelial cells (1) (2).  $TNF\alpha$  plays a major role in the  
6 inflammatory reaction since it is able to enhance the production of  
7 IL-6, IL-10 and chemotactic factors by macrophages and epithelial  
8 cells (3). Consequently, IL-6 can, by itself or in synergy with  
9 others cytokines, mediate the acute phase response and fever (4).  
10  $TGF\beta$  participates in monocyte recruitment. Its very early  
11 production plays a key role in the initiation of the inflammatory  
12 response (5).  $TGF\beta$  then participates in its own regulation (6). IL-  
13 10 is involved in the regulation of the inflammatory reaction by the  
14 down-regulation of the production of  $TNF\alpha$  and IL-6 (7).

15 It has been demonstrated that the inflammatory cytokines are  
16 important for the induction and the orientation of the immune  
17 response, especially for the IgA isotype production (8). More  
18 precisely, it has been proposed that  $TGF\beta$  acts as a switching  
19 factor to enhance IgA production (9), (10). *In vivo*, exogenous IL-6  
20 can positively influence the development of an IgA response (11). In  
21 addition, IL-10 is involved in the switch of B cells into IgA  
22 secreting cells in man (12) and in mice (13).

23 The use of recombinant bacteria adapted to the digestive or  
24 respiratory tract represents one of the most promising approaches  
25 for the presentation of vaccine candidate proteins to mucosal  
26 associated lymphoid tissues and the induction of a specific immune  
27 response (14), (15). In our laboratory, we are currently exploring

1 the use of *Bordetella pertussis*, the etiological agent of whooping  
2 cough, for the presentation of foreign antigens. Although *B.*  
3 *pertussis* is a strictly human pathogen, its intranasal  
4 administration in mice can provoke some of the pathological events  
5 characteristic of the human disease : age-dependant severity,  
6 bacterial colonization of respiratory tract, infiltration of  
7 inflammatory cells and leukocytosis (16), (17).

8 Renault-Mongénie *et al.* (18) have demonstrated that an  
9 intranasal administration of recombinant *B. pertussis* (BPGR60), in  
10 contrast to a non-recombinant strain, can induce a mucosal IgA  
11 response in Broncho Alveolar Lavage Fluids (BALF) against a  
12 heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin (FHA), the  
13 major bacterial adhesin. The foreign antigen used, the 28-kDa  
14 glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST), is a  
15 protein endowed with potent vaccine properties against  
16 schistosomiasis (19).

17 In this study, we wished to evaluate whether this anti-  
18 Sm28GST IgA response was preceded by the production of  
19 inflammatory cytokines after intranasal administration of BPGR60.  
20 This was investigated by their immunohistochemical localization  
21 in lung tissues and their presence in Broncho-Alveolar Lavage  
22 Fluids (BALF) and in serum.

## 1 RESULTS

### 3 **Histological detection of inflammation-regulating** 4 **cytokines in lung tissues after BPGR60 administration.**

5 Histological analysis of lungs was performed after BPGR60  
6 administration. Infiltration of cells into the alveolar epithelium  
7 was essentially observed around bronchiolar airways 7 days after  
8 intranasal inoculation.

9 The presence of  $TNF\alpha$ , IL-6 and  $TGF\beta$  in lung tissues (alveolar  
10 epithelium, AE; bronchiolar epithelium, BE) during the first week  
11 after BPGR60 intranasal inoculation was evaluated by  
12 immunohistochemical analysis.  $TNF\alpha$  was detectable at low levels  
13 in both AE and BE of uninfected mice (Fig. 1b). Twenty four hours  
14 after infection with live BPGR60 (Fig. 1c), an increase in  $TNF\alpha$   
15 production was observed by the marked staining of both epithelia.  
16 Seven days after infection (Fig.1d) the level of  $TNF\alpha$  had decreased  
17 significantly.

18 As shown in Fig. 2b, IL-6 was present at low levels in the BE  
19 of uninfected mice. The level of this cytokine increased in BE and  
20 became detectable in AE 24 hours after intranasal administration  
21 of BPGR60 (Fig. 2c). This production was transient since 7 days  
22 later (Fig. 2d), the staining of the infected mouse lung epithelia  
23 was similar to that of uninfected mice.

24 The specific background staining for  $TNF\alpha$  and IL-6 observed  
25 in uninfected mouse lung epithelia was also detected in axenic  
26 mouse lung epithelia (data not shown). This result suggests that  
27 the basal production of both cytokines is independent of the  
28 presence of living micro-organisms.

1 The histological staining of TGF $\beta$  (Fig. 3) was very light in the  
2 BE of uninfected mice (Fig. 3b). One day after infection, strong  
3 staining of the BE was observed, whereas TGF $\beta$  was undetectable in  
4 BALF, indicating a neoproduction of TGF $\beta$  (Fig. 3c). Figure 3d shows  
5 that the production of this cytokine dropped to the basal level 7  
6 days after inoculation, since the staining obtained was comparable  
7 to that observed for uninfected mice (Fig. 3b).

### 8 9 **Inflammation-regulating cytokine secretion in the** 10 **broncho-alveolar lumen and in serum.**

11 The presence of regulating inflammatory cytokines in BALF  
12 and serum was evaluated at different time intervals.

13 Whereas the presence of TGF $\beta$  was undetectable by ELISA in  
14 BALF at any time (data not shown), TNF $\alpha$  and IL-6 were readily  
15 detected (Fig.4). A transient but significant increase in TNF $\alpha$   
16 secretion was observed 3 to 6 hours after inoculation of live  
17 BPGR60 ( $p < 0.001$ ), as shown in Fig. 4A. A second significant  
18 increase was detected 7 days after the inoculation ( $p < 0.05$ ). Killed  
19 BPGR60 induced significant secretion of TNF $\alpha$ , 3 to 6 hours after  
20 administration but in that case no second peak was observed 7 days  
21 later. In addition, the early secretion remained at a lower level  
22 than that obtained with living bacteria. The kinetics of IL-6  
23 secretion in BALF is presented in Fig. 4B. The presence of IL-6 in  
24 BALF was detected 24 h after administration of BPGR60 and  
25 reached a maximum 3 days later. Beside a weak rise in IL-6  
26 secretion observed after 3 hours (not significant), the intranasal  
27 administration of killed BPGR60 bacteria did not induce secretion  
28 of this cytokine.

1 We also evaluated the secretion of IL-10 in BALF after  
2 BPGR60 infection (Fig. 4C). A low constitutive production of IL-10  
3 was detected in uninfected mice. However, the administration of  
4 BPGR60 induced a marked increase in the IL-10 level at days 14 and  
5 21 ( $p < 0.05$ ). One week later, this IL-10 secretion dropped to a  
6 lower level than that found in uninfected mice ( $p < 0.05$ ), suggesting  
7 that IL-10 was strongly secreted before day 28. No significant  
8 variation in the constitutive production of IL-10 was observed in  
9 mice that had received killed BPGR60.

10 The secretion of these cytokines was also evaluated in BALF  
11 after intranasal administration of non-recombinant *B. pertussis*.  
12  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-10 secretion was similar to that observed after  
13 inoculation of BPGR60 (data not shown).

14 Neither  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 nor IL-10 were present at measurable  
15 levels in the sera after inoculation of BPGR60, whereas the  
16 intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS, 30 $\mu\text{g}$ ) in mice  
17 induced the production of circulating  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 (data not  
18 shown), as has been previously described (20).

19



## 1 DISCUSSION

2 In this study we investigated some of the inflammatory  
3 events in mice, especially the local inflammatory cytokine  
4 production after intranasal administration of a recombinant *B.*  
5 *pertussis* strain, able to induce a specific and local IgA response  
6 detectable 28 days after inoculation (18).

7 The presence of *B. pertussis* in the respiratory tract induces  
8 an inflammatory reaction, as has been recently described (17). This  
9 reaction has been characterized by alveolitis and local cell influx  
10 14 days after the injection of virulent *B. pertussis* in outbred mice.  
11 In this study, we detected an early inflammatory process as  
12 evidenced by the production of inflammation-regulating cytokines  
13 in lung tissues. Immunohistochemical detection of TNF $\alpha$  and IL-6  
14 indicated that this transient production in AE and BE occurred  
15 during the first 24 hours after intranasal inoculation with BPGR60.  
16 The secretion of TNF $\alpha$  and IL-6 in BALF was also detected during  
17 the first week after inoculation of the living recombinant bacteria,  
18 as well as of the wild-type strain. In contrast, the production of  
19 TGF $\beta$  was detectable in the BE 24h after bacterial administration  
20 and did not appear to be followed by a detectable secretion of TGF $\beta$   
21 in BALF. The discrepancy detectable between the presence of TGF $\beta$   
22 in the tissues and the absence of secretion could be due to the  
23 lower sensitivity of the ELISA technique. However, the absence of  
24 secreted TGF $\beta$  might also be associated with the lack of this  
25 cytokine in the AE, as observed in this study as well.

26 Surprisingly, a second peak of TNF $\alpha$  secretion in the BALF of  
27 mice having received recombinant bacteria was detected at day 7,

1 when histological analysis failed to show any differences in  
2 comparison with uninfected lungs. One hypothesis to explain this  
3 phenomenon is that TNF $\alpha$  may not be produced at this time point by  
4 the lung epithelia, but rather by locally recruited cells. Indeed,  
5 Khelef et al. (17) have detected the presence of inflammatory cells  
6 in BALF up to 7 days after administration of a wild-type *B.*  
7 *pertussis* strain.

8 The absence of detectable levels of cytokines in the serum  
9 indicated that the observed secretion was localized to the  
10 respiratory tract. Moreover, we found that BPGR60 had to be alive  
11 to induce TNF $\alpha$  and IL-6 secretion, since inoculation with killed  
12 BPGR60 did not induce significant cytokine secretion, except for  
13 the low level of TNF $\alpha$  observed 3h post infection. This latter  
14 secretion may have been generated by small amounts of LPS  
15 administered with the killed bacteria. The production of TNF $\alpha$  and  
16 IL-6 observed after infection with live *B. pertussis* could be  
17 explained by a constant release of LPS by the bacteria during the  
18 first week, the peak of colonization of BPGR60 (18), since the  
19 primordial role of LPS in the induction of inflammatory cytokines  
20 is well established (21). LPS stimulates IL-6 production (2), (22)  
21 and TNF $\alpha$  secretion (20), (23). Our data indicate that the local  
22 production of TNF $\alpha$  and IL-6 lasted only during one week following  
23 inoculation, whereas bacteria were present in the lungs for  
24 approximately one month (18). The transient cytokine production  
25 that we observed may perhaps be partly explained by some natural  
26 LPS neutralization processes. Indeed, it has been shown that  
27 monocyte activation by local production of TNF $\alpha$  or IL-6 induces  
28 the secretion of high density lipoproteins (HDL) able to bind and  
29 neutralize LPS (24). The binding of these HDL (also named LPS

1 binding proteins) to the lipid A moiety of LPS blocks its capacity to  
2 induce cytokine production and could thus limit TNF $\alpha$  and IL-6  
3 secretion (25). Lipid A may also be recognized by the  
4 bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a product of  
5 neutrophils (26) secreted in response to LPS or Gram-negative  
6 sepsis (27). BPI has been shown to neutralize LPS and thereby to  
7 decrease TNF $\alpha$  production induced by bacterial infections (28).

8 The involvement of the cytokine network regulation could  
9 also explain the transient production and secretion of TNF $\alpha$  and IL-  
10 6. TNF $\alpha$ , in synergy with LPS, is a potent inducer to stimulate IL-6  
11 production (20). In accordance to these results, we observed an  
12 early secretion of TNF $\alpha$  followed by the secretion of IL-6. The role  
13 of TGF $\beta$  in this process could also be pivotal, since it has been  
14 demonstrated that this cytokine favors the production of IL-6 but  
15 could locally inhibit the secretion of TNF $\alpha$  (6). The presence of  
16 TGF $\beta$  in lung tissues, during the first few days after *B. pertussis*  
17 administration would explain the observed decrease in TNF $\alpha$   
18 secretion at day 1 and the increase in IL-6 production at days 1 to  
19 3.

20 IL-10 is also involved in the regulation of inflammatory cytokine  
21 production and down-regulates the production of TNF $\alpha$  and IL-6 at  
22 the post-transcriptional level in LPS-activated macrophages (7). In  
23 our model, in addition to a low constitutive secretion in uninfected  
24 mice, we observed a detectable increase in IL-10 secretion only 14  
25 to 21 days after BPGR60 administration. Despite the fact that TNF $\alpha$   
26 was secreted 7 days before the IL-10 peak, a possible explanation  
27 for this IL-10 secretion is that TNF $\alpha$  is unique among the  
28 inflammatory cytokines in its capacity to increase IL-10 mRNA

1 production (29). Optimal translation of the IL-10 mRNA and  
2 subsequent secretion of the protein require macrophage  
3 stimulatory agents such as LPS (30). In addition, the autoregulatory  
4 role of IL-10 in inhibiting its own mRNA production could explain  
5 the observed transient secretion of IL-10 (7).

6         Since few days after the cytokine production described in  
7 this study, local and specific IgA response was observed (18), our  
8 observations suggest a predominant role of inflammation-  
9 regulating cytokines to orientate and/or facilitate the local  
10 immune response and subsequently the development of a systemic  
11 immune response in mice intranasally inoculated with recombinant  
12 *B. pertussis* producing heterologous antigens fused to FHA.

13

## 1 MATERIALS AND METHODS

### 3 Bacterial strains and growth conditions

4 The recombinant *B. pertussis* strain BPGR60 expressing the FHA-  
5 Sm28GST hybrid protein was described by Renauld-Mongénie *et al.*  
6 (18). The bacteria were grown on Bordet-Gengou agar medium (BG  
7 agar) (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 5% glycerol and  
8 20% defibrinated sheep blood (Pasteur Production, France) and  
9 containing 100 µg/ml of streptomycin (Sigma, St Louis, MO, USA).

### 11 Intranasal infection of mice

12 Six- to eight-week-old female Balb/c mice (Iffa Credo, L'Arbresle,  
13 France) were initially anaesthetised with 200 µl per 10 g of body  
14 weight of 5% sodium pentobarbital given intraperitoneally. They  
15 then received intranasally 50 µl of an inoculum containing 5x10<sup>6</sup>  
16 CFU of recombinant BPGR60 resuspended in PBS. Killed BPGR60  
17 bacteria were prepared by incubation of the microorganisms in 4%  
18 paraformaldehyde (Sigma) during 30 min followed by 3 washes in  
19 PBS.

### 21 Immunohistochemical staining of TGFβ, TNFα or IL-6

22 One or 7 days after intranasal bacterial administration, mice were  
23 killed, and their lungs were removed. The lungs were fixed in 4%  
24 paraformaldehyde (Sigma), dehydrated by incubation in increasing  
25 concentrations of ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and  
26 embedded in paraffin. Sections (5 µm) were rehydrated and then  
27 incubated with either a biotinylated monoclonal antibody directed  
28 against mouse IL-6 (5 µg/ml; PharMingen, San Diego, USA) or a  
29 rabbit polyclonal antibody raised against mouse TGFβ (1:100; R & D

1 Systems) or mouse TNF $\alpha$  (1:200; Genzyme, Cambridge, U.K.). After  
2 washing, the label was developed with alkaline phosphatase-  
3 conjugated streptavidin for IL-6 detection (1:50; Dako, Trappes,  
4 France), or with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit  
5 antibody (Sigma) or biotinylated anti-rabbit antibody (1:250; R&D  
6 Systems, Abingdon, U.K.) and alkaline phosphatase-conjugated  
7 streptavidin (1:50; Dako) for TGF $\beta$  or TNF $\alpha$  detection. Alkaline  
8 phosphatase was detected using the New Fuchsin kit (Dako). Slides  
9 were counterstained using Harris's hematoxylin (Sigma).

10

11

## 12 **Cytokine (IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) detection in BALF and** 13 **serum**

14 The mice were bled from the retroorbital sinus at various times  
15 after intranasal administration of BPGR60, and BALF was collected  
16 after three consecutive lavages of the lungs with a total volume of  
17 0.5 ml of PBS. IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  were detected using  
18 ELISA as follows. For IL-6 detection, the purified monoclonal  
19 antibody MPS-20F3 (2  $\mu$ g/ml; PharMingen) was coated on to  
20 Immulon 3 Flat Bottom Plates (Dynatech Lab., Virginia, USA). After  
21 3 washes with PBS and saturation with PBS containing 0.5 %  
22 gelatine, BALF diluted 1:2 or serum diluted 1:4 was added and  
23 incubated for 3 hours at 37°C. The plates were then washed and  
24 incubated with biotinylated anti-IL-6 monoclonal antibody MPS-  
25 32C11 (0.25  $\mu$ g/ml; PharMingen). Horseradish peroxidase-  
26 conjugated streptavidin (Amersham) was added at a 1:2000  
27 dilution, and the presence of the cytokine was revealed with 1  
28 mg/ml ortho-phenylene diamine (Sigma) in 0.1M citrate buffer (pH  
29 5.5) containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped by the

1 addition of 2M HCl, and the absorbance was measured at 492nm  
2 using a Titertek Multiskan MCC microplate reader (Labsystems  
3 Group, Les Ulis, France). The same ELISA technique was performed  
4 for the IL-10 detection in BALF or in serum using anti-IL-10  
5 monoclonal antibodies JES5-2A5 (2  $\mu$ g/ml; PharMingen) and SXC-1  
6 (1 $\mu$ g/ml; PharMingen) for coating and detection, respectively.  
7 Standard curves were established using recombinant IL-6 (0.125 to  
8 8 ng/ml; PharMingen) and IL-10 (0.250 to 16 ng/ml; PharMingen)  
9 diluted in PBS or in serum of uninfected mice.

10 The TNF $\alpha$  ELISA was performed by using the Factor-Test-m TNF $\alpha$   
11 Kit (Genzyme), as recommended by the supplier.

12 The TGF $\beta$  ELISA was developed using a mouse monoclonal anti-TGF $\beta$   
13 (10  $\mu$ g/ml; Genzyme) coated on the plate, and an anti-TGF $\beta$   
14 polyclonal antibody kit (R&D Systems) was used for detection.

15

## 16 **Statistical calculations**

17 The results were analyzed using the unpaired Student's *t* test.  
18 Differences were considered significant at  $p \leq 0,05$ .

## 1 **Acknowledgments**

2 We thank A.M. Schacht and J. Cornette for their technical  
3 assistance. We are grateful to Dr B. Kerdelhué and Dr J-M. Grzych  
4 for helpful discussions and advice, and Dr G. Renauld for providing  
5 *B. pertussis* BPGR60.

6 This investigation received financial support from European  
7 Economy Community contracts BMH-92-0026-FR and B102-  
8 CT930111. This study was also supported by the Institut Pasteur  
9 de Lille, the Région Nord-Pas-de-Calais, and Institut National de la  
10 Santé et de la Recherche Médicale. N.M. holds a fellowship of the  
11 Région Nord-Pas-de-Calais.



1 **REFERENCES**

- 2 1. Heuman, D. Baumgartner, JD. Cytokines et infections  
3 bactériennes et parasitaires. In: Masson, ed. Cytokines. Paris: 1993:  
4 317-328.
- 5 2. Hedges, S, Agace, W, Svensson, M, Sjögren, AC, Ceska, M,  
6 Svanborg, C. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine  
7 network. *Infect. Immun.* 1994; 62: 2315-2321.
- 8 3. Cavaillon, JM. Tumor Necrosis Factor. In: Masson, ed.  
9 Cytokines. Paris: 1993: 167-181.
- 10 4. Aarden, L, Helle, M, Boeijs, L, Pascual-Salcedo, D, de Groot, E  
11 Differential induction of interleukin-6 production in monocytes,  
12 endothelial cells and smooth muscle cells. In: Fradelizi, Bienvenu,  
13 ed. Cytokines and Inflammation. Paris: John Libbey Eurotext, 1991:  
14 15-27.
- 15 5. Wahl, SM, Mc Carthney-Francis, N, Mergenhagen, SE.  
16 Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- $\beta$ . *Immunol.*  
17 *Today.* 1989; 10: 258-261.
- 18 6. Chantry, D, Turner, M, Abney, E, Feldman, M. Modulation of  
19 cytokine production by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Immunol.*  
20 1989; 142: 4295-4300.
- 21 7. Fiorentino, DF, Zlotnik, A, Mosmann, TR, Howard, M, O'Garra, A.  
22 IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.*  
23 *Immunol.* 1991; 147: 3815-3822.

- 1 8. Kramer, DR, Sutherland, RM, Bao, S, Husband, AJ. Cytokine  
2 mediated effects in mucosal immunity. *Immunol. Cell Biol.* 1995; 73:  
3 389-396.
- 4 9. Sonoda, E, Matsumoto, R, Hitoshi, Y, *et al.* Transforming growth  
5 factor  $\beta$  induces IgA production and acts additively with interleukin  
6 5 for IgA production. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 1415-1420.
- 7 10. Van Vlasselaer, P, Punnonen, J, de Vries, JE. Transforming  
8 growth factor- $\beta$  directs IgA switching in human B cells. *J. Immunol.*  
9 1992; 148: 2062-2067.
- 10 11. Ramsay, AJ, Husband, AJ, Ramshaw, IA, *et al.* The role of  
11 interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo*. *Science*  
12 1994; 264: 561-563.
- 13 12. Brière, F, Bridon, JM, Chevet, D, *et al.* Interleukin 10 induces B  
14 lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J. Clin.*  
15 *Invest.* 1994; 94: 97-104.
- 16 13. Ishida, H, Hastings, R, Thompson-Snipes, L, Howard, M.  
17 Modified immunological status of anti-IL-10 treated mice. *Cell.*  
18 *Immunol.* 1993; 148: 371-384.
- 19 14. Mc Ghee, JR, Mestecky, J, Dertzbaugh, MT, Eldridge, JH,  
20 Hirasawa, M, Kiyono, H. The mucosal immune system : from  
21 fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10:  
22 75-88.
- 23 15. Walker, R. New strategies for using mucosal vaccination to  
24 achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994; 12: 387-400.

- 1 16. Sato, Y. Sato, H. Animal models of Pertussis. In: Wardlaw, AC,  
2 Partonand, R, eds. Pathogenesis and immunity in pertussis. New  
3 York: John Wiley & Sons, Inc., 1988: 121-145.
- 4 17. Khelef, N. Bachelet, CM. Vargaftig, BB. Guiso, N.  
5 Characterization of murine lung inflammation after infection with  
6 parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or  
7 toxins. Infect. Immun. 1994; 62: 2893-2900.
- 8 18. Renauld-Mongenie, G. Mielcarek, N. Cornette, J, *et al.* Induction  
9 of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused  
10 to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with  
11 recombinant *Bordetella pertussis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;  
12 93: 7944-7949.
- 13 19. Capron, A, Dessaint, JP, Capron, M, Pierce, RJ. Vaccine  
14 strategies against schistosomiasis. Immunobiol. 1992; 184: 282-294.
- 15 20. Lecontel, C, Vinit, M-A, Parant, FJ, Parant, MA. Differential  
16 priming for endotoxin-induced circulating cytokine production by  
17 tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . Cytokine 1990; 2: 375-  
18 380.
- 19 21. Linder, H, Engberg, I, Baltzer, IM, Jann, K, Svandorg-Eden, C  
20 Induction of inflammation by *Escherichia coli* at the mucosal level:  
21 requirement for adherence and endotoxin. Infect. Immun. 1988; 56:  
22 1309-1313.
- 23 22. De Man, P, Van Kooten, C, Aarden, L, Engberg, I, Linder, H,  
24 Svandorg Eden, C. Interleukin-6 induced at mucosal surfaces by  
25 gram-negative bacterial infection. Infect. Immun. 1989; 57: 3383-  
26 3388.

- 1 23. Taylor, MJ, Hehnke, K, Clark, CL. Lipopolysaccharide and a  
2 phorbol ester stimulate secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  from  
3 alveolar macrophages through action on overlapping subsets of  
4 cells. *J. Leukoc. Biol.* 1993; 54: 384-388.
- 5 24. Levine, DM, Parker, TS, Donnelly, TM, Walsh, A. *In vivo*  
6 protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein.  
7 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 12040-12044.
- 8 25. Flegel, WA, Baumstark, MW, Weinstock, C, Berg, A, Northoff, H.  
9 Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low-  
10 and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. *Infect.*  
11 *Immun.* 1993; 61: 5140-5146.
- 12 26. Gazzono-Santoro, H, Parent, JB, Grinna, L, *et al.* High-affinity  
13 binding of bactericidal/permeability-increasing protein and a  
14 recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of  
15 lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1992; 60: 4754-4761.
- 16 27. Calvano, SE, Thompson, WA, Marra, MN, *et al.* Changes in  
17 polymorphonuclear leukocyte surface and plasma  
18 bacterial/permeability-increasing protein and plasma  
19 lipopolysaccharide binding protein during endotoxemia or sepsis.  
20 *Arch. Surg.* 1994; 129: 220-226.
- 21 28. Weiss, J, Elsbach, P, Shu, C, Grinna, J, Horwitz, A, Theofan, G.  
22 Human bacterial/permeability-increasing protein and a  
23 recombinant NH<sub>2</sub>-terminal fragment cause killing of serum-  
24 resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor  
25 necrosis factor release induced by the bacteria. *J. Clin. Invest.* 1992;  
26 90: 1122-1130.

- 1 29. Platzer, C. Meisel, C. Vogt, K. Platzer, M, Volk, HD. Up-  
2 regulation of monocytic Il-10 by tumor necrosis factor- $\alpha$  and cAMP  
3 elevating drugs. Intern. Immunol. 1995; 7: 517-523.
- 4 30. Wanidworanun, C. Strober, W. Predominant role of tumor  
5 necrosis factor- $\alpha$  in human monocyte IL-10 synthesis. J. Immunol.  
6 1993; 151: 6853-6861.

## 1 LEGENDS OF THE FIGURES

### 3 **Figure 1. Immunohistochemical localization of TNF $\alpha$ in** 4 **lungs of mice intranasally inoculated with BPGR60.**

5 Histological sections were incubated with (b, c and d) or without  
6 (a) polyclonal anti-TNF $\alpha$  antibodies followed by incubation with  
7 anti-rabbit Ig alkaline phosphatase-conjugated antibodies and  
8 developed with the New Fuchsin kit. One day after *B. pertussis*  
9 inoculation (a and c), strong labelling was detected in bronchiolar  
10 (BE) and alveolar (AE) epithelia (c) (*arrows*), whereas weak  
11 labelling was detected in uninfected mice (b) or 7 days after  
12 administration (d). Bar = 10  $\mu$ m.

### 14 **Figure 2. Immunohistochemical localization of IL-6 in** 15 **lungs of mice intranasally inoculated with BPGR60.**

16 Histological sections were incubated with (b, c and d) or without  
17 (a) biotinylated monoclonal anti-IL-6 antibodies, detected with  
18 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin and developed with  
19 the New Fuchsin kit. One day post-administration of *B. pertussis* (a  
20 and c) the labelling was detected in the bronchiolar (BE) and  
21 alveolar (AE) epithelia (c) (*arrows*), whereas the labelling was  
22 restricted to bronchiolar epithelium (BE) in uninfected mice (b) or  
23 7 days after inoculation (d). Bar = 10  $\mu$ m.

1 **Figure 3. Immunohistochemical localization of TGF $\beta$  in**  
2 **lungs of mice intranasally inoculated with BPGR60.**

3 Histological sections were incubated with (b, c and d) or without  
4 (a) polyclonal anti-TGF $\beta$  antibodies, followed by incubation with  
5 anti-rabbit Ig biotin-conjugated antibodies detected with alkaline  
6 phosphatase-conjugated streptavidin and developed with the New  
7 Fuchsin kit. One day after *B. pertussis* administration (a and c) the  
8 labelling was restricted to the bronchiolar epithelium (BE) (c)  
9 (*arrows*), whereas no or weak labelling was detected in uninfected  
10 mice (b) or 7 days after inoculation (d). Bar = 10  $\mu$ m.

11

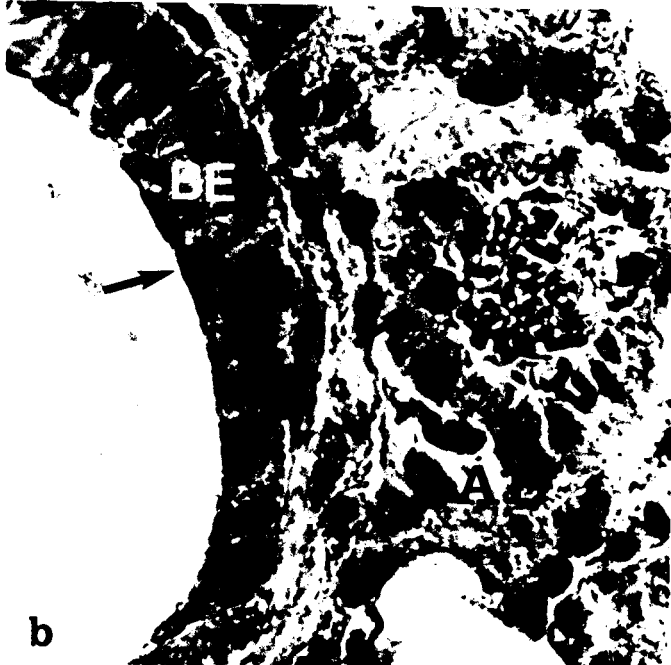
12 **Figure 4. TNF $\alpha$  (A), IL-6 (B) and IL-10 (C) levels in BALF of**  
13 **mice intranasally inoculated with BPGR60.**

14 BALF were collected from Balb/c mice given  $5 \times 10^6$  CFU of living or  
15 killed recombinant BPGR60 intranasally. TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-10 were  
16 measured as described in Materials and Methods. The results are  
17 expressed as mean  $\pm$  standard error of BALF content from four mice  
18 for each time period (from 3 hours to day 28 after administration).  
19 Asterisks indicate significant differences at  $P < 0,001$  (\*\*) and  
20  $P < 0,05$  (\*) when compared to uninfected control mice.

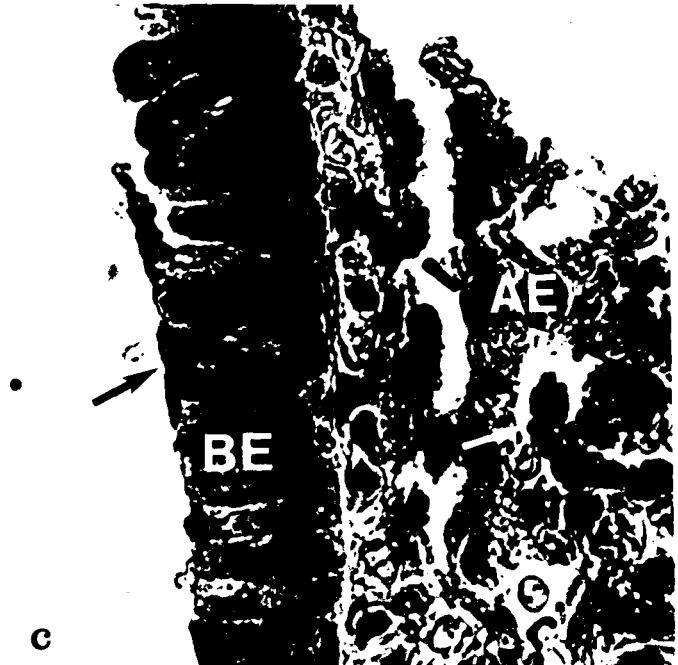
21



a



b



c

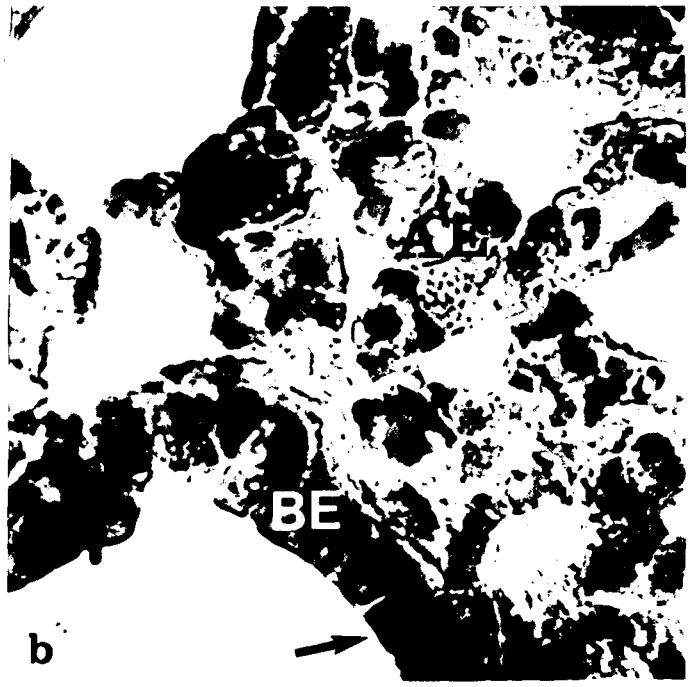


d

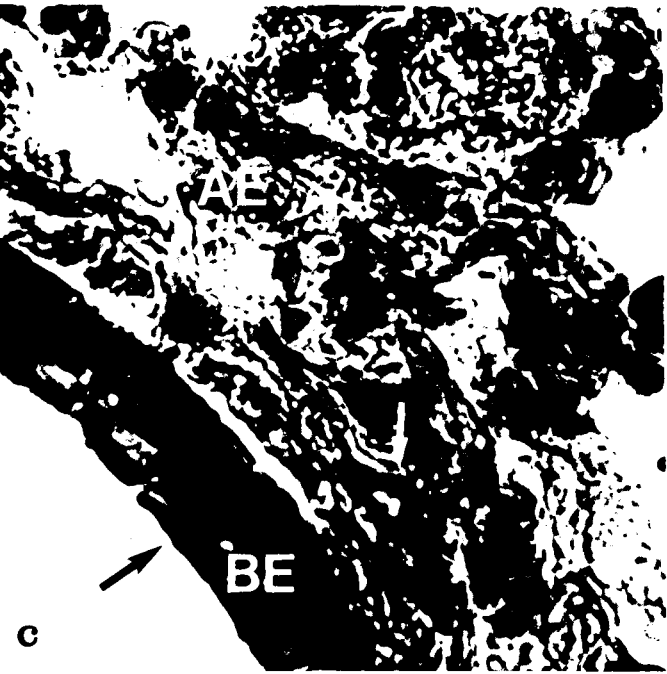




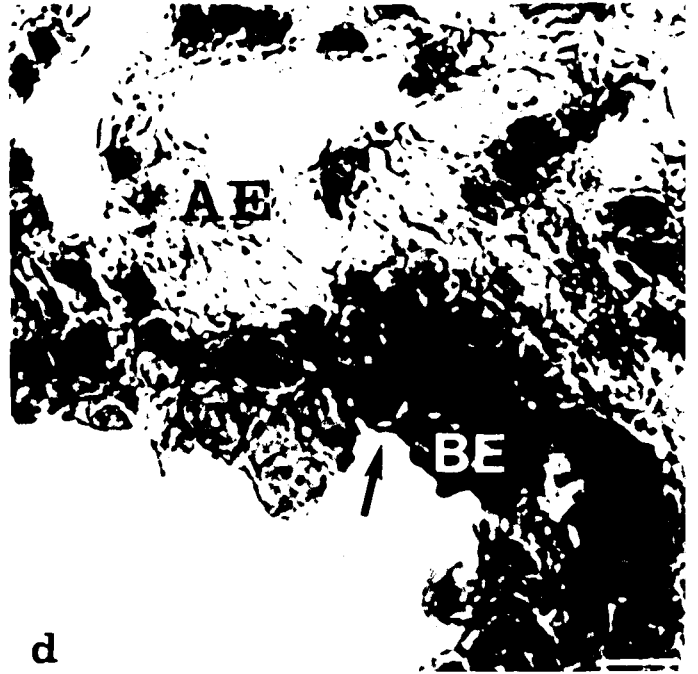
a



b

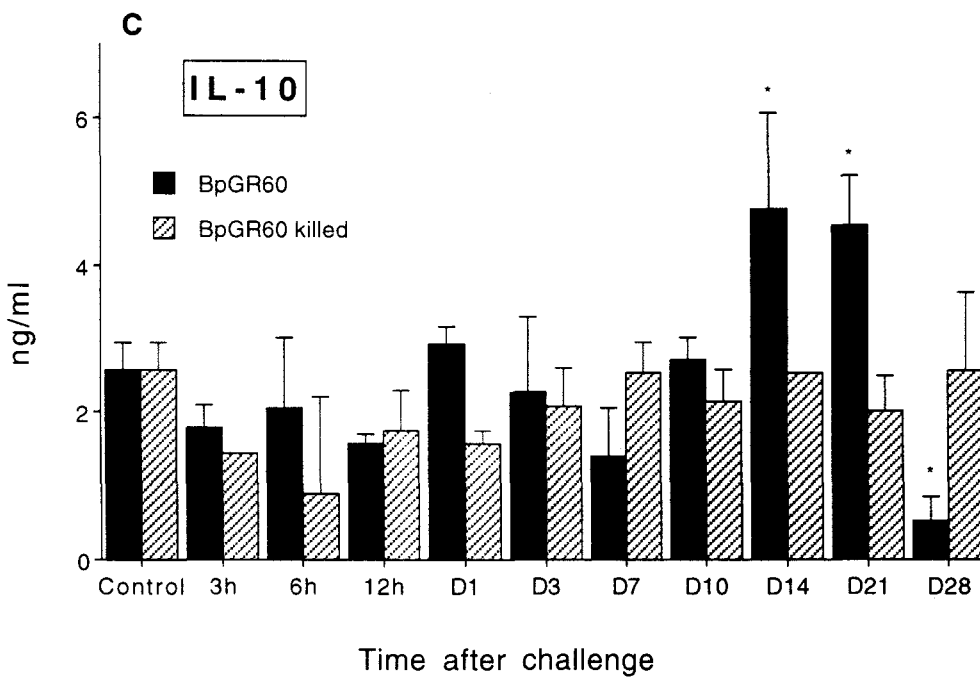
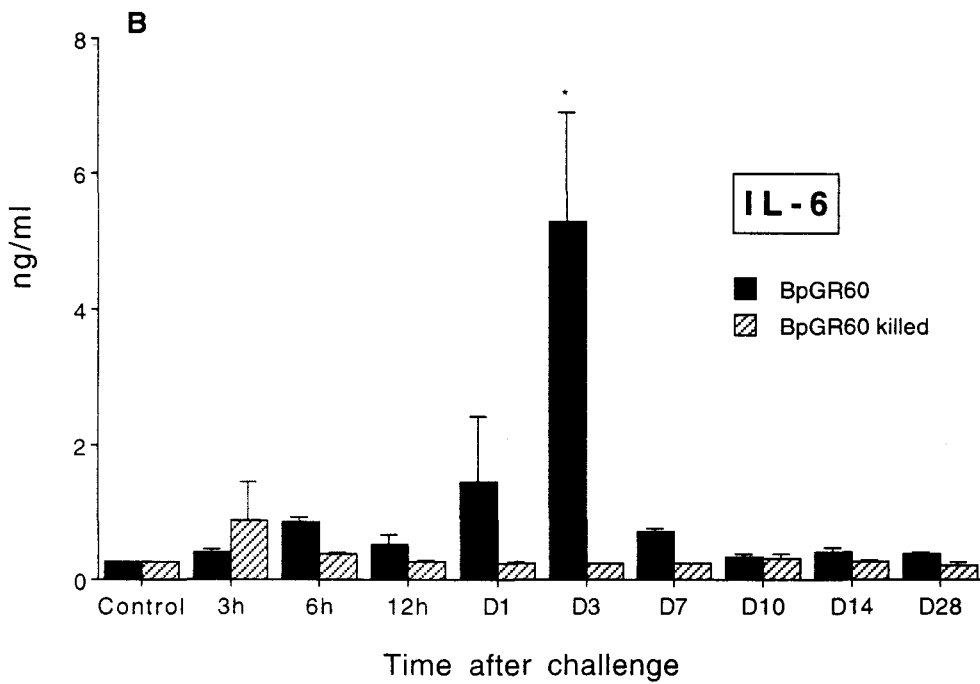
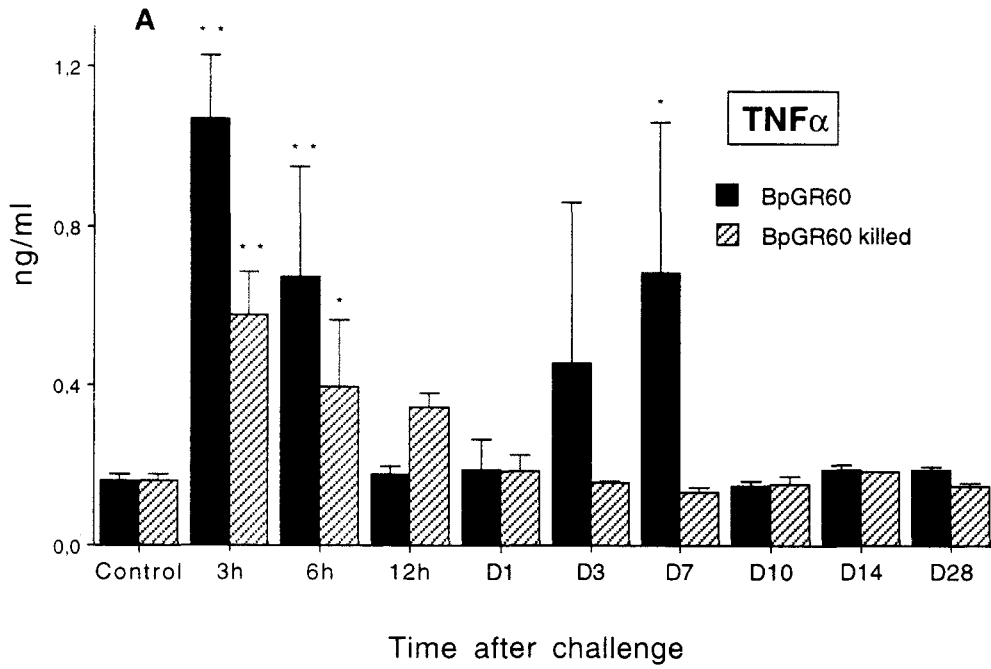


c



d





L'un des enjeux importants de la vaccination par voie muqueuse est non seulement d'induire une immunité locale capable de prévenir l'invasion des pathogènes au niveau des muqueuses, mais également de permettre l'établissement d'une réponse systémique. Nous avons voulu déterminer si notre protocole d'immunisation intranasale avec une souche recombinante de *B. pertussis* était capable de produire ces deux types de réponse.

#### **E. Mémoire immune spécifique induite après administration nasale d'une souche de *B. pertussis* recombinante: production d'anticorps sériques spécifiques de l'antigène hétérologue.**

L'article intitulé "Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*" a permis de montrer que l'administration de la souche BPGR60 entraînait la production d'anticorps (IgG et IgA) au niveau pulmonaire.

De plus, puisque la lyse de *B. pertussis* dans les poumons peut entraîner un relargage important de protéines bactériennes, nous avons supposé que les IgA anti-Sm28GST produits après l'administration de la souche BPGR60 pouvait former des complexes avec l'antigène relargué. De tels complexes ont, en effet, été détectés dans les LBA deux et trois semaines après l'immunisation nasale (titres de 32 et 12 respectivement). Ces résultats suggèrent que les taux d'IgA anti-Sm28GST dans les LBA ont été sous-estimés pour les temps correspondants à l'élimination des bactéries dans les poumons (de 7 à 28 jours après l'administration).

Cependant, malgré la production d'IgG et d'IgA anti-Sm28GST au niveau pulmonaire, aucune réponse anticorps sérique spécifique de la Sm28GST n'était décelable. Nous avons alors émis l'hypothèse que la présence de la souche BPGR60 dans les

poumons pourrait néanmoins être capable d'induire une mémoire immune spécifique de la Sm28GST.

Pour vérifier cette idée, plusieurs types de rappel ont été effectués chez des souris ayant préalablement reçu la souche recombinante de *B. pertussis*.

Nous avons pu montrer qu'un rappel à l'aide de la protéine recombinante rSm28GST administrée par voie nasale entraîne non seulement la production d'un taux élevé d'IgA anti-Sm28GST dans les LBA, mais également d'anticorps sériques spécifiques de la Sm28GST. Ces anticorps sériques anti-Sm28GST sont également détectés chez les souris ayant reçu la souche BPGR60 et infectées ensuite par le parasite *S. mansoni*. Le profil isotypique correspond à une réponse mixte, caractérisée par la production d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b. Aucune mémoire immune spécifique de la Sm28GST n'a pu être mise en évidence après le rappel chez les souris inoculées avec la souche sauvage de *B. pertussis* ou immunisées avec la rSm28GST par voie nasale, démontrant bien la spécificité de la mémoire immune induite par la souche BPGR60.

L'efficacité de la réponse immune induite suite à ce protocole (BPGR60 puis rappel avec la rSm28GST) a été évaluée lors d'une infestation d'épreuve par *S. mansoni*. Une protection significative a été obtenue en termes de réduction du nombre de vers et de la charge en oeufs.

Ces résultats indiquent que l'administration nasale d'une souche recombinante de *B. pertussis* est capable d'induire une mémoire immune spécifique de l'antigène hétérologue fusionné à la FHA, et que ce protocole d'immunisation par voie intranasale permet de protéger les souris contre une infection par *S. mansoni* de la même manière qu'une immunisation par voie systémique.

*B. pertussis* recombinant se révèle donc être un vecteur vivant vaccinal très prometteur et l'ensemble de ces observations est documenté dans l'article intitulé : "Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen", actuellement sous presse dans le journal "Infection and Immunity".

# **INTRANASAL PRIMING WITH RECOMBINANT *BORDETELLA PERTUSSIS* FOR THE INDUCTION OF A SYSTEMIC IMMUNE RESPONSE AGAINST A HETEROLOGOUS ANTIGEN**

(Running title: Priming with recombinant *B. pertussis*)

Nathalie Mielcarek<sup>1</sup>, Jocelyne Cornette<sup>1</sup>, Anne-Marie Schacht<sup>1</sup>, Raymond J. Pierce<sup>1</sup>, Camille Locht<sup>2</sup>, André Capron<sup>1</sup>, and Gilles Riveau\*<sup>1</sup>.

Laboratoires des Relations Hôtes-Parasite et Stratégies Vaccinales, INSERM U167,<sup>1</sup> and Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM U447,<sup>2</sup> Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

## **Correspondent Footnotes:**

\*Gilles Riveau: Laboratoire des Relations Hôtes-Parasites et Stratégies Vaccinales, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille Cedex, France, Tel. : (+33) 20.87.77.81, Fax : (+33) 20.87.79.06.

## ABSTRACT

One of the current goals in vaccine development is the non invasive administration of protective antigens via mucosal surfaces. In this context, the gut-associated lymphoid tissues have already been extensively explored. Vaccination via the nasal route has only recently been the focus of intensive investigation, and no live vector specifically designed for the respiratory mucosa is yet available. In this study we show that intranasal administration of the recombinant *Bordetella pertussis* BPGR60, producing the Sm28GST protective antigen of *Schistosoma mansoni* fused to the filamentous hemagglutinin, induces priming in mice for the production of serum antibodies. In addition to significant levels of anti-Sm28GST IgA antibodies, high levels of anti-Sm28GST serum antibodies were obtained after intranasal boost with the purified antigen or infection with *S. mansoni* following intranasal priming with BPGR60. These antibodies were of the IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes, suggesting a mixed immune response. No priming was observed in animals that had received non-recombinant *B. pertussis* or purified Sm28GST, indicating specific priming by BPGR60. This priming was also evident in immune protection against *S. mansoni* challenge. Significant protection against worm burden and egg output was obtained in mice primed with BPGR60 and intranasally boosted with purified Sm28GST. A lower but still significant degree of protection against egg output was also obtained in mice infected with a single dose of BPGR60. These results indicate that intranasal administration of recombinant *B. pertussis* can prime for serum antibody responses against a foreign antigen and for heterologous protection.

## INTRODUCTION

One of the main objectives in the current development of new vaccines is the induction of strong mucosal and systemic immune responses against protective antigens delivered by the mucosal route. This route of vaccination has, in principle, the advantage of easy administration in a non-invasive fashion and thereby avoiding risks of contamination caused by injection. A promising approach for the mucosal delivery of vaccines is the use of live vectors expressing genes that encode protective antigens. Various live vectors producing heterologous antigens have been developed in recent years, such as *Salmonella* and *Mycobacterium bovis* BCG (7, 13, 29). We have recently described the use of *Bordetella pertussis* to deliver heterologous antigens to the Mucosal Associated Lymphoid Tissue (MALT) of the respiratory tract via intranasal administration (22).

*B. pertussis*, the etiologic agent of whooping cough, is a highly contagious microorganism that produces several adhesins, among which the filamentous hemagglutinin (FHA) is the most important (for review, see 15). Mature FHA is a 220-kDa protein that is both surface-associated and secreted into the extracellular environment. Therefore, a foreign protein fused to FHA would be expected to be exposed on the bacterial surface and/or to be secreted. Furthermore, in view of its importance in the adherence of *B. pertussis* (12, 21, 28), FHA is included as an important antigen in the new acellular vaccines against whooping cough (9). Both mice and children infected with *B. pertussis* or immunized with whole-cell pertussis vaccines produce anti-FHA IgG antibodies (1, 20). High titers of anti-FHA IgA are also detected in the nasal secretions of convalescing patients after natural *B. pertussis* infections (16, 26). Moreover, the anti-FHA IgG and IgA antibody levels in the respiratory mucosa of mice infected intranasally with virulent *B. pertussis* (1) or immunized mucosally with purified FHA (24) are of long duration. The high infectivity of *B. pertussis*, the important level of secretion of FHA and its strong immunogenicity after nasal administration have prompted us to use surface-



exposed FHA for the presentation of heterologous antigens by recombinant *B. pertussis*. We have recently shown that a single intranasal administration of recombinant *B. pertussis* producing at its surface the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) genetically fused to FHA resulted in significant levels of anti-Sm28GST IgA antibodies in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids of mice (22). However, no serum anti-Sm28GST antibodies were detected. Here we demonstrate that in spite of the lack of anti-Sm28GST serum antibodies after intranasal administration of the recombinant *B. pertussis* strain, the mice were primed for the production of serum antibodies that were readily detectable after an intranasal boost of non-adjuvanted purified Sm28GST or after infection with *S. mansoni*. Sm28GST has been shown to confer protective immunity in several animal models including primates (3 - 5, 10), especially against the pathology-causing egg output and egg viability. We therefore also assessed the intranasal priming effect of the administration of the recombinant *B. pertussis* on protective immunity against egg output and worm burden. The results indicate that intranasal priming with the recombinant *B. pertussis* resulted in a significant reduction of intestinal egg output and worm burden after challenge with *S. mansoni*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** Streptomycin- and nalidixic acid-resistant *B. pertussis* BPSM (Sm<sup>r</sup> Nal<sup>r</sup>) (18) and recombinant *B. pertussis* BPGR60 (Sm<sup>r</sup> Nal<sup>r</sup>) containing an in-frame *Bam*HI fragment coding for Sm28GST in the *phaB* gene (22), were grown at 36°C on Bordet-Gengou agar (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 5% glycerol and 20% defibrinated sheep blood, and containing 100 µg/ml of streptomycin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 25 µg/ml of nalidixic acid (Sigma).

**Antigens.** Recombinant Sm28GST (rSm28GST) was produced in *Escherichia coli* TGE901 containing pTG54 (provided by Transgène S.A., Strasbourg, France) and was affinity purified as previously described (27). FHA was purified as described elsewhere (17) from *B. pertussis* BPRA, a strain in which the pertussis toxin gene had been deleted (2).

**Intranasal infection of mice.** After 48 h of culture, *B. pertussis* were resuspended at a concentration of approximately  $1.10^8$  colony-forming units (CFU)/ml in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Sublethal infections were performed by the intranasal route with 50 µl of the bacterial suspension deposited in the nostrils of 4-week-old OF1 mice (Iffa Credo, L'Arbesle, France) anaesthetized with 200 µl per 10 g of body weight of a solution of 5% sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) given intraperitoneally. To assess the initial numbers of viable *B. pertussis* in the lungs, five infected mice were killed 3 h after exposure. The lungs were removed aseptically and homogenized in 5 ml of PBS. Serially diluted homogenates from individual lungs were plated onto Bordet-Gengou agar, and the number of CFU were counted after 3 to 4 days of incubation at 36°C.

**Collection of fluids.** Mice under anaesthesia were bled by retro-orbital plexus puncture, the trachea was cannulated, and BAL fluids were recovered by three consecutive lavages with 0.5 ml of PBS. BAL fluids were centrifuged at 4,000 x *g* for 10 min to remove cells. Sera and BAL fluids were stored at -20°C until assayed for the presence of specific antibodies.

**Serum and lung antibody determination.** The level of antibodies to FHA and Sm28GST in sera and BAL fluids were determined by enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA). Microtiter plates (Immulon III; Dynatech Laboratories, Virginia, USA) were coated for 2 h 30 at 37°C with 50 µl/well of 10 µg/ml of FHA or Sm28GST diluted in PBS. For serum antibody determinations, pooled serum samples serially diluted in PBS containing 0.1% Tween (PBS/Tw) and containing 0.5% gelatine (PBS/Tw/g) were added to the coated plates after 3 washes in PBS/Tw and were incubated overnight at 4°C. The plates were incubated for 30 min at 37°C and washed three times in PBS/Tw before adding the goat horse radish peroxidase conjugate anti-mouse IgG (IgG-HRP; Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA) and incubating for 1 h 30 at 37°C. For lung antibody determination, the BAL fluids were added to the coated plates and incubated for one night at 4°C in PBS/Tw after 30 min saturation with PBS containing 0.5% gelatine and 3 washes with PBS/Tw. Anti-mouse IgA-biotin conjugates (Amersham, Bucks., U.K.) diluted in PBS/Tw/g were added and incubated for 1 h 30 at 37°C. After 5 washes with PBS/Tw, the streptavidin-HRP conjugate (Amersham) was added. After 6 washes with PBS/Tw, 1 mg/ml Orthophenyldiamine (Sigma) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.5), containing 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 50 µl of 2N HCl. The optical density (O. D.) was measured using a Titertek Multiscan MCC/340 reader at 492 nm and a linear regression curve of log (O. D.) versus the serum dilution was plotted. Results were expressed in titers, reported as the reciprocal of the dilution giving an O. D. three

times that of the conjugate control for the pooled serum samples or twice that of the conjugate control for the pooled BAL fluid samples.

***S. mansoni* challenge.** The life cycle of the Guadeloupe *S. mansoni* strain (kindly provided by Pr. C. Combes) was maintained using hamsters as definitive hosts and *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts. Mice were exposed percutaneously (25) to 70 *S. mansoni* cercariae. Whole body perfusion was carried out on day 42 or day 49 after infection and the worm burden was determined by counting using a light microscope. At the time of perfusion, the small intestine and the liver were collected and digested with 4% potassium hydroxide to estimate the numbers of eggs deposited in these tissues. The percentage of protection was calculated by the formula  $(A-B/A) \times 100$ , where A is the average parasite burden of the control group of 14 to 16 mice and B that of the experimental group of 9 to 12 mice. Student's *t*-test was used for the statistical analysis.

## RESULTS

**Induction of anti-Sm28GST immune response after priming with recombinant *B. pertussis* and intranasal boosting with purified Sm28GST.** The mucosal immune response obtained after a single nasal administration of *B. pertussis* BPGR60 producing the FHA-Sm28GST hybrid protein has been previously evaluated (22). Mice receiving BPGR60 produced high levels of anti-FHA serum antibodies but insignificant levels of anti-Sm28GST serum antibodies (see table I) that did not increase even three months after bacterial infection. However, as previously shown (22), the BAL fluids contained significant level of anti-Sm28GST IgA and IgG that lasted for more than one month after infection.

Although serum anti-Sm28GST antibody levels were insignificant after intranasal administration of BPGR60, we wished to investigate whether infection with this strain could nevertheless prime mice for a secondary serum antibody response when boosted with the purified antigen. Two months after the primary immunization with BPGR60, when clearance of bacteria was completed (22), the mice were boosted by a single intranasal administration of 20  $\mu$ g purified rSm28GST without adjuvant. Control mice were either not pre-infected or pre-infected with wild-type *B. pertussis* BPSM. Two weeks after the boost, a strong antibody response to Sm28GST was detected in the serum only of those mice that had previously received BPGR60 (Fig. 1a). No anti-Sm28GST antibody response was detected in the serum of naive or BPSM infected mice after a single administration of rSm28GST. Furthermore, a second intranasal administration of the purified rSm28GST to uninfected mice did not result in the production of detectable serum anti-Sm28GST antibodies (titer<20). These results indicate that the administration of BPGR60 is able to prime the mice for a strong anti-Sm28GST-

specific immune response in the serum after intranasal boosting with non-adjuvanted purified antigen.

The isotypic distribution of the antibody response against Sm28GST and against FHA was also evaluated. In the serum of mice that received BPGR60 and then rSm28GST, the anti-Sm28GST response showed a high level of specific IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes (Table I). In addition, a significant amount of serum anti-Sm28GST IgA was detected which was as high as the level of anti-FHA serum IgA. The isotypic pattern of the anti-FHA response showed high levels of IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes. A comparable anti-FHA antibody response was obtained after administration of wild-type *B. pertussis*, with or without administration of rSm28GST. Furthermore, no significant change in the level of anti-FHA serum antibodies was observed after the boost with rSm28GST.

The level of anti-Sm28GST IgA in the BAL fluids also increased in BPGR60-primed mice boosted with 20 µg of rSm28GST, with a maximal specific IgA production two weeks after the boost (Fig. 1b).

Previous results (22) have shown that BPGR60 was undetectable in the lungs 5 weeks after infection. However, it has been shown that *B. pertussis* can be internalized and survive within resident macrophages (8, 23). Therefore, the stress of an intranasal administration might conceivably restore bacterial growth. To test the possible impact of an intranasal administration, the lungs of mice intranasally boosted two months after infection with BPGR60 were removed one week later, and no viable bacteria were detected. Since *B. pertussis* is known to cause a strictly localized respiratory-tract infection, it is unlikely that BPGR60 disseminate et distal sites. The increase in the antibody level against Sm28GST therefore appears to result from the boost with rSm28GST following priming with BPGR60.

**Secondary immune response after infection with *S. mansoni*.** In mice a serum antibody response against Sm28GST during experimental *S. mansoni* infection can only be detected nine weeks after infection (S. Gaubert,

personal communication). In order to evaluate the capacity of the parasite to boost an immune response to Sm28GST in BPGR60-primed animals, mice were percutaneously infected with 70 *S. mansoni* cercariae two months after administration of BPGR60. Twenty days later, we detected low levels of serum anti-Sm28GST IgG which gradually increased up to the titer of 843, 42 days after parasite infection (Fig. 2a). The isotypic profile of this immune response was found to be similar to that obtained after the intranasal boost with rSm28GST (data not shown). In control mice that received either PBS or *B. pertussis* BPSM prior to infection with *S. mansoni*, no antibody response against Sm28GST was observed in the serum up to 42 days after *S. mansoni* infection.

Ten days after cercarial exposure, we also observed an increase in the level of anti-Sm28GST IgA in the BAL fluids of mice primed with BPGR60 (Fig. 2b). The level decreased 28 days after the parasite infection. No detectable antibody to Sm28GST was found in infected control mice. The challenge infection with the parasite thus appeared to boost both serum and pulmonary immune responses to Sm28GST in mice primed with the recombinant *B. pertussis* strain.

**Protection against *S. mansoni* after intranasal infection with BPGR60.** It has previously been shown that immunization with Sm28GST can result in significant protection against *S. mansoni* challenge in several animal models (3 - 5, 10). It is of particular interest that such immunization may reduce the parasite fecundity and egg viability (4). Since granuloma formation around the deposited eggs is the major pathogenic trait of *S. mansoni* infection, this property of Sm28GST immunization may not only limit the spread of the infection but also lessen the pathological features. Even a relatively modest decrease in egg output may have a significant impact in the decrease of pathology. Since maximal protection conferred by Sm28GST in the mouse usually does not exceed 40 to 50%, the mouse model may not be the most appropriate one to evaluate protective efficacy of Sm28GST-based vaccines. We nevertheless wanted to assess whether

intranasal administration of BPGR60 and subsequent intranasal boosting with purified rSm28GST may have any protective effect in mice. A challenge with 70 cercariae was therefore performed one week after the boost when the levels of antibodies to Sm28GST in the serum and the BAL fluids were high (see Fig. 1). A significant reduction in worm burden (about 33%) (Table II) was obtained in the group of these mice. In addition, a significant reduction of the number of tissue eggs (42%) was obtained. In mice that had received only BPGR60, the worm number was slightly reduced (about 16%), although this was not statistically significant. However, in this group, a weak reduction in tissue egg numbers was recorded (28%,  $p=0,027$ ). A single intranasal administration of rSm28GST or wild-type *B. pertussis* did not show any significant protective effect. However, the nasal administration of the wild-type *B. pertussis* followed by a boost with rSm28GST was associated with a small but non significant reduction in worm burden and egg output. Pooled sera of mice immunized with BPGR60 alone or with BPGR60 followed by rSm28GST and collected three days before perfusion, contained anti-Sm28GST IgG titers of 815 and 1128, respectively. Pooled sera from the other groups of mice showed titers lower than 160.



## DISCUSSION

We have previously shown that intranasal infection with a recombinant *B. pertussis* strain producing Sm28GST fused to FHA at the surface of the microorganism resulted in significant anti-Sm28GST IgA in the BAL fluid without detectable levels of specific serum antibodies (22). The aim of this study was to evaluate the priming potential of intranasal administration of this strain for serum antibodies and protection against infection by *S. mansoni*. This parasite model was chosen because the mucosal route of immunization may be most appropriate for vaccination in developing countries particularly affected by parasitic diseases. Here, we found that BPGR60-primed mice intranasally boosted with purified rSm28GST produced high titers of anti-Sm28GST serum antibodies. These serum antibodies against Sm28GST were still found three months after the boost, whereas no antibody response to Sm28GST was detected in the sera of mice even after two nasal immunizations with rSm28GST at a month interval or after priming with the non-recombinant *B. pertussis* parent strain BPSM. The strong specific antibody response observed after boosting with rSm28GST can thus be attributed to a priming effect of infection with BPGR60. In addition, anti-Sm28GST IgA antibodies were found in BAL fluids of BPGR60 immunized-mice, which may trap the antigen as IgA-antigen complexes. It has been shown that such IgA-antigen complexes adhere to M-cells of Peyer's patches much more efficiently than do the uncomplexed antigens (30). M-cells are involved in the transcytosis of antigens across the mucosal epithelium. Since they are found in mucosal surfaces of both the respiratory tract and the gut-associated lymphoid tissue (14, 19), this uptake mechanism of IgA-antigen complexes could also occur with M-cells in bronchus-associated lymphoid tissue and may increased M-cell transcytosis of the antigen, enhance antigen presentation via IgA-mediated Fc $\alpha$  receptor interaction on the surface of cells present in the MALT (14) and therefore considerably contribute to the secondary immune response.

The anti-Sm28GST isotype profile showed the presence of IgG1, IgG2a and IgG2b, as well as IgA in the sera of mice infected with BPGR60 and then boosted with rSm28GST, suggestive of a mixed Th1/Th2 type response. In order to confirm the involvement of the two T-cell subpopulations, studies are underway to investigate the cytokine secretion profiles of antigen-stimulated cells. The isotype distribution of anti-FHA antibodies in the sera of BPGR60-infected mice showed slight differences compared to the anti-Sm28GST response but also corresponded to a mixed profile as defined by the presence of IgG1, IgG2a and IgG2b. A significant amount of serum anti-FHA IgA was also detected in these mice. The antibody response to FHA was quantitatively and qualitatively similar to that found in mice infected with the wild-type *B. pertussis*, indicating that the fusion of Sm28GST to FHA did not modify the immunogenicity of the FHA.

However, serum antibodies to Sm28GST were found only after intranasal boost with recombinant antigen, whereas serum anti-FHA antibodies were detected after a single BPGR60 administration. This discrepancy could be the result of the intrinsic characteristics of the FHA-Sm28GST hybrid protein. The FHA (220 kDa) is a much larger molecule than Sm28GST (28 kDa), suggesting a higher number of epitopes on FHA compared to Sm28GST. In addition, FHA seems to be a much more immunogenic protein than Sm28GST since a similar level of serum antibody response specific of each antigen is obtained after nasal administration of both purified antigens associated in a liposome in a FHA/Sm28GST ratio of 1/100 (mol/mol) (Poulain-Godefroy, O. personal communication).

When the mice were challenged with *S. mansoni* cercariae after a single infection with BPGR60, a serum immune response against Sm28GST was detectable three weeks after challenge, and its level increased thereafter continuously for at least up to 42 days. This is in sharp contrast to the lack of detectable anti-Sm28GST antibodies in parasite-infected mice that had previously received either PBS or BPSM, and again confirmed that BPGR60 is able to prime mice for a specific serum anti-Sm28GST antibody response occurring after

challenge. The slow release of Sm28GST by the parasite, as well as the antigens released by killed worms, might explain the immune response observed in these BPGR60-primed mice infected by *S. mansoni*.

Previous experiments (3, 4) in the mouse model have shown that two subcutaneous immunizations of rSm28GST adjuvanted either with aluminium hydroxide or complete Freund's adjuvant resulted in a reduction in worm burden and egg counts after experimental *S. mansoni* infection. However, in this model the levels of protection were at best in the range of about 40 %. Here, we found that intranasal immunization of mice with BPGR60 followed by an intranasal boost with purified rSm28GST resulted in a similar level of protection against challenge with *S. mansoni* performed one week after the boost. This protection resulted in the reduction of worm burden as well as of egg charge. It appears therefore that the mucosal administration of a Sm28GST-based vaccine using priming by recombinant *B. pertussis* may protect as effectively as subcutaneously administered vaccines. In addition, we observed 34.2% protection ( $p=0.0048$ ) when the animals were challenged 14 weeks after the boost, at a time when the level of anti-Sm28GST antibodies had strongly decreased (titer of 258). In contrast, a single nasal administration of purified rSm28GST did not show any protective effect nor did it induce priming for a secondary response with either rSm28GST or *S. mansoni* infection.

These observations suggest that even at low levels of antibodies, BPGR60-primed mice may be at least partially protected. This contention was further supported by the finding that although a single nasal administration of BPGR60 did not induce an antibody response to Sm28GST in the serum before *S. mansoni* infection, a reduction of the egg charge was nevertheless observed, accompanied by a slight but non-significant reduction in worm burden. The difference in the effect on worm burden and on egg output after only priming with BPGR60 may be the result of a differential effect of boosting by infection with *S. mansoni* on these two parameters. It is tempting to speculate that infection with *S. mansoni* boosted the

anti-Sm28GST antibody level in such a manner that it had a more profound bearing on fecundity than on worm viability. This may be particularly interesting, since pathology in schistosomiasis is mainly associated with inflammation around the parasite eggs deposited in the host tissues. Even a decrease in egg number by a factor of two would significantly decrease pathology (6). This suggests that non-invasive intranasal priming by live vectors such as *B. pertussis* may have some potential in diminishing pathology and perhaps transmission. We showed thus for the first time that it is possible to induce a protective immune response against *S. mansoni* after nasal immunization using Sm28GST, one of the candidate molecules against schistosomiasis selected by the W. H. O. (31). In addition, the presence of specific serum anti-Sm28GST IgA in BPGR60 immunized-mice is in favour of a protective efficacy of our strategy. Indeed, it has recently been found that the acquisition of resistance to reinfection in human populations is closely associated with the presence of anti-Sm28GST IgA (11).

In conclusion, this study indicates that intranasal immunization with a recombinant *B. pertussis* strain primes mice both for a specific serum immune response against a heterologous protein fused to FHA and for protection. The genetic stability of the chromosomal construction used here, as well as its potential to deliver other foreign antigens, make recombinant *B. pertussis* a novel promising candidate as a live vector for nasal vaccination. Of course, since even BPGR60 is a fully virulent *B. pertussis* strain, it cannot be administered as a live vaccine to humans. We are therefore currently developing new, attenuated strains of *B. pertussis* with the hope to maintain immunogenicity against the foreign antigens while eliminating the pathogenicity of the vector.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to G. Renauld-Mongénie for providing the recombinant *B. pertussis* BPGR60 strain, Transgene for *E. coli* TGE901(pTG54), and C. Combes for the Guadeloupe *S. mansoni* strain. We thank J. Fontaine for technical assistance and helpful advice in the *S. mansoni* infection experiments, M. Leroux for preparation of parasites, J.-L. Neyrinck for anti-Sm28GST IgG and for help with statistical analysis, and O. Poulain-Godefroy for helpful discussion. This work was supported by European Economy Community contract B102CT-CT930111, by the Institut Pasteur de Lille, the Région Nord-Pas-de-Calais, INSERM, and Volvic. N. M. holds a fellowship of Région Nord-Pas-de-Calais.

## REFERENCES

1. **Amsbaugh, D., Z. M. Li, and R. Shahin.** 1993. Long-lived respiratory immune response to FHA following *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* **61**:1447-1452.
2. **Antoine, R., and C. Loch.** 1990. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect. Immun.* **58**:1518-1526.
3. **Balloul, J.-M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron.** 1987. A purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental Schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**:3448-3453.
4. **Boulanger, D., G. D. F. 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**:473-490.
5. **Boulanger, D., A. Warter, F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, F. Audibert, D. Couret, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, R. Pierce, J.-P. Lecocq, B. Sellin, and A. Capron.** 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.
6. **Capron A.** 1992. Immunity to schistosomes. *Curr. Opin. Immunol.* **4**:419-424.

7. **Curtiss, R., III.** 1990. Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens, p. 161-188. In G. C. Woodrow and M. M. Levine (ed.), *New generation vaccines: the molecular approach*. Marcel Dekker, Inc., New York.
8. **Friedman, R. L., K. Nordensson, L. Wilson, E. T. Akporiaye, and D. E. Yocum.** 1992. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **60**:4578-4585.
9. **Greco, D., S. Salmaso, P. Mastrantonio, M. Giuliano, A. E. Tozzi, A. Anemona, M. L. Ciofi Degli Atti, A. Giammanco, P. Panei, W. C. Blackwelder, D. L. Klein, S. G. F. Wassilak, and the Progetto Pertosse Working group.** 1996. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N. Engl. J. Med.* **334**:341-348.
10. **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**:454-460.
11. **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**:527-535.
12. **Hannah, J. H., F. D. Menozzi, G. Renauld, C. Locht, and M. J. Brenann.** 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin: filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* **62**:5010-5019.

13. **Jacobs, W. R., Jr., S. B. Snapper, L. Lugosi, and B. R. Bloom.** 1990. Development of BCG as a recombinant vaccine delivery vehicle. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **155**:153-160.
14. **Kraehenbuhl, J. P., and M. R. Neutra.** 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* **72**:853-879.
15. **Locht, C., P. Bertin, F. D. Menozzi, and G. Renaud.** 1993. The filamentous hemagglutinin, a multifaced adhesin produced by virulent *Bordetella spp.* *Mol. Microbiol.* **9**:653-660.
16. **Long, S., C. J. Welkon, and J. L. Clark.** 1990. Widespread silent transmission of pertussis in families: antibodies correlates of infection and symptomatology. *J. Infect. Dis.* **161**:480-486.
17. **Menozzi, F. D., C. Gantiez, and C. Locht.** 1991. Interaction of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**:59-64.
18. **Menozzi, F. D., R. Mutombo, G. Renaud, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Locht.** 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**:769-778.
19. **Pankow, W., and P. von Wichert.** 1988. M cell in the immune system of the lung. *Respiration.* **54**:209-219.
20. **Redd, S. C., H. S. Rumschlag, R. J. Biellik, G. N. Sanden, C. B. Reimer, and M. L. Cohen.** 1988. Immunoblot analysis of humoral immune



response following infection with *Bordetella pertussis* or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. J. Clin. Microbiol. **26**:1373-1377.

21. **Relman, D., E. Tuomanen, S. Falkow, D. T. Golenbock, K. Saukkonen, and S. D. Wright.** 1990. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 ( $\alpha_M\beta_2$  CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Cell **61**:1375-1382.

22. **Renauld-Mongénié, G., N. Mielcarek, J. Cornette, A.-M. Schacht, A. Capron, G. Riveau, and C. Locht.** 1996. Induction of mucosal immune response against an heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:7944-7949.

23. **Saukkonen, K., C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad, and E. Tuomanen.** 1991. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. J. Exp. Med. **173**:1143-1149.

24. **Shahin, R. D., D. Amsbaugh, and M. F. Leef.** 1992. Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. Infect. Immun. **60**:1482-1488.

25. **Smithers, S. R., and R. J. Terry.** 1969. The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology **55**:695-706.

26. **Thomas, M. G., L. A. E. Ashworth, E. Miller, and H. P. Lambert.** 1990. Nasal immunoglobulin A responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and

immunization with whole-cell pertussis vaccine, p. 330-334. *In* C. R. Manclark (ed.), Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis. Department of Health and Human Services publication no. 90-1194. Department of Health and Human Services, Bethesda.

27. **Trottein, F., M. C. Vaney, B. Bachet, R. J. Pierce, N. Colloc'h, J. P. Lecocq, A. Capron, and J. P. Mormon.** 1992. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione *S*-transferase from *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.* **224**:515-518.

28. **Tuomanen, E., H. Towbin, G. Rosenfelder, D. Braun, G. Larson, G. C. Hansson, and R. Hill.** 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Exp. Med.* **168**:267-277.

29. **Walker, R. I.** 1994. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* **12**:387-400.

30. **Weltzin, R. A., P. Lucia Jandris, P. Michetti, B. N. Fields, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 1989. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J. Cell. Biol.* **108**:1673-1685.

31. **World Health Organization.** 1995. Schistosomiasis, p. 77-86. *In* Tropical Disease Research. Twelfth Programme report., UNDP/World bank/WHO eds.

**Table 1:** Serum antibody titers specific for FHA and Sm28GST after intranasal immunization with recombinant or wild-type *B. pertussis*.

Immunization protocol <sup>a</sup>	Antibody against:	---titers in the serum				
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA
<b>BPSM / PBS</b>	FHA	610	1790	1540	40	120
	Sm28GST	<20	40	<20	<20	40
<b>BPGR60 / PBS</b>	FHA	740	2440	1670	40	140
	Sm28GST	40	40	40	<20	80
<b>BPSM / rSm28GST</b>	FHA	570	1660	740	50	200
	Sm28GST	<20	<20	<20	<20	30
<b>BPGR60/ rSm28GST</b>	FHA	1030	2670	1080	80	70
	Sm28GST	3000	2250	2150	40	130

<sup>a</sup> OF1 mice were intranasally immunized with  $5.10^6$  CFU of recombinant BPGR60 or wild-type BPSM and intranasally boosted two months later with 20  $\mu$ g of rSm28GST or with PBS. The sera were collected 14 days later. The isotypic distribution of the antibody responses in the pooled serum samples was evaluated by ELISA.

**Table II** : Protective effect of immunization against challenge with *S. mansoni* cercariae.

Immunization protocol <sup>a</sup>	Worm recovery <sup>b</sup>	% Protection <sup>c</sup>	Egg charge <sup>d</sup>	% Reduction <sup>e</sup>
PBS	27,5 ± 1,7		17 535 ± 973	
PBS / rSm28GST	27,2 ± 3,2	1,02 (p=0.46)	15 997 ± 776	8,77 (p=0.17)
BPGR60	23,2 ± 2,3	15,64 (p=0.13)	12 974 ± 1674	27,72 (p=0.016)
BPGR60 / rSm28GST	18,3 ± 3,6	33,35 (p=0.0087) *	10 109 ± 1466	42,35 (p=0.0001)*
BPSM	26,4 ± 2,1	4,00 (p=0.35)	14 806 ± 1479	15,56 (p=0.06)
BPSM / rSm28GST	24,5 ± 1,9	10,77 (p=0.15)	14 495 ± 850	17,34 (p=0.027)

a: OF1 mice were intranasally immunized with  $5 \cdot 10^6$  CFU of recombinant BPGR60 or wild-type BPSM and boosted or not two months later with 20 µg of rSm28GST.

b: Mice were infected with 70 *S. mansoni* furcocercariae. The number of adult worms was determined by portal perfusion 6 weeks later.

c: The percentage of protection is calculated by comparison with numbers of worms recovered from the control group.

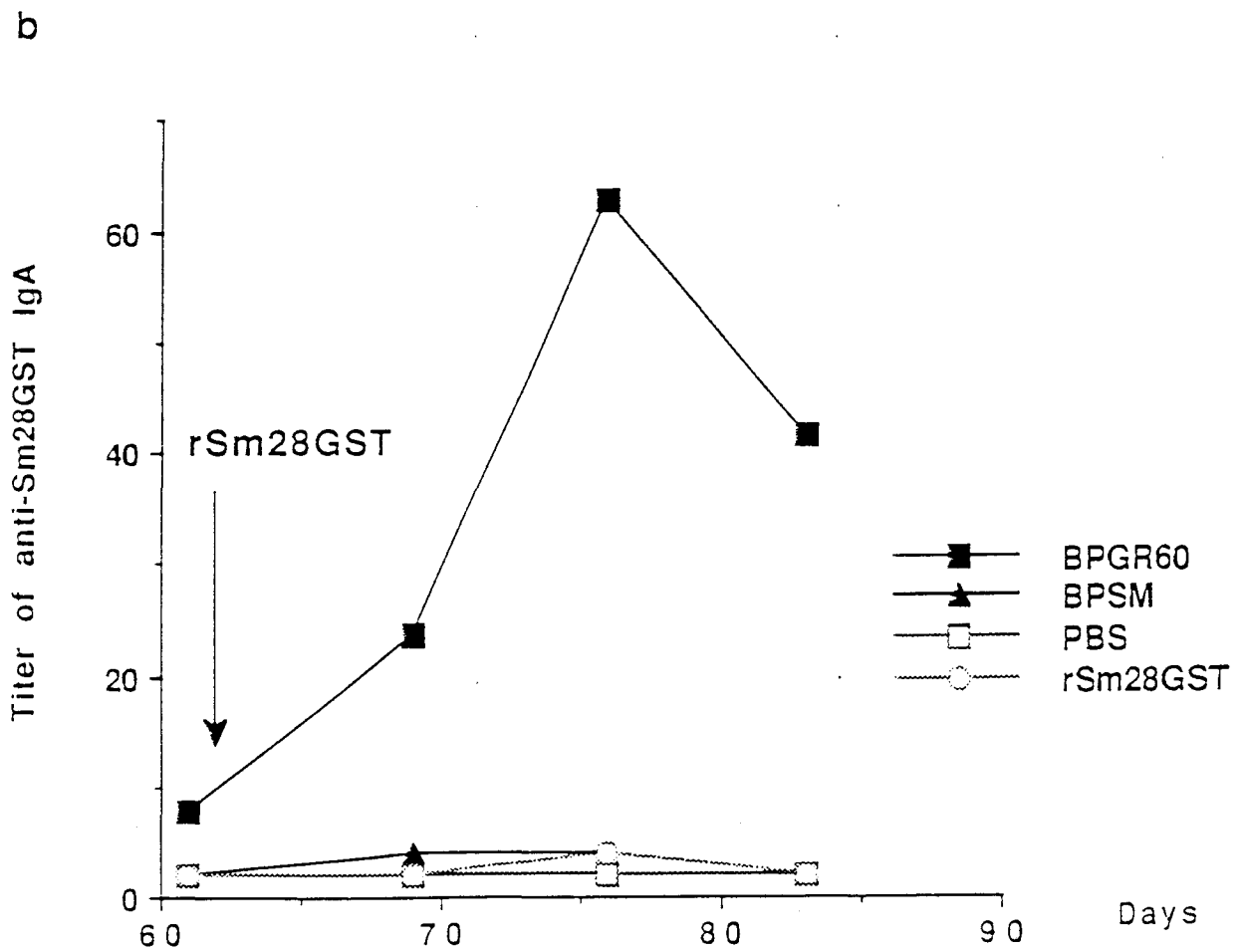
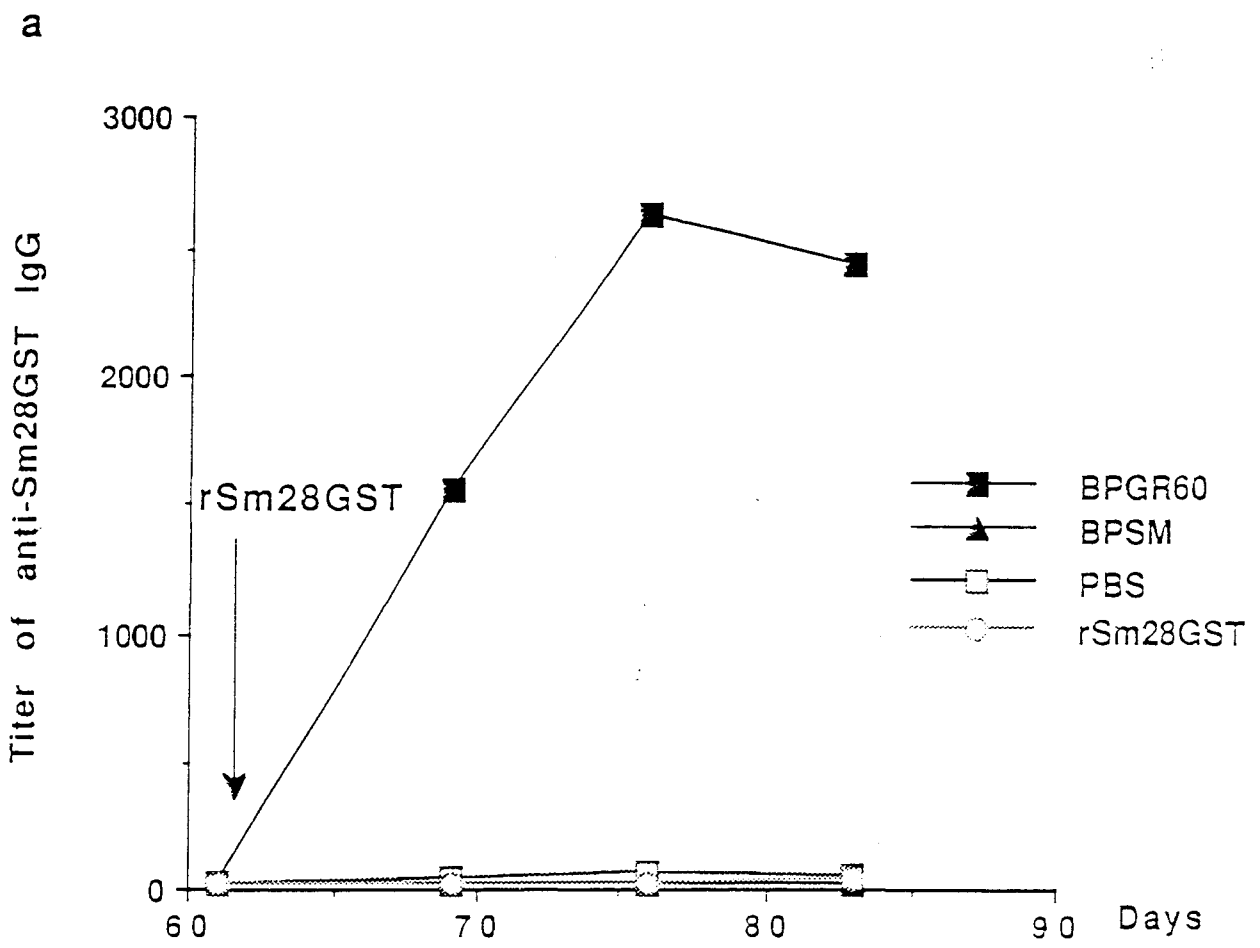
d: The egg charge was expressed for each mouse as the number of eggs per gr. of intestine and liver combined. The mean ± standard deviation of the egg charge is presented for each group of mice.

e: The percentage of reduction is calculated by comparison with numbers of eggs recovered from the control group.  
significant \* at  $p < 0,01$  (Student's *t*-test).

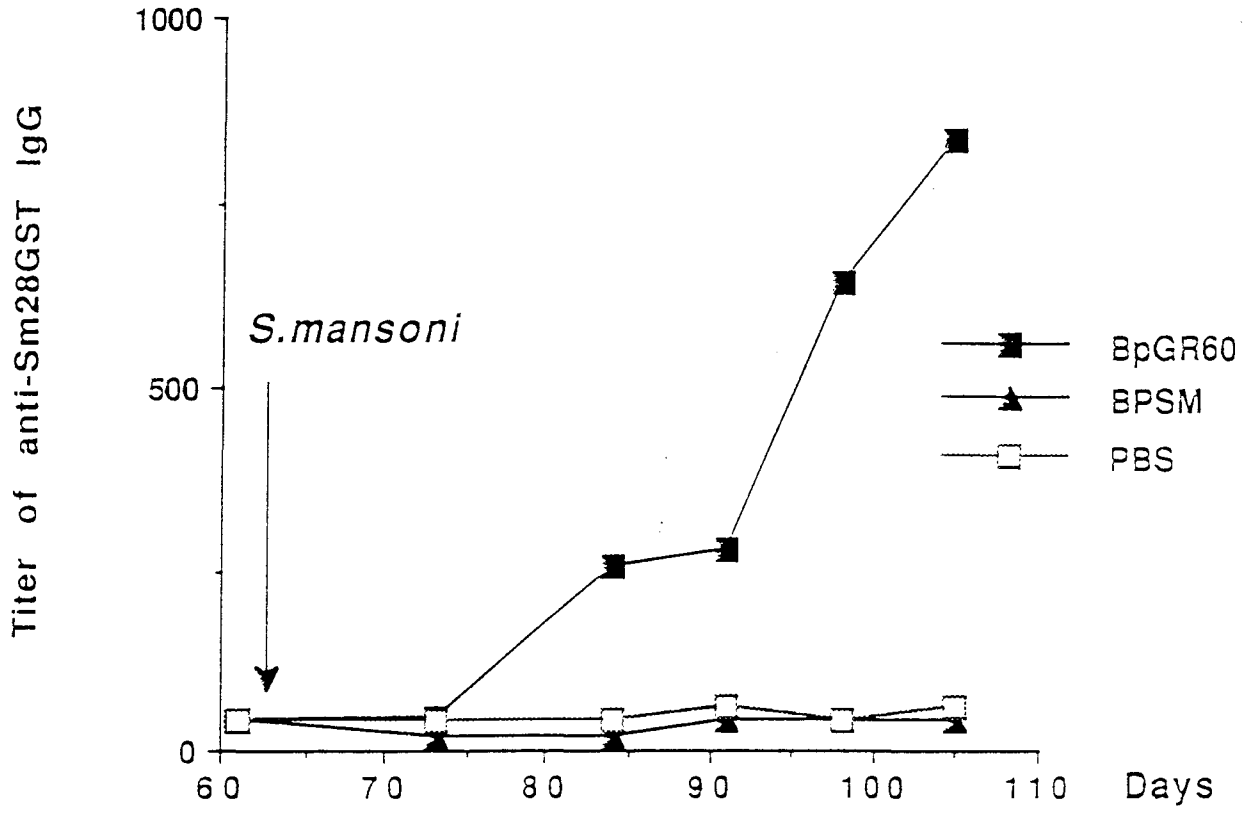
## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Anti-Sm28GST antibody response after intranasal administration of BPGR60 and intranasal boost with rSm28GST. (a) Serum IgG antibody response, (b) IgA antibody response in the BAL fluids. OF1 mice were intranasally immunized with either 20  $\mu$ g of purified rSm28GST (open circles),  $5.10^6$  CFU of BPGR60 (closed squares),  $5.10^6$  CFU of the wild type parent strain BPSM (closed triangles) or PBS (open squares), then and intranasally boosted two months later with 20  $\mu$ g of purified rSm28GST (as indicated by the arrow). Pooled serum samples of 5 OF1 mice per time point were assessed for the presence of anti-Sm28GST antibodies by ELISA.

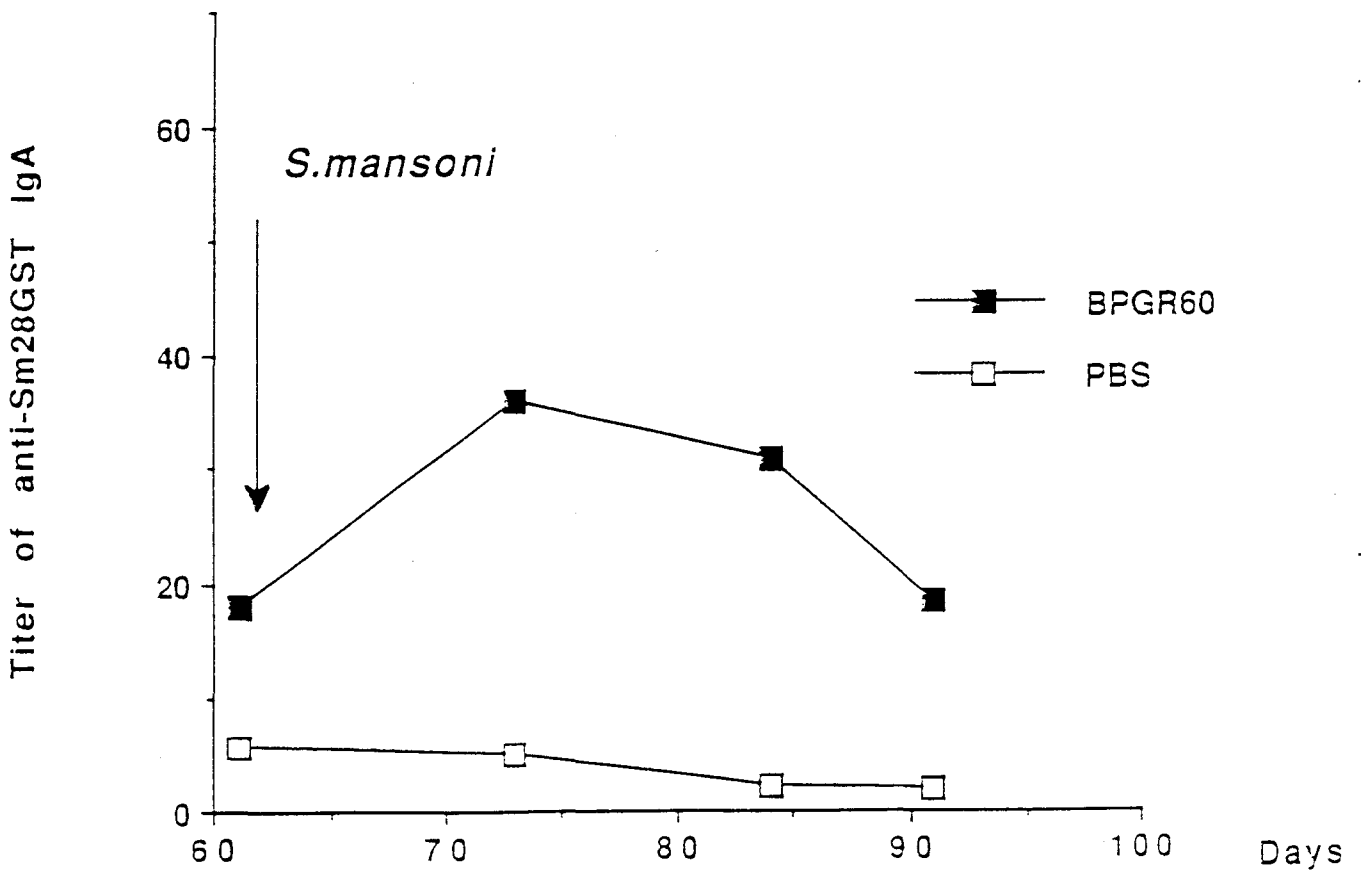
FIG. 2. Anti-Sm28GST antibody response after intranasal administration of BPGR60 and challenge with *S. mansoni* infection. (a) Serum IgG antibody response, (b) IgA antibody response in the BAL fluids. OF1 mice are immunized with  $5.10^6$  CFU of BPGR60 (closed squares),  $5.10^6$  CFU of BPSM (closed triangles) or PBS (open squares), and infected two months later with 70 *S. mansoni* furcocercariae as indicated by the arrow. Pooled serum samples of 5 OF1 mice per time point were assessed for the presence of anti-Sm28GST antibodies by ELISA.



a



b



Malgré l'absence d'activité enzymatique de la Sm28GST fusionnée à la FHA, nous avons étudié la capacité des anticorps anti-Sm28GST produits suite à l'administration de la souche BPGR60 et du rappel avec la rSm28GST, à inhiber l'activité enzymatique de la rSm28GST (cf. Annexe technique). Aucune activité de cette sorte n'a pu être mise en évidence dans les sérums des souris immunisées avec la BPGR60, 1, 2, ou 3 semaines après le rappel. Ce résultat est en accord avec le fait qu'aucune réduction de la fécondité des vers femelles (nombre d'oeufs par gr. d'organes et par ver femelle) n'a pu être observée, cette réduction étant liée à l'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST

Des expériences complémentaires ont également été réalisées afin de déterminer si l'administration intranasale de BPGR60 était capable de stimuler la production d'anticorps sériques anti-Sm28GST chez des souris préalablement immunisées avec la même souche recombinante BPGR60. Le protocole utilisé est identique à celui réalisé avec le rappel rSm28GST. Les souris sont immunisées avec  $5.10^6$  bactéries BPGR60 par voie intranasale, puis deux mois plus tard, rappelées avec la même quantité de bactéries.

L'analyse par ELISA de la réponse anticorps dans les LBA montre une augmentation du taux d'IgA anti-Sm28GST 7 jours après la seconde administration de BPGR60, suivie par une diminution rapide de cette réponse locale (Fig. 12).



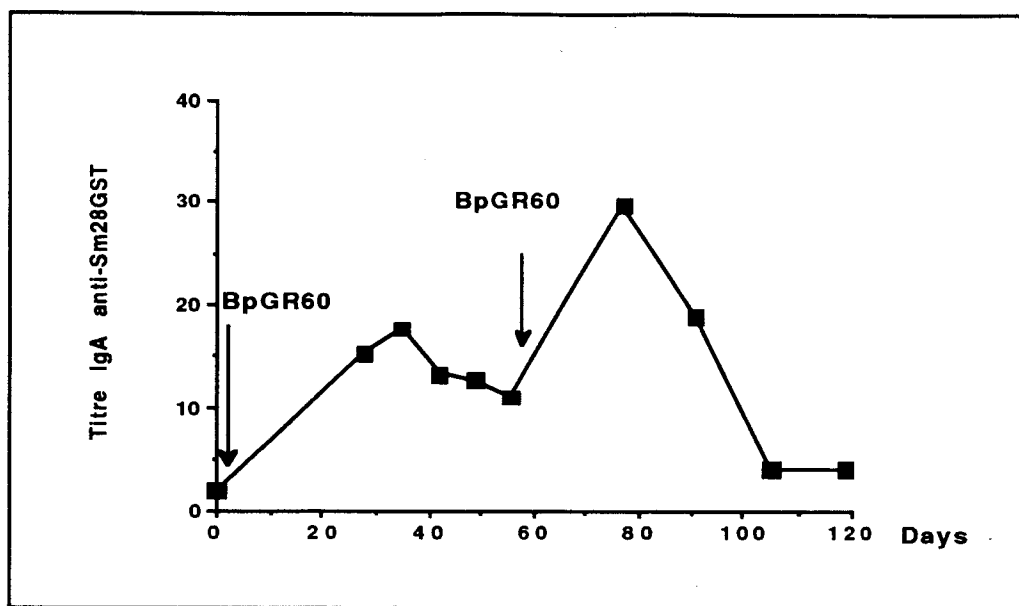


Fig. 12: Cinétique de la réponse IgA anti-Sm28GST dans les lavages bronchoalvéolaires des souris immunisées avec BpGR60 et rappelées 2 mois plus tard avec la même souche de *B. pertussis*. L'analyse est effectuée par test ELISA sur des pools de 5 souris par point.

Néanmoins, aucune réponse sérique spécifique de la Sm28GST n'a pu être mise en évidence après le rappel avec la souche BpGR60. Deux hypothèses pourraient expliquer cette absence de réponse anti-Sm28GST dans le sérum:

- L'intensité de la réponse anti-FHA pourrait en être à l'origine. En effet, il semblerait que la FHA soit une protéine beaucoup plus immunogénique que la Sm28GST (voir table I article: "Enhanced immunogenicity of glutathion S-transferase liposomes by addition of filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*"). La réponse sérique induite suite au rappel avec la souche BpGR60 pourrait donc être fortement orientée vers la production d'anticorps anti-FHA, au détriment de la réponse anti-Sm28GST.

- L'absence de réponse sérique anti-Sm28GST chez les souris ayant reçu deux administrations intranasales de la souche BpGR60 pourrait également être le résultat d'une rapide élimination des bactéries lors de la seconde administration. La durée de cette présence ne se révélerait pas suffisante pour induire une réponse secondaire sérique anti-Sm28GST.

Cette hypothèse se trouve confirmée par les résultats obtenus lors de l'étude de la colonisation de la souche sauvage BPSM chez des souris préalablement immunisées avec la souche BpGR60. En effet, on observe une réduction significative du nombre des bactéries de la souche BPSM dans les poumons de souris préalablement infectées avec la

souche BPGR60. Le contrôle de colonisation consiste en une administration de la souche sauvage chez des souris saines.

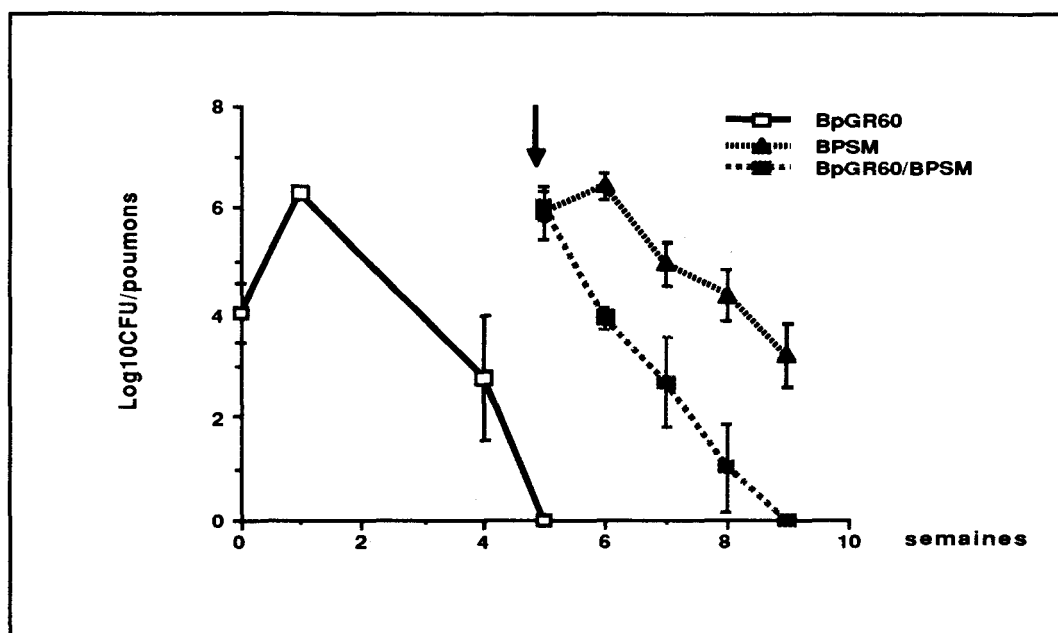


Fig. 13: Cinétique de colonisation de la souche sauvage BPSM de *B. pertussis* chez des souris préalablement infectées avec BPGR60. Le nombre de bactéries est évalué dans les poumons de trois souris à chaque point.

Ces résultats indiquent donc que la souche recombinante BPGR60 est non seulement capable d'induire une immunité protectrice contre *S. mansoni*, mais est également capable de prévenir la colonisation des poumons par la souche sauvage de *B. pertussis*.

L'ensemble de ces résultats sont très prometteurs dans l'optique d'utilisation de ce vecteur vivant comme vaccin polyvalent.



### III. Atténuation des souches de *B. pertussis*.

BPGR60 étant une souche virulente de *B. pertussis*, elle ne peut être administrée comme vecteur vivant chez l'homme. Nous nous sommes donc employés à atténuer cette souche recombinante avec l'espoir de diminuer la pathogénicité du vecteur tout en conservant son immunogénicité.

Ce travail est détaillé dans l'article : "Enhanced immunogenicity of attenuated *Bordetella pertussis* used for homologous and heterologous protection" soumis à "Science", et a fait l'objet du dépôt d'un brevet .

Dans un premier temps, nous avons voulu définir une souche vivante atténuée de *B. pertussis* capable de coloniser le tractus respiratoire des souris et de les protéger contre une colonisation par la souche sauvage virulente. Les résultats obtenus nous indiquent que seule la souche BPRA, déficiente dans la production de la toxine de pertussis (PTX), se comporte *in vivo* de façon similaire à la souche sauvage et qu'une primo-infection par cette souche empêche la colonisation efficace des muqueuses respiratoires par la souche sauvage.

Une étude immunologique de la réponse en anticorps sériques contre des antigènes de *B. pertussis* a ensuite été effectuée. Il s'est avéré que l'administration intranasale de la souche dépourvue du gène de la toxine de pertussis (BPRA) induit une production élevée d'anticorps dirigés contre la FHA, comparée à l'administration de la souche parentale virulente. Le profil isotypique de cette réponse sérique anti-FHA est identique chez les souris ayant reçu les souches BPRA ou BPSM. D'autre part, nous avons pu montrer que la présence de la sous-unité S1 joue un rôle essentiel sur l'augmentation de la production d'IgG anti-FHA, suggérant que l'activité enzymatique de PTX serait impliquée dans la réduction de la réponse sérique contre l'adhésine majeure de *B. pertussis*, la FHA.

La suite de notre étude réside dans l'exploitation de cette réponse spécifique anti-FHA élevée obtenue chez la souris après immunisation avec la souche atténuée BPRA pour induire une réponse anticorps sérique contre un antigène hétérologue fusionné à la FHA. Nous avons donc voulu mettre à profit l'atténuation d'une souche de *B. pertussis* pour l'utiliser comme vecteur recombinant vivant administrable par voie nasale. Dans ce but, le gène codant pour la toxine de pertussis a été délété de la souche BPGR60; la souche ainsi obtenue est nommée BPNX.

Alors qu'aucune réponse sérique spécifique de la Sm28GST n'est obtenue après administration nasale de la souche recombinante virulente BPGR60, des IgG anti-Sm28GST sont détectés dès le quatorzième jour suivant l'administration de la souche recombinante atténuée BPNX et leur production augmente de manière continue jusque 35 jours après administration. Deux mois après l'immunisation, une diminution de ce taux d'anticorps sérique anti-Sm28GST est observée chez les souris infectées par BPNX alors que cette réponse n'est toujours pas détectée chez les souris infectées par BPGR60. Dans les semaines qui suivent le rappel avec la rSm28GST, une production d'anticorps anti-Sm28GST est mise en évidence chez les souris infectées par BPGR60, mais elle reste plus faible que celle obtenue chez les souris infectées par BPNX.

Ces résultats montrent donc une corrélation entre la délétion chromosomique du gène codant pour PTX et l'augmentation de la réponse anticorps sérique dirigée contre un antigène hétérologue fusionné à la FHA. A quantité de bactéries similaire, une seule administration par voie nasale d'une souche recombinante atténuée de *B. pertussis* permet donc d'induire une réponse sérique spécifique de l'antigène hétérologue fusionné à la FHA, alors qu'un rappel était nécessaire avec la souche recombinante virulente.

La protection induite par cette souche recombinante atténuée contre une infection par *S. mansoni* a ensuite été évaluée. Une protection de l'ordre de 60% en termes de réduction du nombre de vers et de la charge en oeufs, comparée aux souris non-immunisées, est observée suite à l'administration de BPNX.

Increased immunogenicity of attenuated live *Bordetella pertussis* as homologous and heterologous vaccine

Nathalie Mielcarek<sup>1</sup>, Gilles Riveau<sup>1</sup>, Franck Remoué<sup>1</sup>, André Capron<sup>1</sup> and Camille Locht<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167, and <sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

\*Corresponding author : Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire

INSERM U447, Institut Pasteur de Lille

1, Rue du Prof. Calmette

F-59019 Lille Cedex, France

Tel. : (+33) 3 20.87.77.28

Fax : (+33) 3 20.87.79.06

E-mail : [camille.locht@pasteur-lille.fr](mailto:camille.locht@pasteur-lille.fr)

Mielcarek et al.

While single-dose mucosal immunization is best achieved by the use of attenuated live microorganisms, attenuation generally results in decreased immunogenicity. We attenuated *Bordetella pertussis* by the deletion of the pertussis toxin gene. A single intranasal administration of this strain protected against subsequent challenge as well as did the parent strain or immunization with commercial vaccine. Unexpectedly, this attenuation resulted in increased immunogenicity against the protective antigen filamentous hemagglutinin (FHA). In addition, immunogenicity was also enhanced against the *Schistosoma mansoni* Sm28GST genetically fused to FHA, resulting in protection against parasite worm burden and egg charge after a single intranasal administration. Thus, attenuated recombinant *B. pertussis* strains are promising vectors for protection against pertussis and heterologous diseases.

Whooping cough, caused by *Bordetella pertussis*, remains a highly significant childhood disease world wide with an estimated 500,000 annual deaths and over 50 million cases each year (1). Although the introduction of very successful whole-cell vaccines has resulted in a dramatic decrease of pertussis, especially in the developed world, several limitations of such vaccines have reduced compliance and have caused an increase in whooping cough incidence in the recent years in various countries. These limitations include the sometimes serious side-effects ascribed to the whole-cell vaccines, the need of repeated vaccine administrations to provide optimal protection, high variability in protective efficacies among vaccine lots, and waning of immunity following vaccination (2), which caused a shift in pertussis incidence from infants to adolescents and adults (3).

Several new, acellular vaccines have been developed recently. Although found to be efficacious, generally safer and more immunogenic than the whole-cell vaccines (4), these new vaccines still require multiple administrations, probably do not provide life-long immunity and are more expensive than the previous vaccines, which will make them less attractive for developing countries, where such vaccines are most urgently needed.

In contrast to vaccination, which provides protection of limited duration, natural infection with *B. pertussis* provides life-long protection (2, 5). An interesting alternative over the use of whole-cell or acellular pertussis vaccines would therefore be that of attenuated live *B. pertussis* that can be administered mucosally. In addition to mimicking the natural route of infection, live vaccines can also be used as vectors for the delivery of heterologous antigens (6) to protect simultaneously against pertussis and other infections (7). So far, however, genetic attenuation of pathogens have always resulted in decreased immunogenicity, and repeated doses of large amounts of the organism had to be applied to achieve any protective effect (8).

Taking advantage of the increased knowledge on the molecular mechanism of *B. pertussis* pathogenesis, we attenuated this organism by genetic alterations of pertussis toxin, a key virulence factor in pertussis. Similar to previous reports (9, 10) the deletion of the pertussis toxin gene from the chromosome in strain BPRA (11) resulted in strong attenuation, as evidenced by the absence of systemic effects, such as lymphocytosis, in BPRA-infected mice, and by the much reduced inflammation of the airways compared to mice infected with BPSM, the wild type parent strain (not shown). In spite of this attenuation, a single intranasal administration of BPRA resulted in significant protection against subsequent challenge with the wild-type strain BPSM (Fig. 1). This protection was equivalent to that provided by vaccination with commercially available pertussis vaccine or by infection with the wild type strain BPSM, indicating that pertussis toxin is not an absolute requirement for protection, even though it is the major antigen included in all new, acellular pertussis vaccines (4). Seven days after challenge, the amounts of organisms recovered from the lungs were not significantly different from those recovered from lungs of animals that had previously been infected with the wild type strain and were slightly lower than those recovered from mice immunized with pertussis vaccine. In contrast, mice that were previously inoculated with *Salmonella typhimurium* or *B. pertussis* BP347, a strain deficient for the production of all virulence factors and protective antigens (12), contained as many organisms in their lungs as the non-immunized control seven days after challenge.

When the antibody response against filamentous hemagglutinin (FHA), a major protective antigen (13), was measured, we found that infection with BPRA resulted in an approximately five-fold increase in anti-FHA IgG in the serum compared to infection with BPSM (Fig. 2A). This increase was evident as early as 14 days after infection and continued for at least up to 56 days (Fig. 2B). As expected, no significant anti-FHA IgG was detected after infection with BP347. Increased anti-

Mielcarek et al.



FHA titers in BPRA-infected mice was also found when IgG1, IgG2a and IgG2b were tested individually (Fig. 2A), whereas serum IgA and secretory IgA titers were not significantly different from those of BPSM-infected animals. Analyses of cell-associated and secreted FHA showed that BPRA and BPSM produced and secreted the same amounts of FHA, indicating that the deletion of the pertussis toxin gene resulted in increased immunogenicity against FHA, rather than in increased production or secretion.

Pertussis toxin is a complex protein composed of five different subunits, named S1 to S5 (13). S2 through S5, also called the B oligomer, are responsible for binding of the toxin to its target cells and by themselves express T-cell mitogenicity, while S1 expresses ADP-ribosyltransferase activity, which results in the toxic effects of the molecule (9). In order to assess the role of the enzymatically active subunit in anti-FHA immunogenicity after intranasal inoculation, we infected mice with BPDS1, a strain containing a mutated S1 subunit gene, in which the codon for Cys-41 was deleted. This strain produces and secretes wild-type levels of assembled B oligomer without S1 (11). As shown in Fig. 2B, mice infected with BPDS1 produced anti-FHA IgG at essentially the same level as mice infected with BPRA, demonstrating an important role of the enzymatically active S1 subunit in anti-FHA immunogenicity.

We have previously shown that heterologous antigens, such as the *Schistosoma mansoni* glutathion S-transferase (Sm28GST), fused to FHA can be expressed at the surface of *B. pertussis* in strain BPGR60 (6). A single infection with BPGR60 resulted in the induction of anti-Sm28GST antibodies in broncho-alveolar lavage fluids and could prime for protection against *S. mansoni* challenge (7). However, no anti-Sm28GST antibodies were detected in the serum of mice infected with this strain. In order to examine the role of pertussis toxin in the anti-Sm28GST immunogenicity of BPGR60, we deleted the pertussis toxin gene from its

Mielcarek et al.

chromosome as described previously for the construction of BPRA (11). This resulted in strain BPNX. As shown in Fig. 3, anti-Sm28GST serum antibodies could readily be detected after infection with BPNX. Subsequent intranasal administration of 20 µg of purified Sm28GST resulted in a boost of the specific anti-Sm28GST immune response. In contrast to BPNX, no anti-Sm28GST serum antibodies were detected after infection with BPRA, nor after infection with the non-attenuated strain BPGR60. In the latter case, they only appeared after intranasal boost with Sm28GST, as previously described (7).

To evaluate the protective potential of intranasal inoculation of BPNX against *S. mansoni* challenge, mice were first infected with a single dose of BPNX and then challenged two months later with 70 cercariae per mouse. Compared to non-immunized mice, infection by BPNX resulted in a 56 % reduction of worm burden after challenge. A small but non-significant reduction in worm burden was also observed in mice that had received a single dose of BPRA (Fig. 4A). The pathogenesis of *S. mansoni* infection is related to the inflammation around parasite eggs deposited in host tissues, essentially in the liver (14). In addition to a significant reduction in worm burden, infection with BPNX resulted also in a 60 % decrease of egg counts in the liver after challenge (Fig. 4B). It has been reported that a 60 % decrease in egg deposition in the liver of *S. mansoni*-infected hosts reduces the pathology to insignificant levels (15).

Together these results indicate that a single intranasal infection with a *B. pertussis* strain attenuated through the deletion of the pertussis toxin gene results in a high level of protection against subsequent *B. pertussis* challenge, and that it can be used to express heterologous antigens on its surface by genetic fusions to FHA in order to simultaneously protect against other infections. The fact that *B. pertussis* is one of the most contagious organisms for humans together with the unexpected and novel finding that the deletion of the pertussis toxin gene results in increased

Mielcarek et al.

immunogenicity of FHA and proteins fused to FHA makes attenuated *B. pertussis* particularly attractive for the development of live vaccines to protect against whooping cough and other diseases. This approach may be especially useful for protection against respiratory pathogens, but, since attenuated recombinant *B. pertussis* strains also induce high levels of systemic immune responses against the heterologous antigens, it may also find a much general application for vaccine development.

1. S. A. Plotkin and E. A. Mortimer Jr., Eds., *Vaccines* (W. B. Saunders, Philadelphia, 1994).
2. J. W. Bass and S. R. Stephenson, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**, 141 (1987).
3. J. D. Cherry, *Vaccine* **10**, 1033 (1992).
4. Ad hoc group for the study of pertussis vaccines, *Lancet* **i**, 955 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)(1988); D. Greco *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **334**, 341 (1996); L. Gustafsson, H. O. Hallander, P. Olin, E. Reizenstein, J. Storsaeter, *N. Engl. J. Med.* **334**, 349 (1996); Y. Sato, M. Kimura, H. Fukumi, *Lancet* **i**, 122 (1984).
5. D. Jenkinson, *Br. Med. J.* **296**, 612 (1988); H. J. Lambert, *Public Health Rep.* **80**, 365 (1965).
6. G. Renauld-Mongénie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7944 (1996).
7. N. Mielcarek *et al.*, *Infect. Immun.*, in press (1996).
8. M. Roberts, D. Maskell, P. Novotny, G. Dougan, *Infect. Immun.* **58**, 732 (1990).
9. W. J. Black *et al.*, *Science* **240**, 656 (1988).
10. N. Khelef, C.-M. Bachelet, B. B. Vargaftig, N. Guiso, *Infect. Immun.* **62**, 2893 (1994).
11. R. Antoine and C. Locht, *Infect. Immun.* **58**, 1518 (1990).
12. A. A. Weiss, E. L. Hewlett, G. A. Myers, S. Falkow, *Infect. Immun.* **42**, 33 (1983).
13. M. Tamura *et al.*, *Biochemistry* **21**, 5516 (1982); C. Locht and J. M. Keith, *Science* **232**, 1258 (1986); A. Nicosia *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4631 (1986); P. E. Stein *et al.*, *Structure* **2**, 45 (1994).
14. S. M. Phillips and P. Lammie, *Parasitol. Today* **2**, 296 (1986).
15. A. E. Butterworth, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 1 (1992).
16. S. K. Hoiset *et al.*, *Nature* **291**, 238 (1981).
17. We thank L. Kremer for his help during this study, R. Antoine for strains and plasmids, and C. Combes for the Guadeloupe *S. mansoni* strain. This work was supported by the Institut Pasteur de Lille, INSERM, Région Nord-Pas de Calais and Mielcarek *et al.*

the EU Biotech program (Biotech CT93-0111). N. M. and F. R. hold fellowships of the Région Nord-Pas de Calais.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Protection after immunization or colonization with *B. pertussis* strains.** Groups of twelve four-weeks old female OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPRA, BP347, BPSM, with  $2 \times 10^3$  *S. typhimurium* aroA (16), or with 25  $\mu$ l sterile PBS, or were vaccinated with 50  $\mu$ l commercial Tetracoq vaccine (Pasteur Mérieux, MSD, France). Three mice of each group were sacrificed three hours after infection or immunization, their lungs were removed, and viable *B. pertussis* or *S. typhimurium* were counted as described to ensure that proper colonization had occurred (6). 35 days later, three additional mice of each group were sacrificed and analyzed the same way to ensure that no viable bacteria were present in the lungs at that time. At day 35, the remaining mice received  $5 \times 10^6$  BPSM organisms by the nasal route, and bacterial lung counts were estimated three hours (day 0) and seven days later, as indicated.

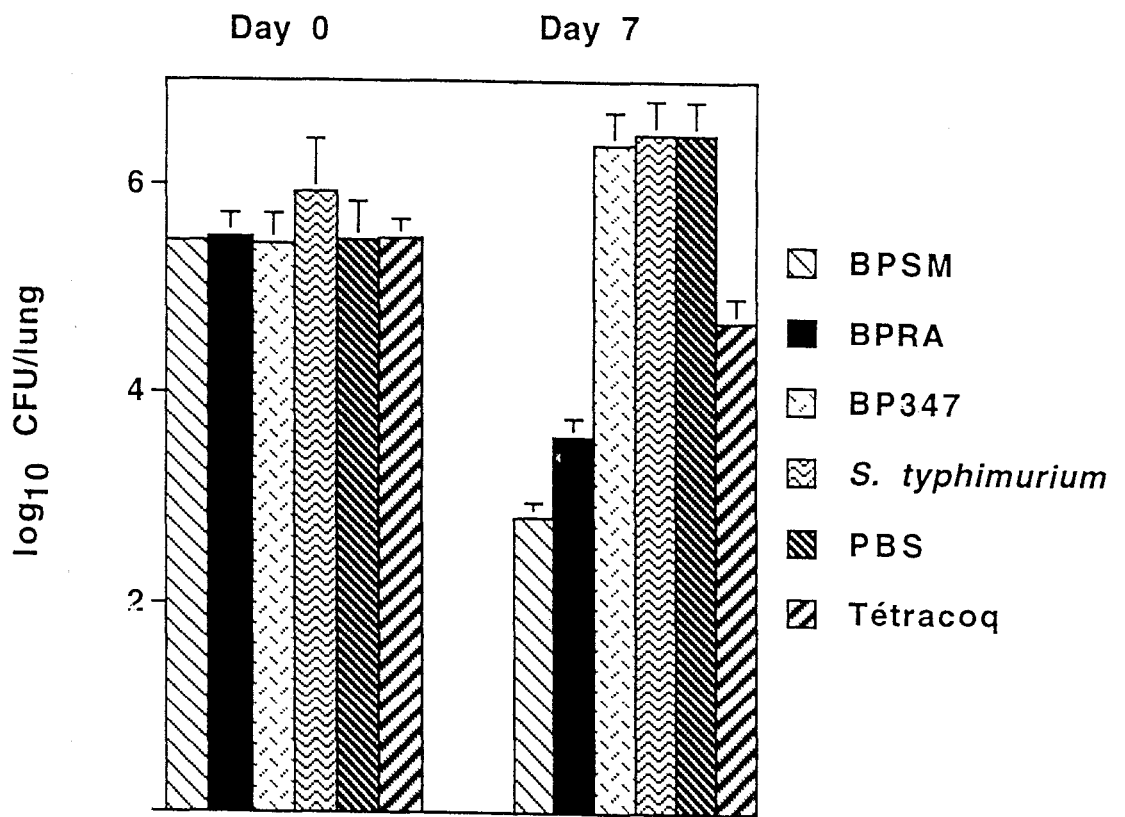
**Figure 2. Anti-FHA antibody responses after infection with different *B. pertussis* strains.** **A,** Groups of 5 four-weeks old female OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPRA, BP347, or BPSM. 28 days later, the mice were bled, and the anti-FHA IgG titers were estimated by enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA) using IgG-specific, IgG1-specific, IgG2a-specific or IgG2b-specific secondary antibodies, as indicated. **B,** Groups of B four-weeks old female OF1 mice

Mielcarek et al.

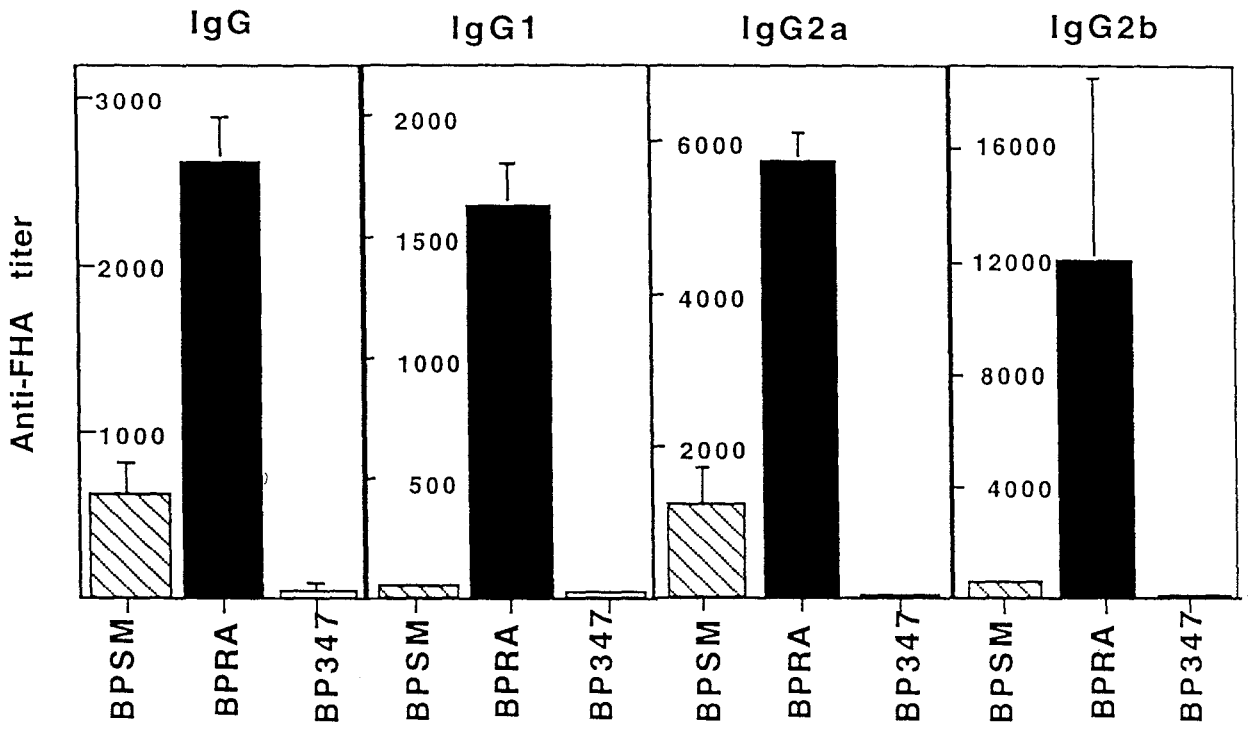
were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPRA, BPDS1, or BPSM. At the indicated time intervals, the mice were bled and anti-FHA antibody titers were measured by ELISA.

**Figure 3. Anti-Sm28GST antibodies elicited after infection with recombinant *B. pertussis* strains.** Groups of 5 four-weeks old female OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPGR60, BPRA or BPNX. The mice were bled at the indicated time intervals, and anti-Sm28GST serum antibodies were measured by ELISA as described (6). At day 65, the mice received 20  $\mu$ g of non-adjuvanted purified Sm28GST by the nasal route as described (7).

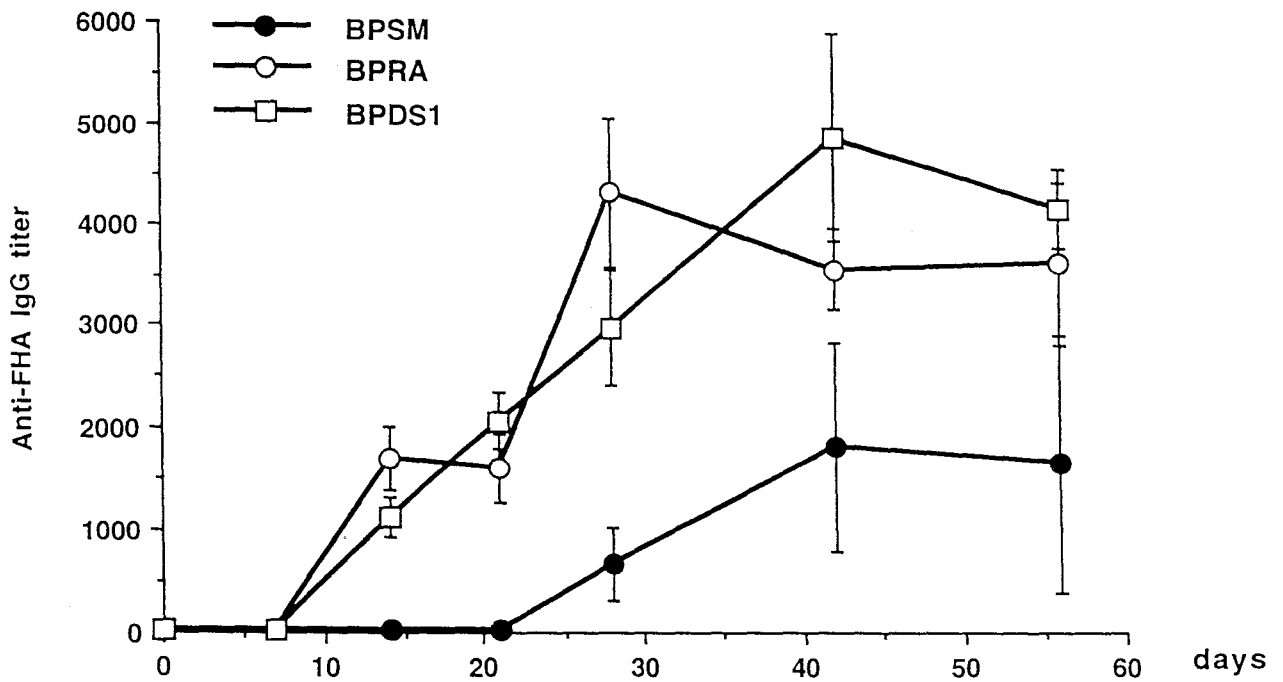
**Figure 4. Protection against *S. mansoni* challenge provided by intranasal infection with recombinant attenuated *B. pertussis*.** Groups of 10 to 14 four-weeks old female OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  *B. pertussis* BPNX or BPRA or left uninfected (control), as indicated. Two months later, the mice were challenged with 70 *S. mansoni* cercariae of the Guadeloupe strain. Six weeks after challenge, total worm burden and egg counts in the liver were estimated as described (7). Percentage of reduction in worm burden (A) or egg counts (B) of immunized mice compared to the control animals are indicated, as are significant level p values. NS, non significant.



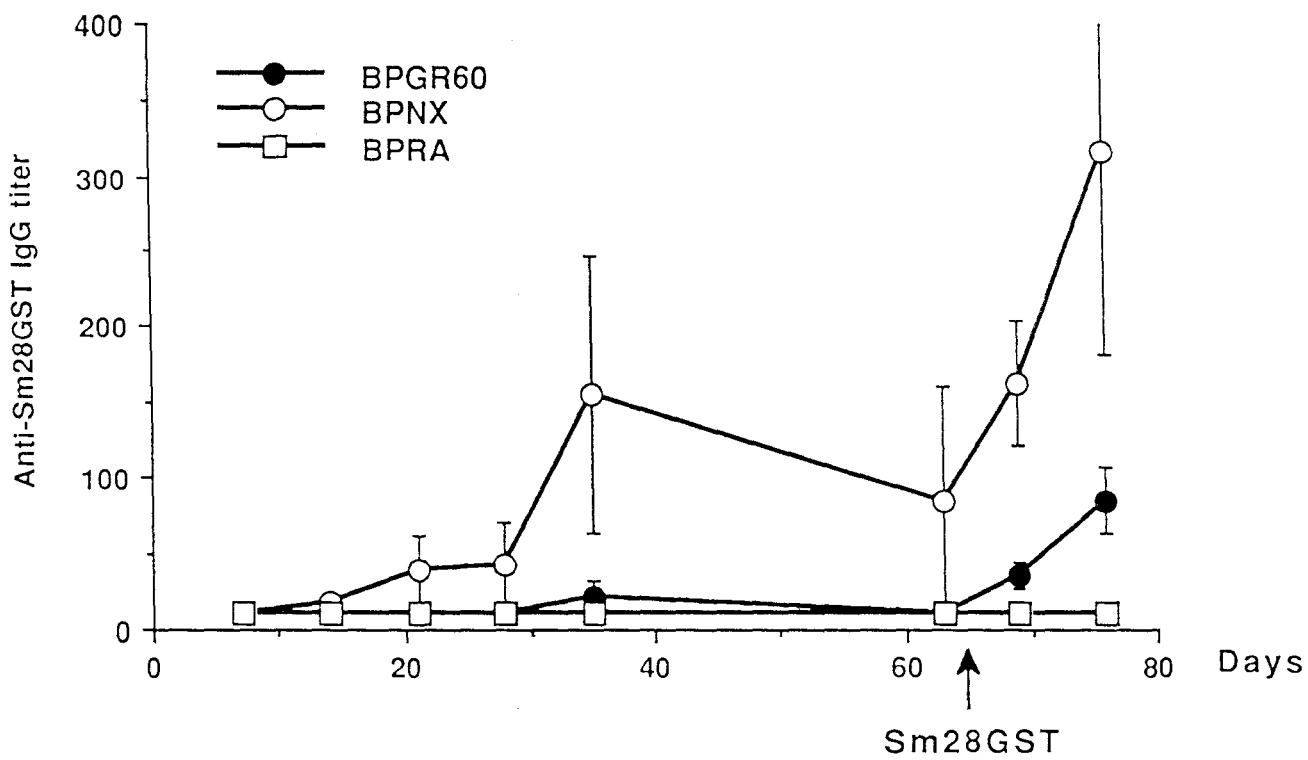
A

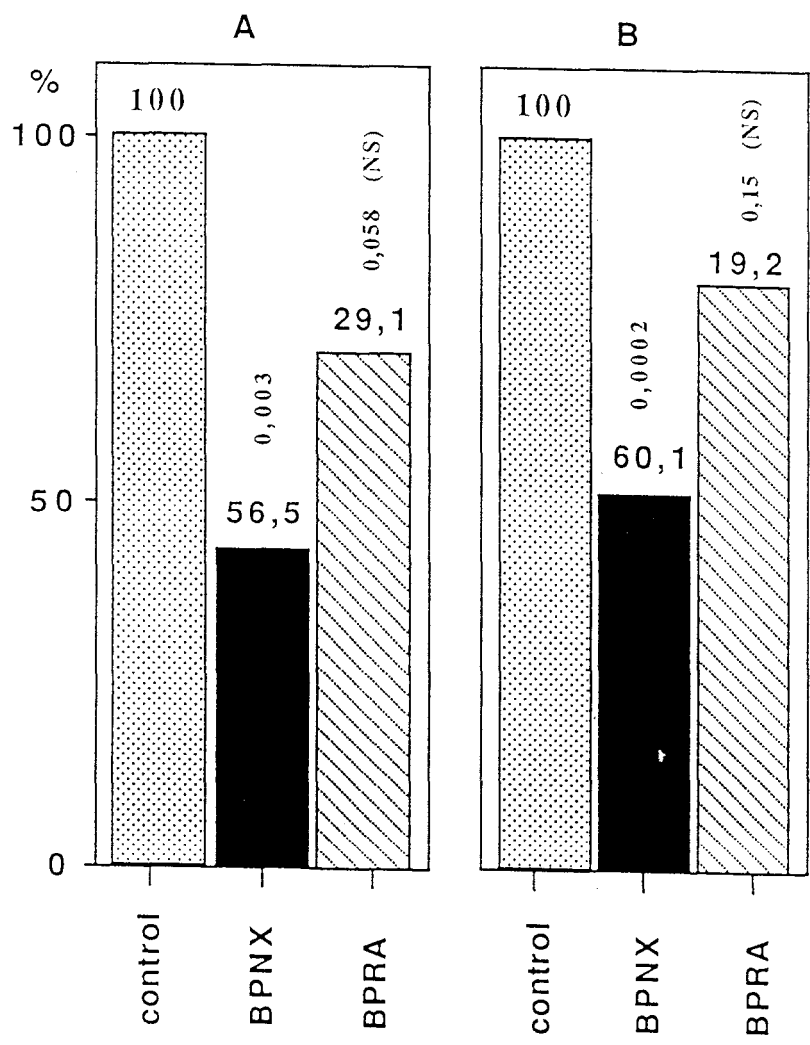


B









Les résultats décrits dans l'article précédent sont repris ici de manière plus détaillée.

**A. Protection contre une infection par *B. pertussis* de souris préalablement immunisées avec différentes souches déficientes dans la production d'un ou plusieurs facteurs de virulence.**

Dans un premier temps, la capacité des différentes souches atténuées de *B. pertussis* à coloniser le tractus respiratoire des souris a été vérifiée. Comme le montre la figure 14, le nombre des bactéries BPRA augmente dans les poumons des souris durant les 7 premiers jours suivant l'instillation, puis chute au cours des 4 semaines suivantes, de la même manière que la souche sauvage BPSM, mais leur cinétique d'élimination est plus rapide. La souche BP347, déficiente dans la production de tous les facteurs de virulence, est incapable de se multiplier durant la première semaine, et 14 jours après l'immunisation, aucune bactérie n'est retrouvée dans les poumons. Enfin, *S. typhimurium*, microorganisme colonisant le tractus gastrointestinal après une infection par voie orale, est rapidement éliminé car incapable de coloniser les muqueuses des voies respiratoires.

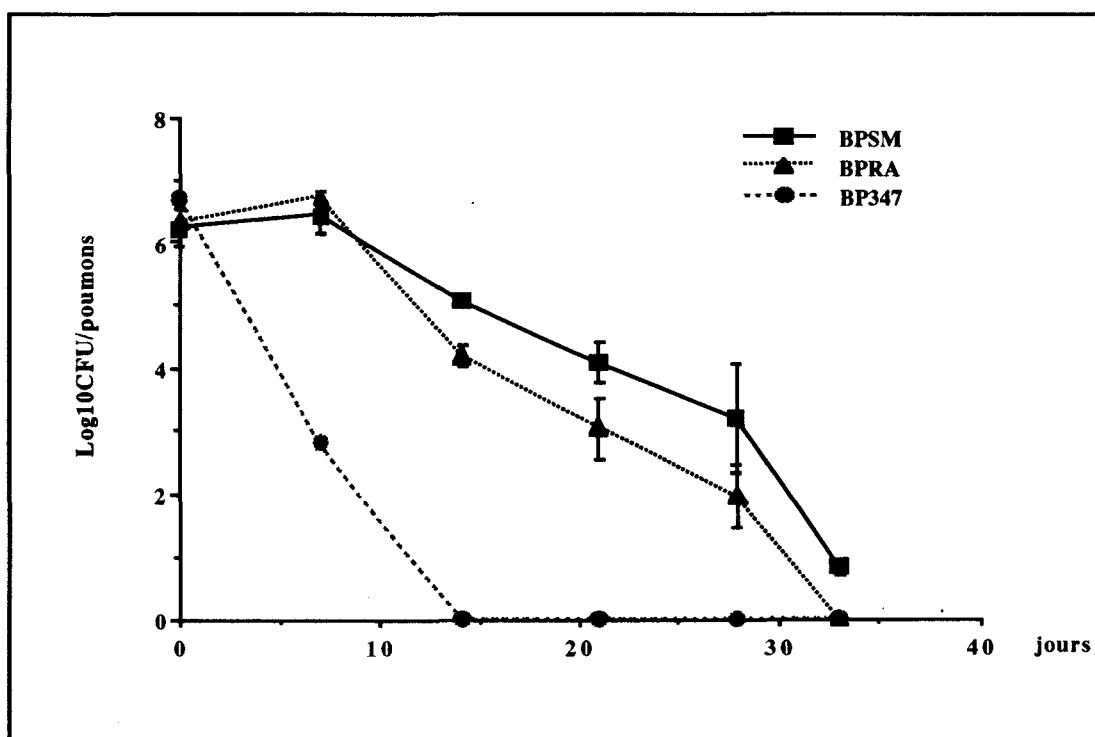


Fig. 14: Colonisation des poumons par différentes souches de *B. pertussis*. BPSM: souche sauvage (PTX+), BPRA: souche atténuée (PTX-), et BP347: souche avirulente.

Une seconde infection intranasale avec la souche sauvage BPSM est réalisée 35 jours après l'immunisation des souris avec les différentes souches bactériennes. Les souris contrôle ayant reçu du PBS et les souris infectées par *S. typhimurium* montrent une courbe de colonisation par BPSM similaire (Fig. 15). Chez les animaux infectés par BPSM et par BPRA, le nombre de bactéries diminue rapidement après la seconde infection par BPSM. Sept jours plus tard, la quantité de bactéries présentes dans les poumons des souris infectées par BPRA est 300 fois plus faible que chez les souris ayant reçu du PBS, bien que cette réduction soit moins importante que celle observée chez les souris infectées par BPSM. Par contre, durant la première semaine suivant l'infection, les bactéries BPSM semblent coloniser les poumons des souris infectées par BP347 de la même manière que les poumons des souris ayant reçu du PBS. Néanmoins, une semaine plus tard, les animaux infectés par BP347 présentent une réduction du nombre de bactéries de l'ordre de 100 fois comparée au groupe PBS. 21 jours après la seconde infection, aucune bactérie n'est détectée dans les poumons des souris infectées par BPSM, alors qu'une diminution de l'ordre de 130 fois pour les souris infectées par BPRA et de 12 fois pour les souris infectées par BP347 comparée aux souris ayant reçu du PBS est observée. 4 semaines après l'infection, l'élimination quasi totale des bactéries est atteinte chez les souris infectées par BPRA, alors qu'il en reste encore 2 fois plus chez les souris infectées par BP347.

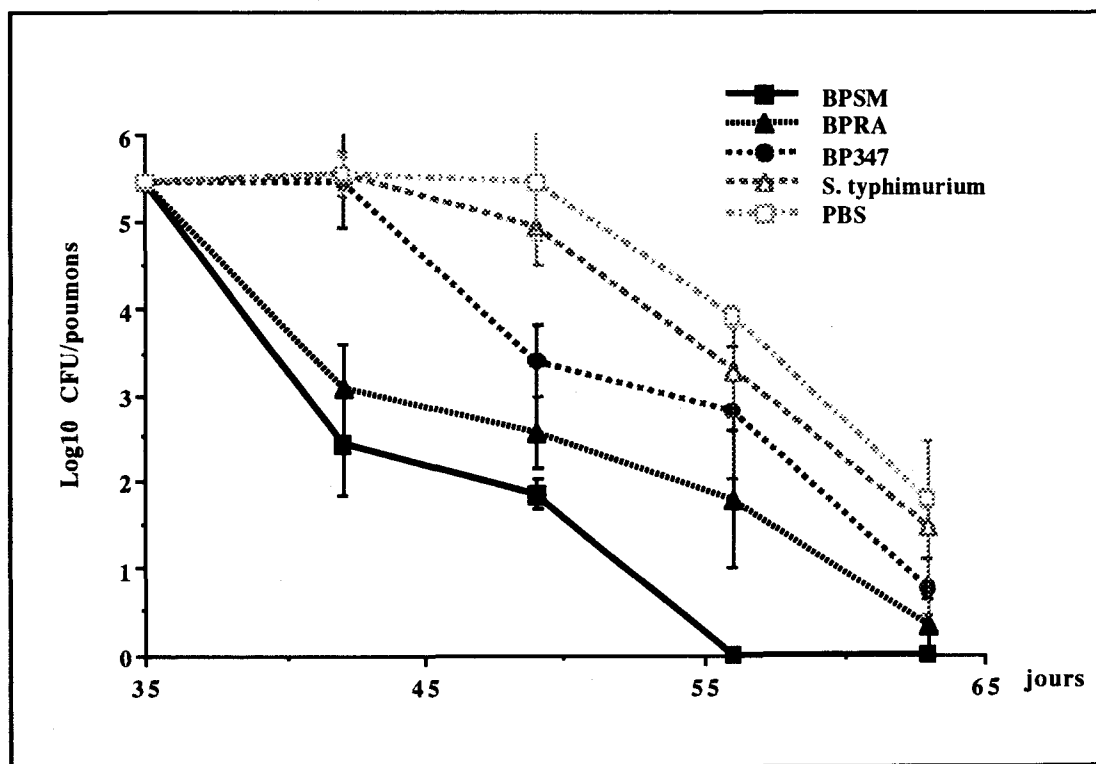


Fig. 15: Persistance des bactéries BPSM dans les poumons de souris préalablement infectées avec des souches atténuées de *B. pertussis*. L'administration de  $5 \cdot 10^6$  bactéries BPSM est réalisée 5 semaines après la première infection.

**B. Analyse histologique de l'inflammation au niveau des poumons induite par l'administration nasale d'une souche de *B. pertussis* déficiente dans la production de la toxine de pertussis.**

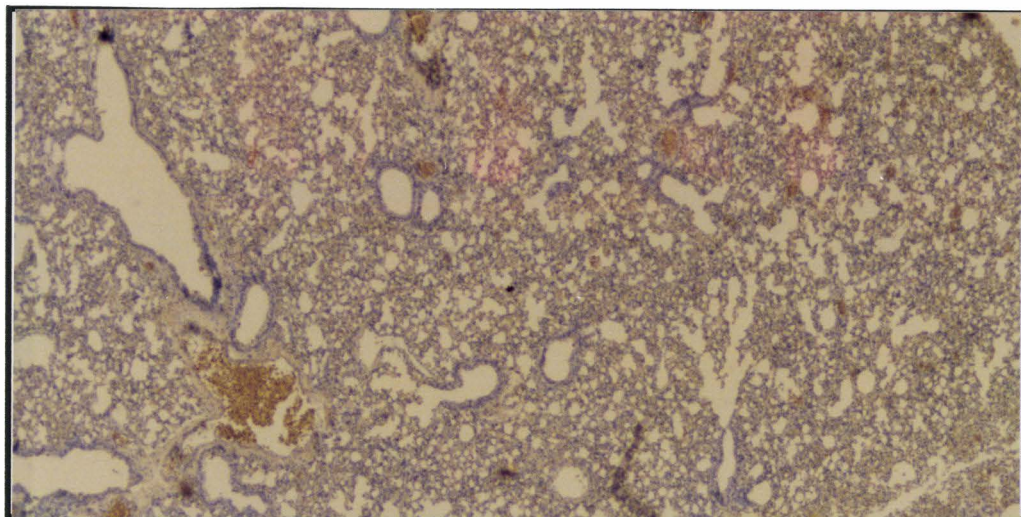
L'observation directe des poumons, 7 jours après administration des souches de *B. pertussis*, permet de voir que les souris ayant reçu BPSM ont des poumons plus volumineux et hémorragiques comparés à ceux des souris infectées par BPRA qui ne présentent que quelques petites régions hémorragiques et ont un volume identique à ceux des souris saines (Fig.16a).

Par la suite, une analyse histologique a été réalisée sur des coupes de poumons de souris immunisées avec différentes souches de *B. pertussis* (Fig.16b). Alors que l'infiltration cellulaire est légère et limitée à la périphérie des voies supérieures pour les souris infectées par BPRA, elle apparaît massive et a gagné jusqu'aux alvéoles des poumons pour les souris infectées par BPSM. Ces observations indiquent que l'administration de la souche BPRA, déficiente dans la production de PTX, induit une réaction inflammatoire au niveau pulmonaire beaucoup plus faible que celle provoquée par l'administration nasale de la souche sauvage BPSM.

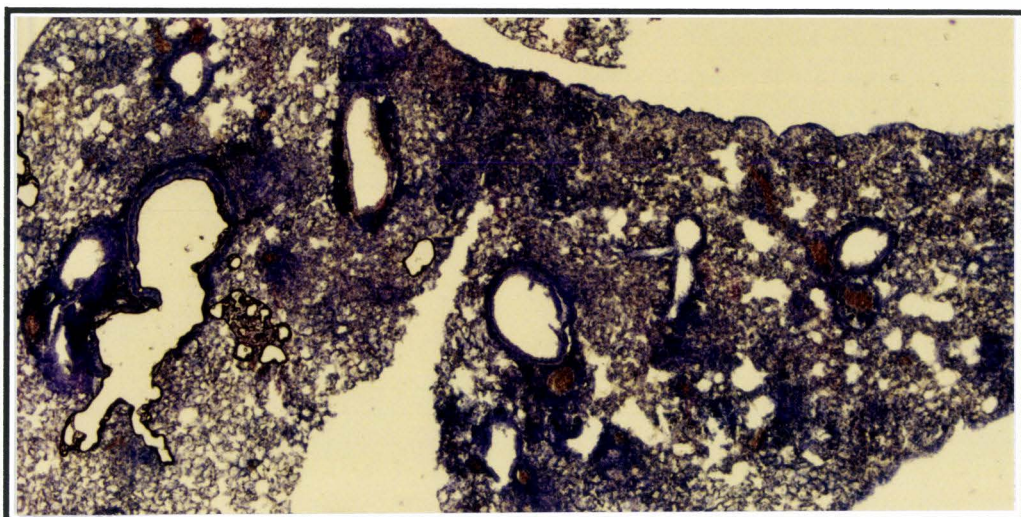


Fig 16 a: Poumons de souris (1) saine, (2) infectée par BPSM, et (3) infectée par BPRA, 7 jours après administration nasale des différentes souches de *B. pertussis*.

(1)



(2)



(3)

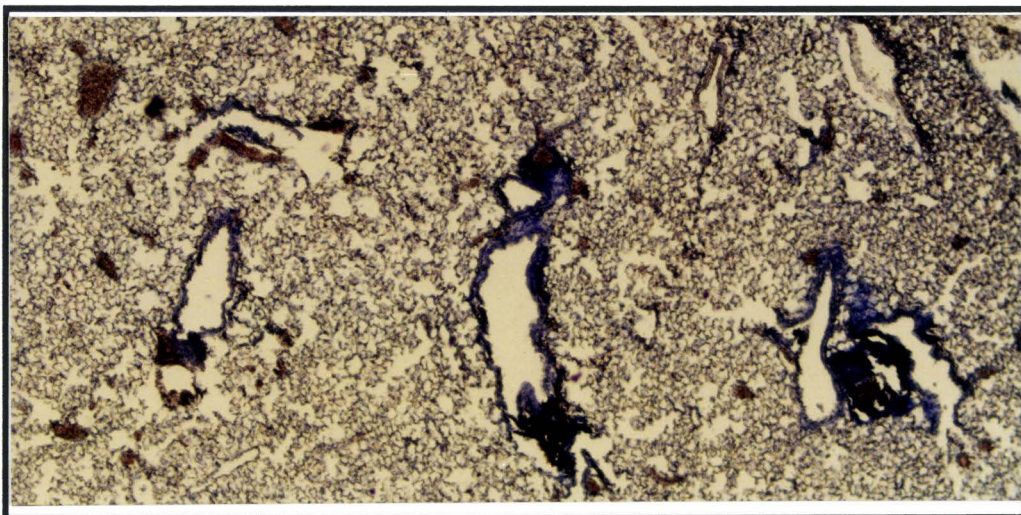


Fig 16b : Coupes histologiques de poumons de souris infectées par BPSM (2) et par BPRA (3) 14 jours après administration nasale de *B. pertussis*. Les poumons (1) correspondent à ceux de souris saines. Agrandissement x 20.

### C. Analyse de la réponse immune sérique anti-FHA après administration nasale des différentes souches bactériennes.

Les titres de la réponse IgG totale anti-FHA sont déterminés dans le sérum des souris, 28 jours après administration intranasale des souches de *B. pertussis* (BPSM, BPRA, BP347) ainsi qu'un mois après une seconde infection avec BPSM.

Durant l'intervalle de temps 28-63 jours, les titres de la réponse IgG anti-FHA ont doublé dans chaque groupe de souris immunisées par les différentes souches de *B. pertussis* (Fig. 17). De plus, les souris infectées par BPRA présentent une réponse anti-FHA 5 fois supérieure à celle observée chez les souris infectées par BPSM, différence observée 28 jours après immunisation ou après la seconde infection par BPSM.

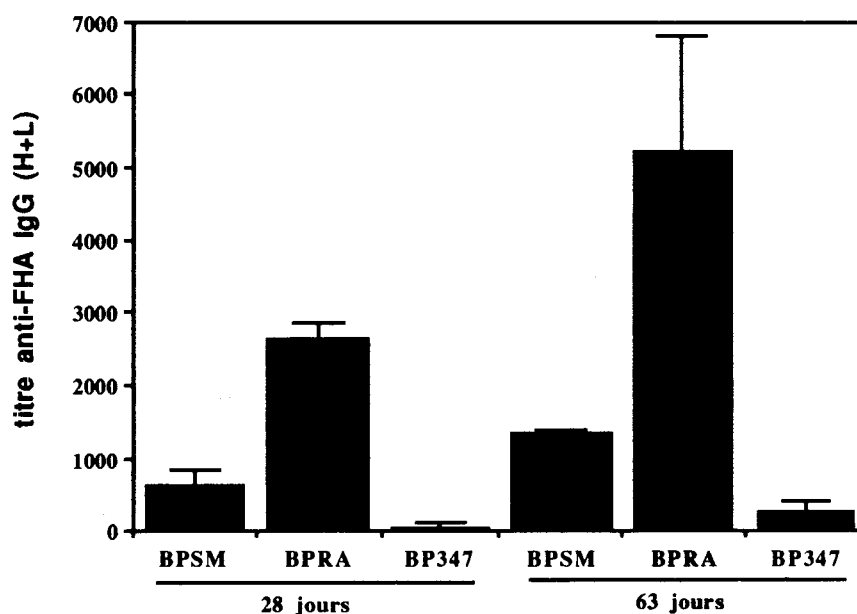


Fig. 17: Réponse sérique IgG anti-FHA évaluée par ELISA sur 5 souris par groupe.

Afin de déterminer si les différences dans la réponse sérique anti-FHA des souris BPSM et BPRA étaient uniquement quantitatives et/ou qualitatives, le profil de la réponse anti-FHA a été réalisé par ELISA.

L'analyse des cinétiques de réponse spécifique montre, 14 jours après administration intranasale, la présence d'IgG1 (Fig. 18a), d'IgG2a (Fig. 18b) et d'IgG2b (Fig. 18c) dans le sérum des souris infectées par BPRA, alors que des IgG2a et des IgG2b sont détectées chez les souris infectées par BPSM uniquement un mois après immunisation. Dans ces deux groupes de souris, la seconde infection par BPSM a induit une

augmentation de la réponse IgG2a et IgG2b anti-FHA. D'autre part, alors qu'une forte augmentation de la réponse IgG1 spécifique est observée chez les souris infectées par BPRA, une production faible et transitoire est détectée chez les souris infectées par BPSM une semaine après la seconde infection. Un mois après cette infection, une diminution du taux d'IgG1 et d'IgG2b est détectée dans le sérum des souris infectées par BPRA alors que le taux d'IgG2a reste stable. L'analyse de la réponse IgA sérique anti-FHA ne montre pas de différences significatives entre les différents groupes de souris.

Ces cinétiques de distribution de la réponse isotypique anti-FHA mettent donc en évidence une réponse sérique spécifique plus précoce et plus élevée dans le sérum des souris infectées par BPRA (PTX-) comparée à celle retrouvée dans les souris ayant reçu BPSM (PTX+). La différence de réponse immune observée après administration de la souche BPRA comparée à BPSM repose donc uniquement sur la quantité d'anticorps anti-FHA produit et non sur l'isotypie de ces anticorps sériques.

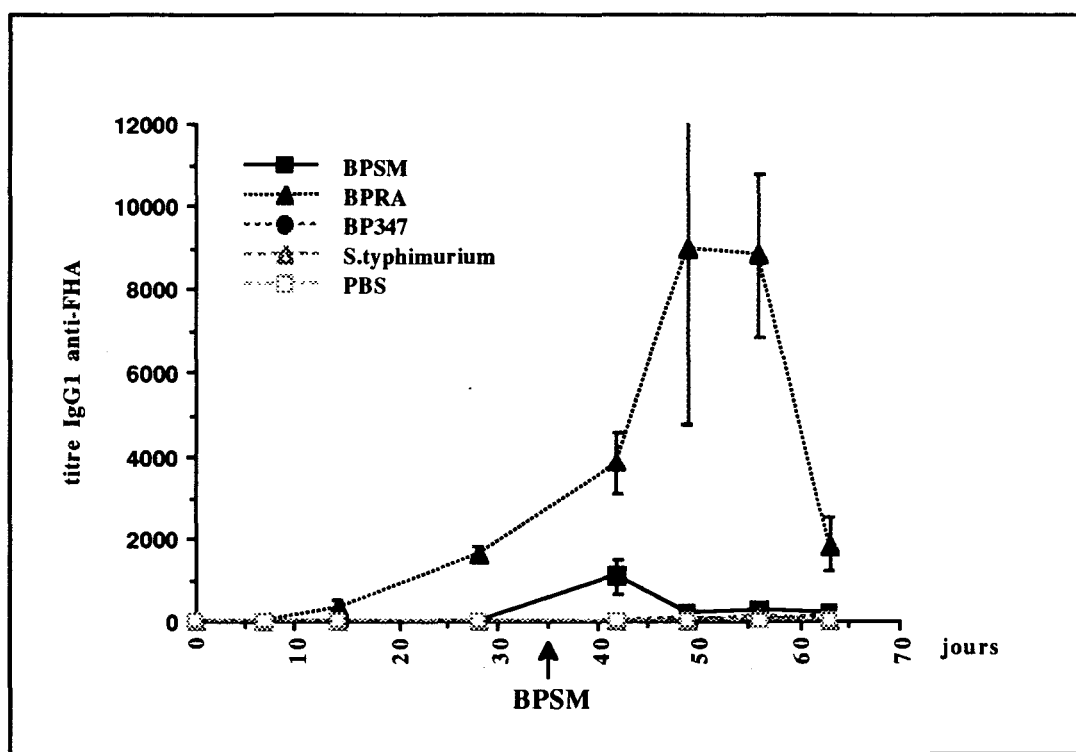


Fig. 18a: Cinétique de la réponse anticorps IgG1 anti-FHA après administration de *B. pertussis*.



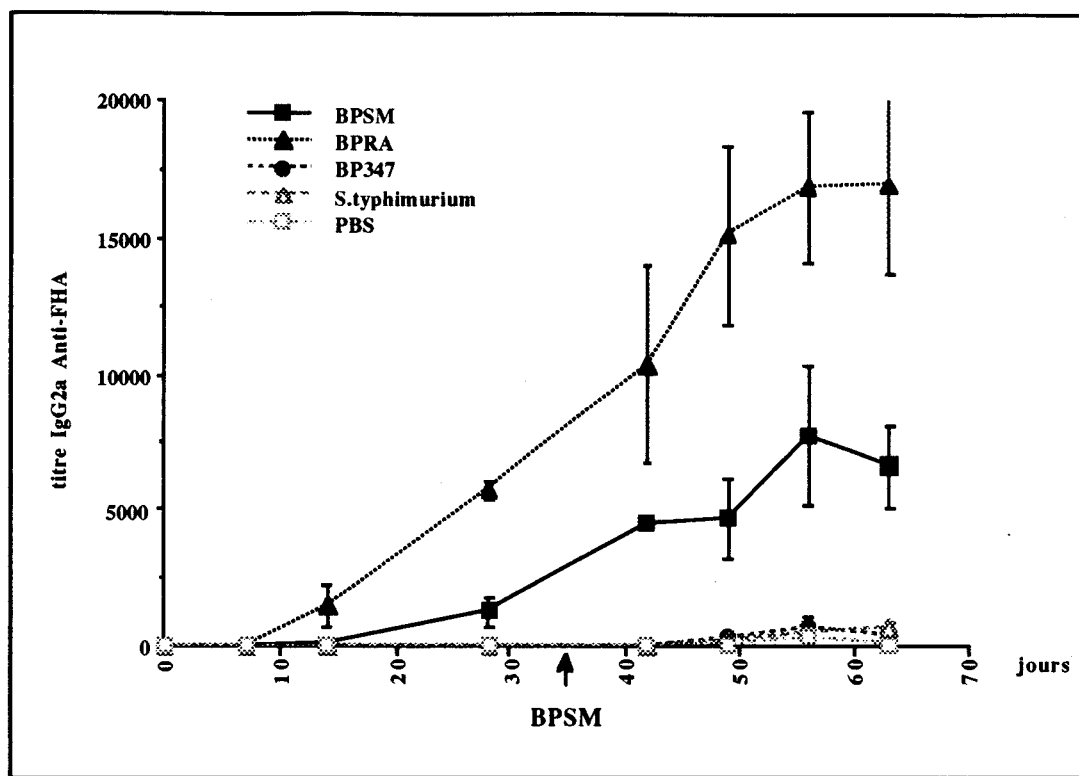


Fig. 18b. Cinétique de la réponse IgG2a anti-FHA.

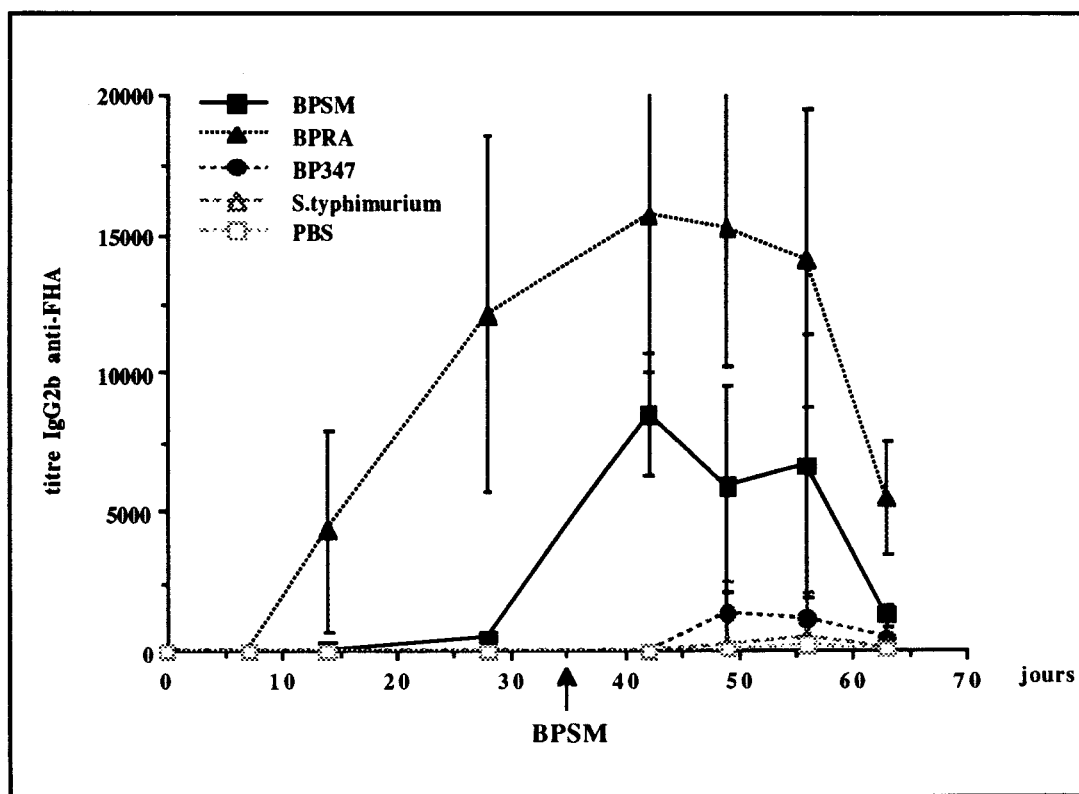


fig. 18c: Cinétique de la réponse IgG2b anti-FHA.

Une des hypothèses pour expliquer ces résultats serait que la quantité de FHA exprimée à la surface et/ou sécrétée par la souche BPRA soit supérieure à celle produite par la souche sauvage BPSM. Une analyse par immunoblot à l'aide d'un anticorps polyclonal de rat anti-FHA, a été réalisée sur des surnageants de culture et des lysats cellulaires provenant d'une culture liquide des différentes souches de *B. pertussis*. Cette étude a mis en évidence des quantités similaires de FHA produites par la souche BPRA et BPSM (résultats non présentés), comme cela avait été préalablement décrit (Antoine and Locht. 1990).

Une activité potentiellement immuno-régulatrice de la PTX, qui agirait comme un élément immunosuppresseur, pourrait être à l'origine de la faible intensité de la réponse anti-FHA chez les souris infectées par BPSM (PTX+) comparée à celle obtenue chez les souris infectées par BPRA (PTX-). Une étude de la réponse IgG2a, plus sensible que la réponse IgG totale, contre les antigènes totaux des bactéries BP347 et BPSM a été réalisée sur les sérums de chaque groupe de souris. Les taux d'anticorps dirigés contre les antigènes de la souche BP347 sont similaires dans les sérums des souris infectées par BPSM et BPRA (Fig. 19a), alors que de légères différences sont notées quant aux niveaux de la réponse vis-à-vis des antigènes de BPSM avec une réponse plus élevée chez les souris BPRA, probablement liée au taux d'IgG2a anti-FHA (Fig. 19b). De plus, alors que le niveau des anticorps anti-BP347 décroît progressivement dans le sérum des souris infectées par BPSM et BPRA, la réponse IgG2a anti-BPSM continue à augmenter au moins jusqu'à 28 jours après la seconde infection par BPSM, et ce de manière parallèle à la réponse IgG2a anti-FHA.

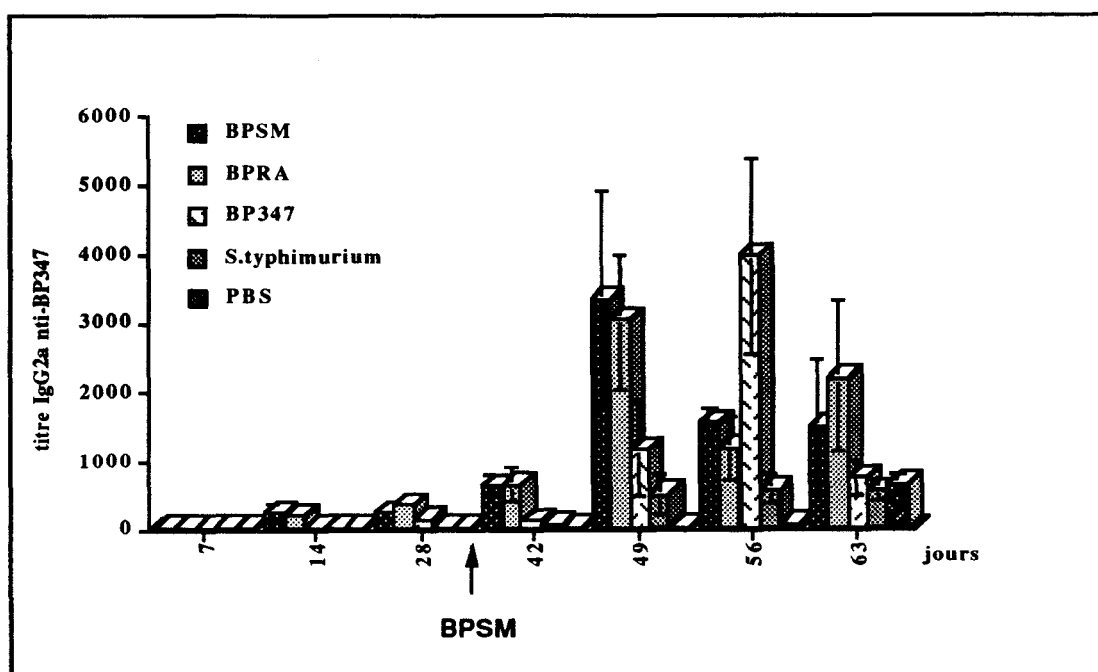


Fig. 19a: Cinétique de la réponse IgG2a anti-BP347.

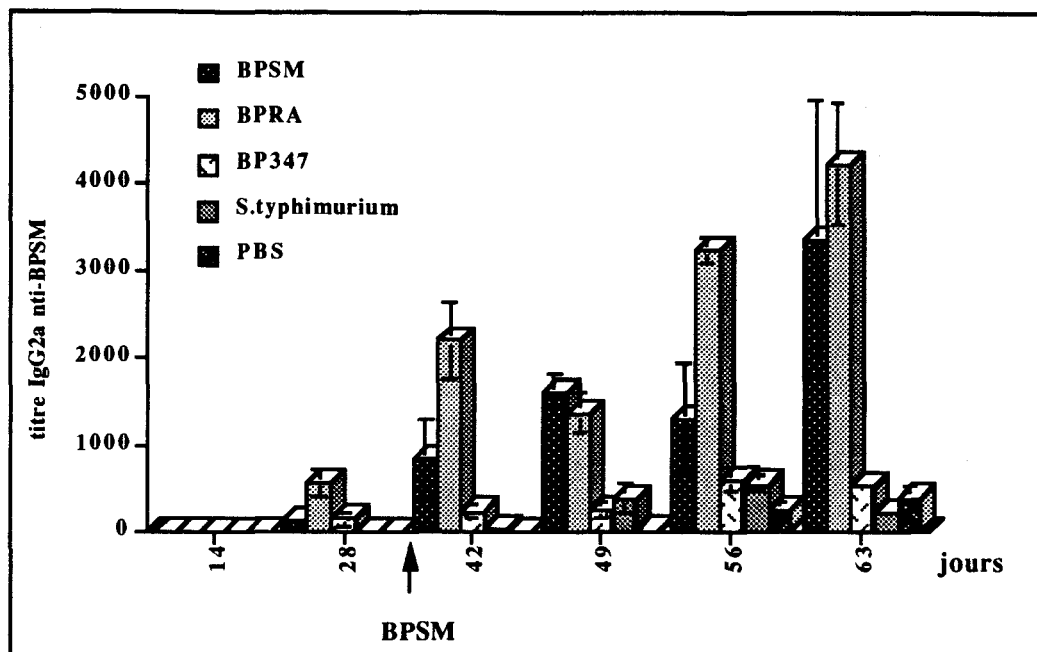


Fig. 19b: Cinétique de la réponse IgG2a anti-BPSM.

Il est fort probable que l'évaluation des taux d'anticorps contre les antigènes totaux des souches BP347 ou BPSM soit moins précise que contre un antigène purifié, et bien qu'il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les souris BPSM et BPRA, l'effet modulateur de PTX sur la réponse sérique spécifique de la FHA a été poursuivie.

#### D. Etude du rôle de l'activité enzymatique de PTX sur la réponse sérique anti-FHA.

La PTX est une protéine oligomérique composée de 5 sous-unités, appelées S1 à S5. Cette holotoxine possède une structure de type A-B où A correspond à la sous-unité S1 exprimant l'activité enzymatique ADP-ribosyltransférase et NAD glycohydrolase (Katada *et al.* 1983). Cette protéine possède 2 résidus cystéine qui forment un pont disulfure quand la toxine est sécrétée par la bactérie. Une de ces cystéine (Cys-41) est située près du site de fixation du NAD sur l'enzyme (Locht *et al.* 1990) et est essentielle à la stabilité de la sous-unité S1 chez *B. pertussis*. Afin de déterminer le rôle de l'activité enzymatique de PTX sur la réponse anti-FHA, un groupe de souris reçoit  $5 \times 10^6$  bactéries d'une souche de *B. pertussis*, appelée BPDS1, dans laquelle le résidu Cys-41 de S1 a été délété. (Antoine and Loch. 1990). La sous-unité S1 est indétectable dans le surnageant de culture de cette souche, mais l'oligomère B, composant qui permet la fixation aux cellules cibles, peut être assemblé et sécrété.

La capacité de la souche BPDS1 à coloniser le tractus respiratoire des souris ainsi que l'infiltration cellulaire observée au niveau pulmonaire 14 jours après administration est identique à celui de la souche BPRA (résultat non présenté). La cinétique de la réponse sérique anti-FHA après administration de la souche BPDS1 par voie nasale a été analysée sur 2 mois (Fig. 2C de l'article). Le taux d'anticorps IgG anti-FHA observé chez les souris infectées par BPDS1 est similaire à celui trouvé chez les souris infectées par BPRA, c'est-à-dire supérieur à celui détecté dans le sérum des souris infectées par BPSM.

Ces résultats indiquent que la présence de la sous-unité S1 joue un rôle essentiel sur la production d'IgG anti-FHA, suggérant que l'activité enzymatique de PTX serait impliquée dans la réduction de la réponse sérique contre l'adhésine majeure de *B. pertussis*, la FHA.

#### **E . Protection induite par l'administration nasale des souches recombinantes de *B. pertussis* contre une infection expérimentale par *S. mansoni*.**

Suite aux résultats extrêmement prometteurs montrant une augmentation de la réponse anticorps anti-FHA après administration d'une souche de *B. pertussis* déficiente dans la production de la toxine PTX, nous avons entrepris d'éliminer, par double recombinaison homologue, le gène codant pour PTX du génome de BPGR60. La souche ainsi obtenue est appelée BPNX.

Son administration intranasale à des souris nous a permis de mettre en évidence une production en anticorps sériques anti-Sm28GST après une seule immunisation (Fig. 3 de l'article), alors qu'un rappel avec la rSm28GST était nécessaire après infection avec la souche BPGR60.

L'efficacité protectrice de cette souche BPNX a été testée contre une infection expérimentale par *S. mansoni*.

Des groupes de 20 à 28 souris ont été immunisées intranasalement soit avec la souche recombinante atténuée BPNX, soit avec la souche recombinante virulente BPGR60, soit avec la souche non-recombinante atténuée BPRA. La moitié de chacun de ces groupes a reçu une administration intranasale de rSm28GST comme rappel, deux mois après l'immunisation par *B. pertussis*. Le groupe témoin comportait 16 souris non immunisées. L'infestation a été réalisée avec 70 cercaires de la souche Guadeloupe de *S. mansoni* une

semaine après le jour du rappel, et les souris ont été perfusées 6 semaines après l'infestation.

Les résultats obtenus (Fig. 20) montrent qu'avec la souche BPNX une protection de l'ordre de 60% en termes de réduction du nombre de vers est obtenue, alors que la souche recombinante virulente protège à plus de 75 %. Le pourcentage de protection non spécifique (de l'ordre de 30%) observé après infection par BPRA reste statistiquement non significatif.

L'intensité de la réduction du nombre d'oeufs dans les tissus (foie et intestins) est corrélée à la diminution du nombre de vers et aucune réduction de la fécondité des vers femelles n'a pu être mise en évidence.

De manière surprenante, les souris ayant reçu l'une ou l'autre des souches recombinantes (BPNX ou BPGR60), puis un rappel à l'aide de la rSm28GST sont moins protégées que les souris immunisées uniquement avec les souches recombinantes de *B. pertussis*. Or, l'analyse de la cinétique de réponse sérique anti-Sm28GST (Fig. 21) montre que ce sont les souris rappelées qui présentent une intensité de réponse anti-Sm28GST plus élevée. Cette production d'anticorps anti-Sm28GST apparaît dans le sérum des souris ayant reçu une souche recombinante après un rappel avec la protéine parasitaire libre.

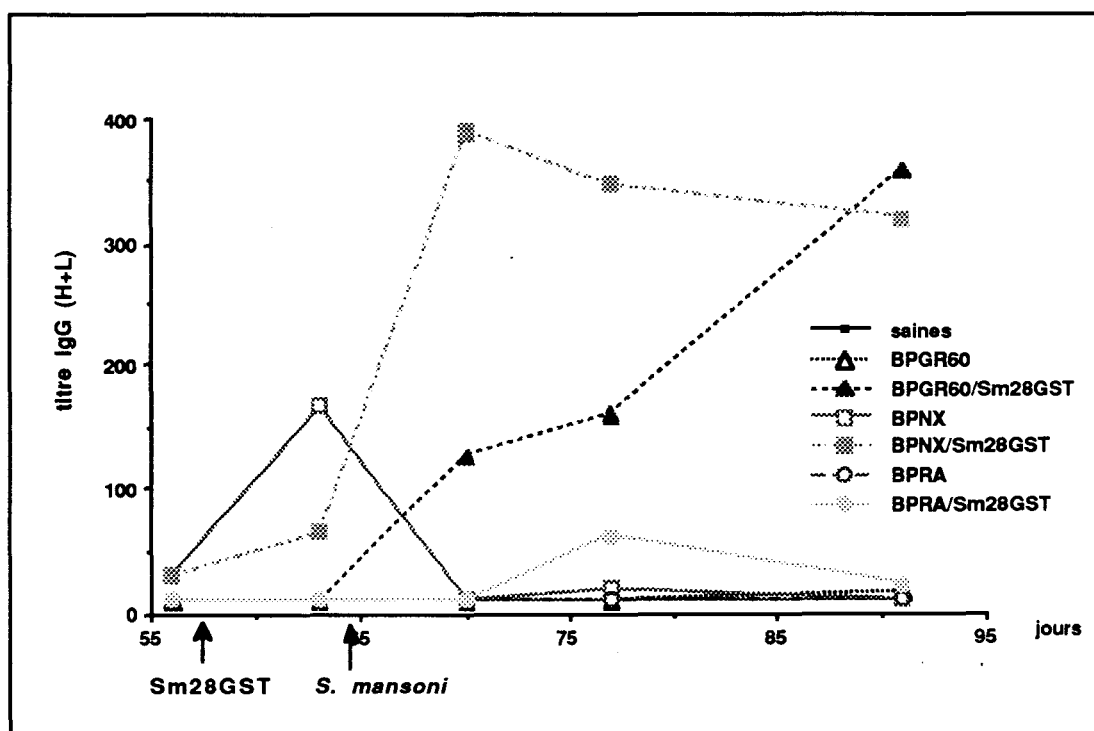
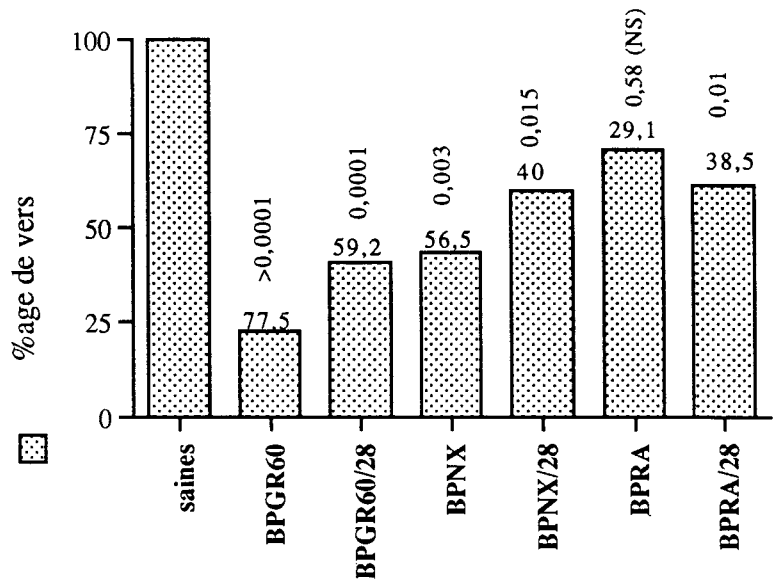


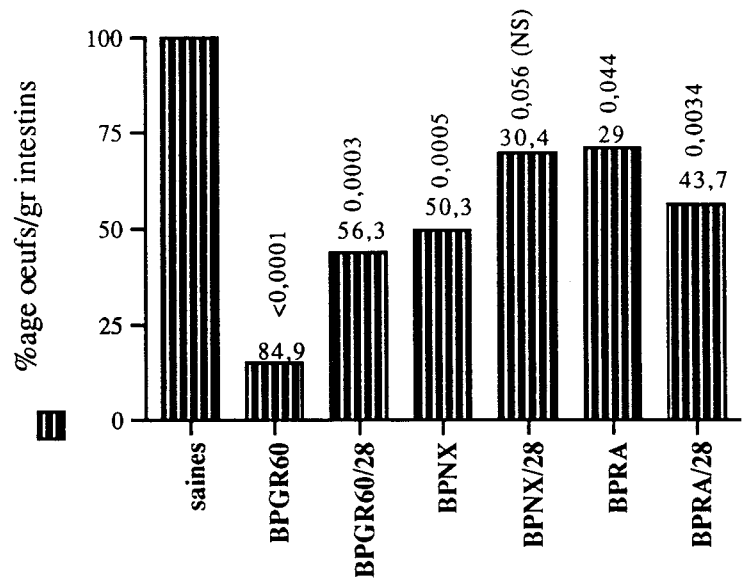
Fig. 21: Cinétique de la réponse sérique anti-Sm28GST IgG (H+L) réalisée au cours de l'expérience de protection. Chaque point correspond à la réponse moyenne obtenue pour une série de 5 souris prises au hasard dans chaque groupe.

Fig. 20: Résultats de protection.

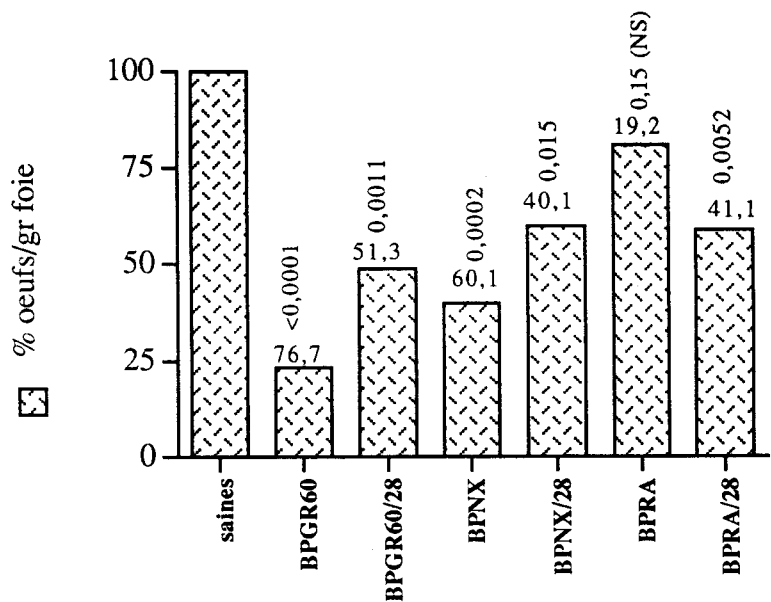
Réduction du nombre de vers



Réduction du nombre d'oeufs par gr. d'intestins



Réduction du nombre d'oeufs par gr. de foie



Afin de déterminer si la différence obtenue en termes de protection peut être corrélée à certains isotypes, une analyse du profil isotypique de la réponse anti-Sm28GST dans le sérum des différents groupes de souris a été réalisée. Les résultats ne montrent aucune différence entre les souris ayant reçu un rappel avec la rSm28GST et celles qui n'ont pas été rappelées (résultats non présentés).

#### **IV. Cas particuliers d'utilisation des souches recombinantes de *B. pertussis*.**

L'une des considérations importantes dont il faut tenir compte dans une stratégie vaccinale mettant en jeu des vecteurs recombinants vivants, tels que les bactéries, concerne l'interaction éventuelle du vecteur vaccinal avec une réponse immune produite suite à une vaccination préalable ou à une infection par le pathogène parental.

Ainsi, dans la plupart des pays industrialisés, une importante couverture vaccinale contre la coqueluche est mise en place, et pourrait potentiellement représenter un frein à l'utilisation de *B. pertussis* recombinant comme vecteur vaccinal vivant. De plus, la coqueluche est encore une maladie d'actualité, notamment dans les PVD, ce qui implique que de nombreux individus ont été ou vont être infectés par la bactérie sauvage. Il était donc important de vérifier si, dans ces conditions, l'administration des souches recombinantes de *B. pertussis* reste capable d'induire une réponse immune spécifique de l'antigène hétérologue.

##### **A. Immunisation de souris vaccinées contre la coqueluche**

Afin de déterminer l'efficacité des souches recombinantes de *B. pertussis* chez des souris vaccinées contre la coqueluche, une injection sous-cutanée de 50 µl du vaccin commercial Tetracoq (Pasteur Mérieux MSD, France) (vaccin diphtérique, coquelucheux, tétanique et poliomyélitique adsorbé) est effectuée chez des souris OF1 âgées de 4 semaines.

5 semaines plus tard, les souches recombinantes BPGR60 (virulente) et BPNX (atténuée) sont administrées par voie intranasale. Les poumons sont prélevés afin de déterminer la capacité des souches recombinantes de *B. pertussis* à coloniser le tractus respiratoire des souris vaccinées contre la coqueluche.



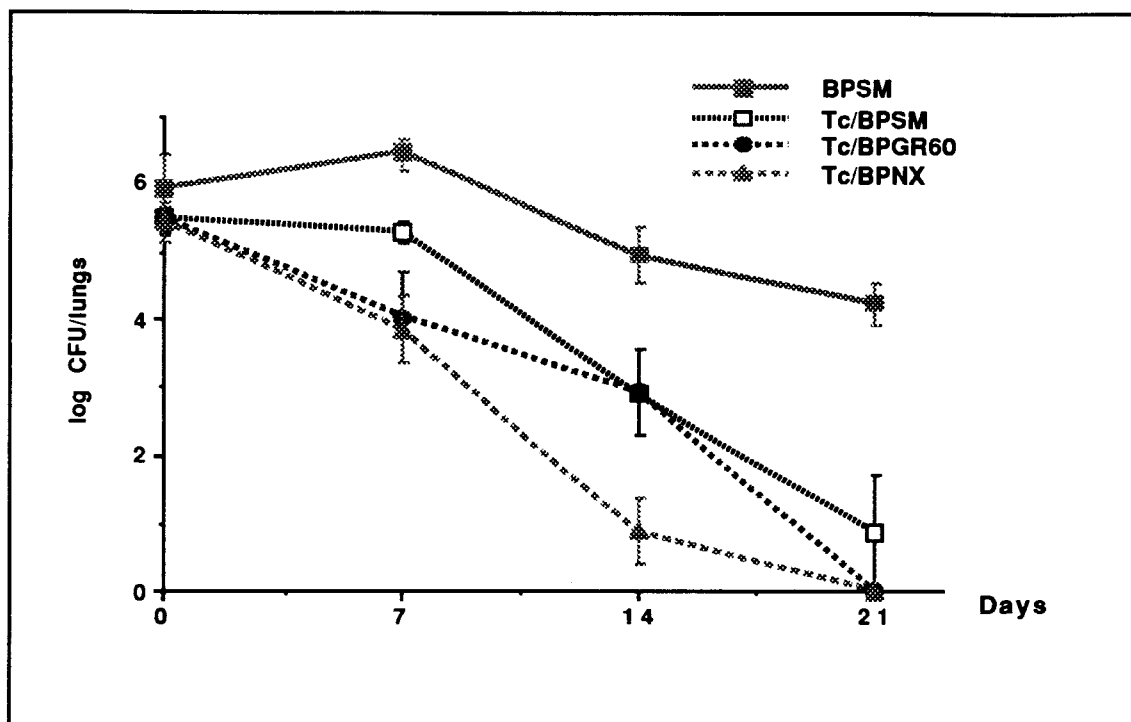


Fig. 22: Cinétique de colonisation des souches recombinantes de *B. pertussis* chez des souris préalablement vaccinées contre la coqueluche. Tc= Tétracoq.

Conformément aux résultats attendus, les bactéries sont incapables de se multiplier chez les souris vaccinées contre la coqueluche et sont éliminées de manière beaucoup plus rapide par rapport au contrôle de colonisation représenté par une administration de la souche sauvage chez des souris saines (Fig. 22). On peut noter que la souche BPNX atténuée est presque totalement éliminée dès la deuxième semaine suivant l'administration.

La question qui se posait alors était de déterminer si cette colonisation réduite des souches recombinantes était suffisante pour générer une réponse en anticorps contre la Sm28GST. Un suivi de la réponse en anticorps sérique a été réalisé, mais aucune réponse IgG anti-Sm28GST n'a pu être mise en évidence après administration de la souche BPGR60 ou BPNX. Deux mois plus tard, un rappel par voie nasale à l'aide la protéine rSm28GST (20 µg/souris) a donc été effectué afin de déterminer si la durée limitée de présence des bactéries recombinantes dans les poumons avait néanmoins permis d'établir une mémoire immune spécifique de la Sm28GST. L'analyse de la réponse sérique (Fig. 23) après le rappel nous montre la production d'un taux élevé d'anticorps anti-Sm28GST chez les souris vaccinées avec le Tétracoq, puis infectées avec les souches recombinantes. Cette réponse apparait dès la première semaine suivant le rappel et augmente au cours des trois semaines suivantes.

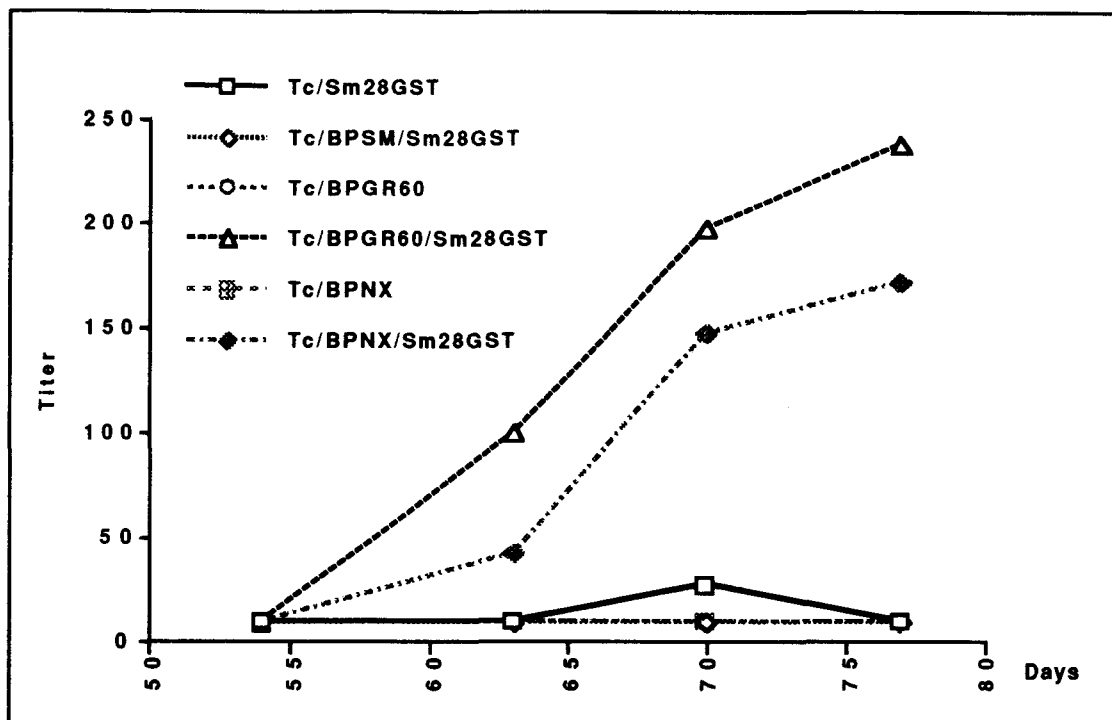


Fig. 23: Analyse par ELISA de la réponse en anticorps IgG anti-Sm28GST après un rappel avec la protéine rSm28GST chez des souris vaccinées avec le Tétracoq puis immunisées avec les souches recombinantes de *B. pertussis*. Chaque point correspond à la réponse sérique d'un ensemble de 5 souris.

Les résultats obtenus sont donc prometteurs puisqu'ils nous permettent de mettre en évidence, chez des souris vaccinées contre la coqueluche, l'obtention d'une réponse immune contre l'antigène hétérologue fusionné à la FHA après une administration intranasale de la souche recombinante de *B. pertussis* et un rappel avec la protéine hétérologue.

## B. Immunisation des souris infectées par *B. pertussis* sauvage.

Le même type d'expérience a été réalisé afin de savoir si une réponse en anticorps sérique spécifique de la Sm28GST pouvait être générée chez des souris préalablement infectées avec la souche sauvage de *B. pertussis*.

Les souris sont infectées nasalement avec  $5.10^6$  bactéries de la souche sauvage BPSM, puis infectées 5 semaines plus tard avec les souches recombinantes. Les poumons sont alors prélevés et la colonisation des souches recombinantes est étudiée.

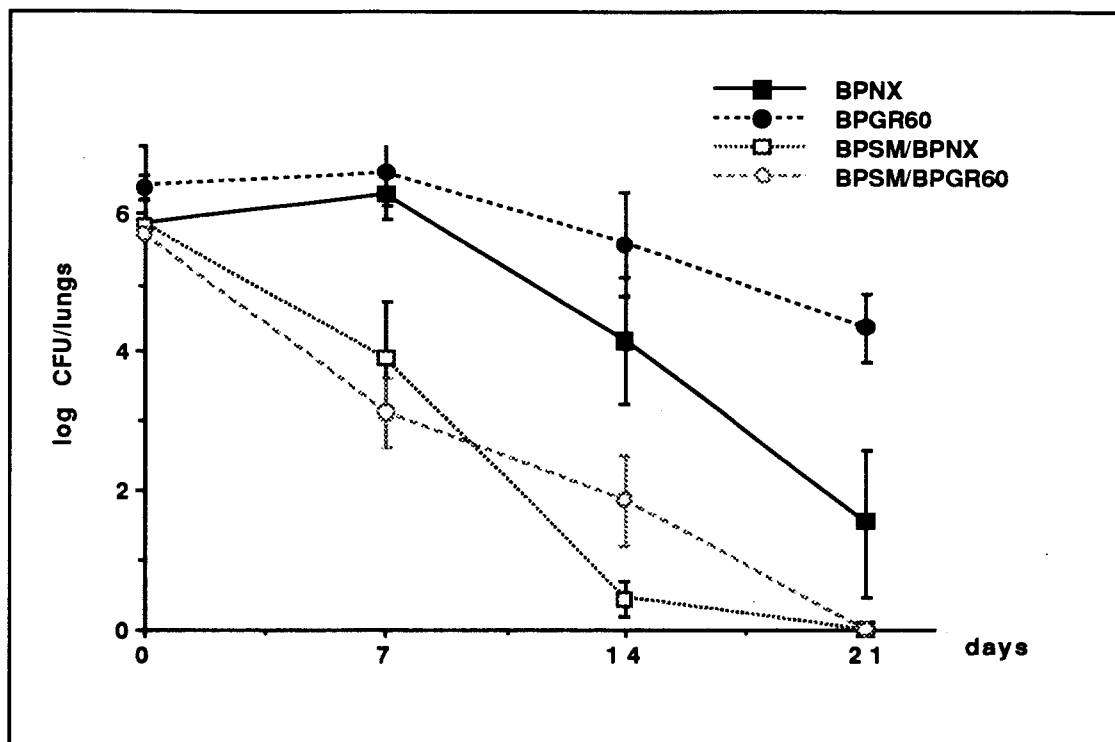


Fig. 24: Cinétique de colonisation des souches recombinantes de *B. pertussis* chez des souris préalablement infectées par la souche sauvage BPSM.

Les résultats obtenus (Fig. 24) nous montrent une réduction importante du nombre de bactéries dans les poumons de souris préalablement infectées par BPSM, de manière très similaire aux courbes de colonisation obtenues chez les souris vaccinées avec le Tétracoq. Ainsi, les bactéries recombinantes sont incapables de se multiplier dans les poumons des souris ayant déjà été infectées par BPSM. Deux semaines après l'administration intranasale de la souche atténuée BPNX chez ces souris, l'élimination des bactéries recombinantes est presque totale.

Malgré cette élimination rapide, l'analyse de la réponse sérique anti-Sm28GST après administration des souches recombinantes permet de mettre en évidence des IgG anti-Sm28GST chez les souris pré-infectées par la souche sauvage, puis immunisées avec la souche recombinante atténuée BPNX (Fig. 25). Cette réponse, qui apparaît 3 semaines après l'administration de BPNX, semble décalée d'une semaine par rapport à celle obtenue après la même administration chez des souris saines. Par contre, les IgG anti-Sm28GST ne sont pas détectés dans le sérum des souris ayant reçu la souche virulente recombinante BPGR60 ou la souche sauvage BPSM.

Malgré la durée très limitée de présence des bactéries BPNX au niveau des poumons, une production d'anticorps sériques contre l'antigène hétérologue fusionné à la

FHA a donc été induite, démontrant l'efficacité de la souche recombinante atténuée de *B. pertussis*.

Par la suite, un rappel a été effectué à l'aide de la protéine rSm28GST. Une forte réponse sérique anti-Sm28GST est alors induite chez les souris immunisées avec la souche recombinante BPNX et BPGR60. Ainsi, la souche recombinante virulente est également capable d'induire une mémoire immune spécifique de la Sm28GST chez des souris préalablement infectées par la souche sauvage BPSM.

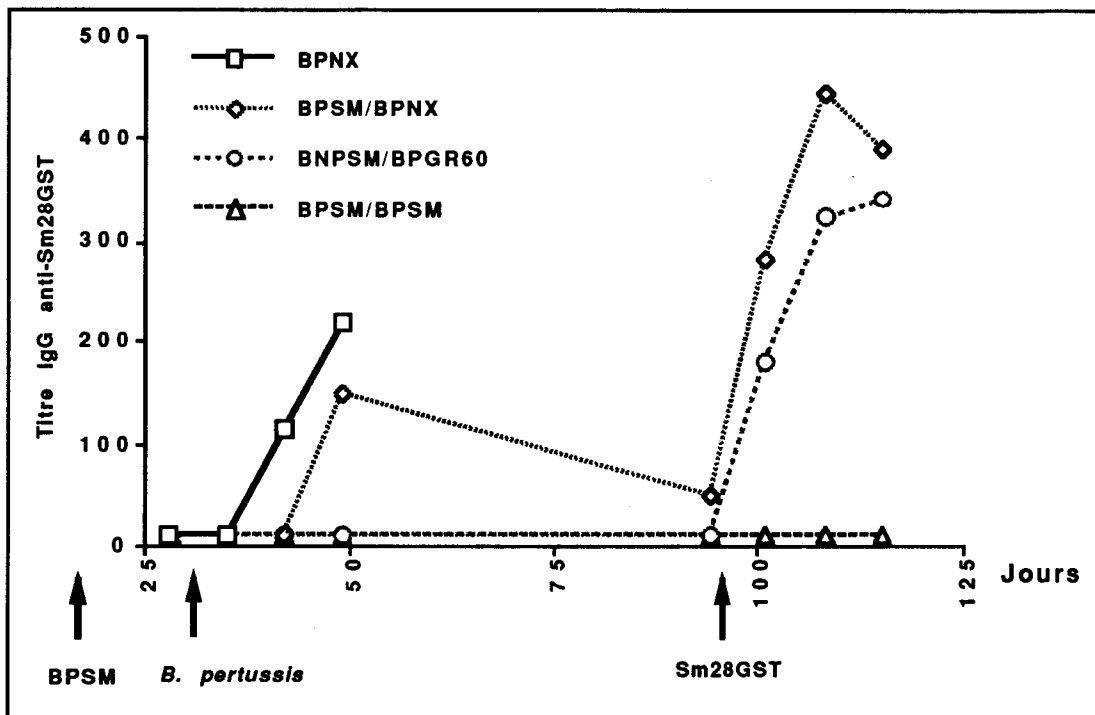


Fig. 25: Réponse sérique IgG anti-Sm28GST chez des souris préalablement infectées avec la souche sauvage BPSM. L'analyse est réalisée par ELISA sur des pools de 5 souris par temps.

L'ensemble de ces résultats nous permet de montrer l'efficacité des souches recombinantes de *B. pertussis*, et plus particulièrement de la souche atténuée, dans des situations défavorables telles qu'une primo-vaccination contre la coqueluche ou une primo-infection avec la souche sauvage.

### C. Immunisation de souris infectées par *S. mansoni*.

Lors des expériences précédentes, nous avons pu montrer que l'infection des souris avec la souche recombinante BPGR60 de *B. pertussis* était capable d'induire une mémoire immune spécifique de la Sm28GST. Ainsi, une infection expérimentale avec le parasite *S. mansoni* était capable chez ces souris de stimuler la production d'anticorps sériques anti-Sm28GST (cf. article : "Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen"). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'administration intranasale de BPGR60 chez des souris préalablement infectées par *S. mansoni*, était capable d'induire une réponse en anticorps anti-Sm28GST.

Des souris OF1 âgées de 4 semaines ont été infestées par voie transcutanée avec 70 cercaires de *S. mansoni*, puis immunisées, un mois plus tard, nasalement avec la souche BPGR60. Aucune réponse sérique anti-Sm28GST n'a pu être mise en évidence dans les trois semaines qui ont suivi l'administration de BPGR60. Néanmoins, le suivi cinétique de la réponse anticorps dans les LBA montre une forte production d'anticorps IgA anti-Sm28GST après administration de la BPGR60 (Fig. 26). Cette réponse n'est pas retrouvée chez des souris infectées par BPSM ou chez les souris contrôle (infestées uniquement).

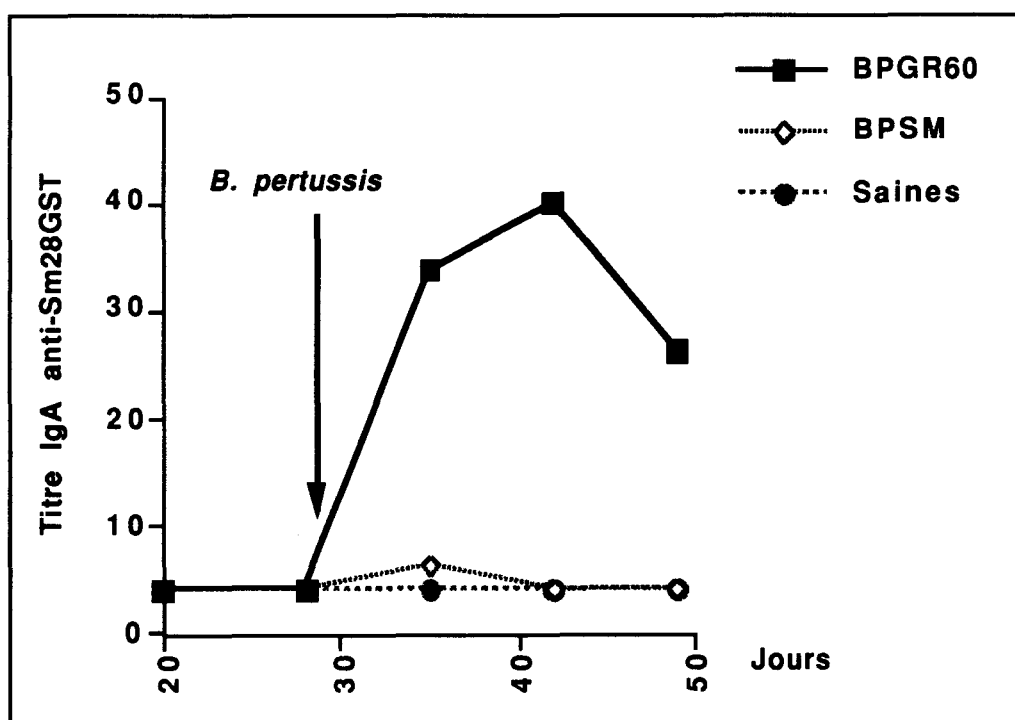


Fig. 26: Réponse IgA dans les LBA de souris infectées par *S. mansoni*, puis infectées avec BPGR60.

La primo-infection étant cette fois-ci réalisée avec le parasite *S. mansoni*, l'induction d'une mémoire immune a donc été générée par la protéine Sm28GST native exprimée par le parasite. Dans ce contexte, nous avons essayé de mettre en évidence une inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST par les anticorps présents dans les LBA des souris infectées par le parasite puis immunisées avec la BPGR60.

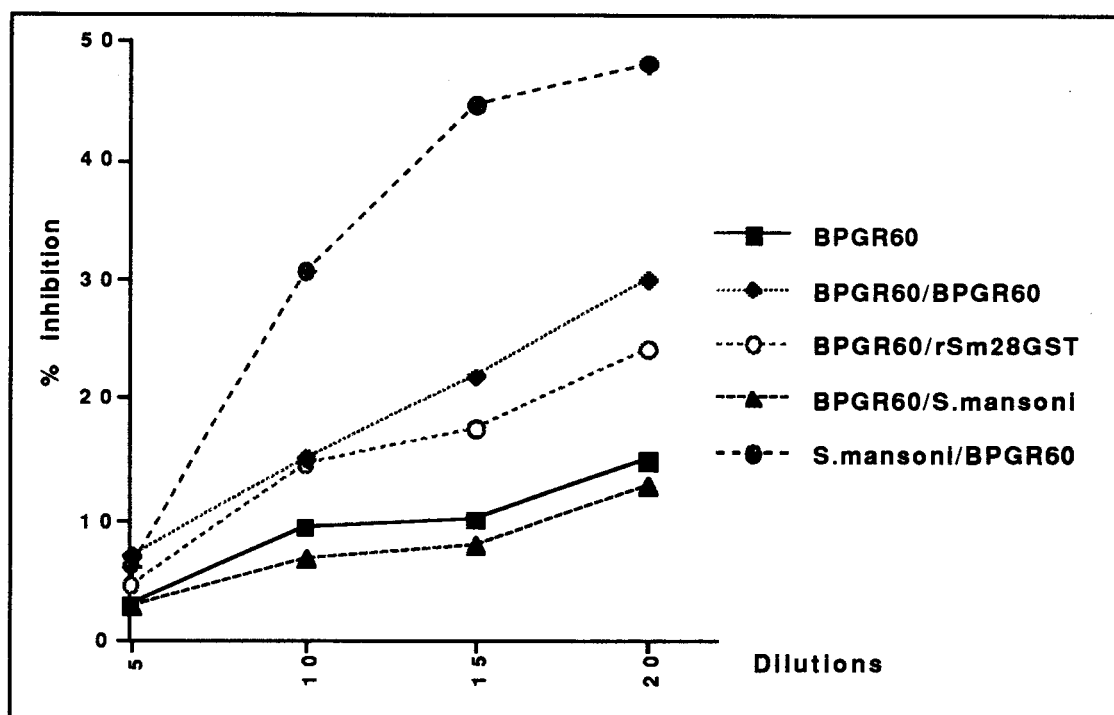


Fig. 27: Pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST par les LBA de souris infectées avec la souche BPGR60. Les LBA utilisés pour cette analyse ont été prélevés 14 jours après l'administration de la souche recombinante de *B. pertussis*.

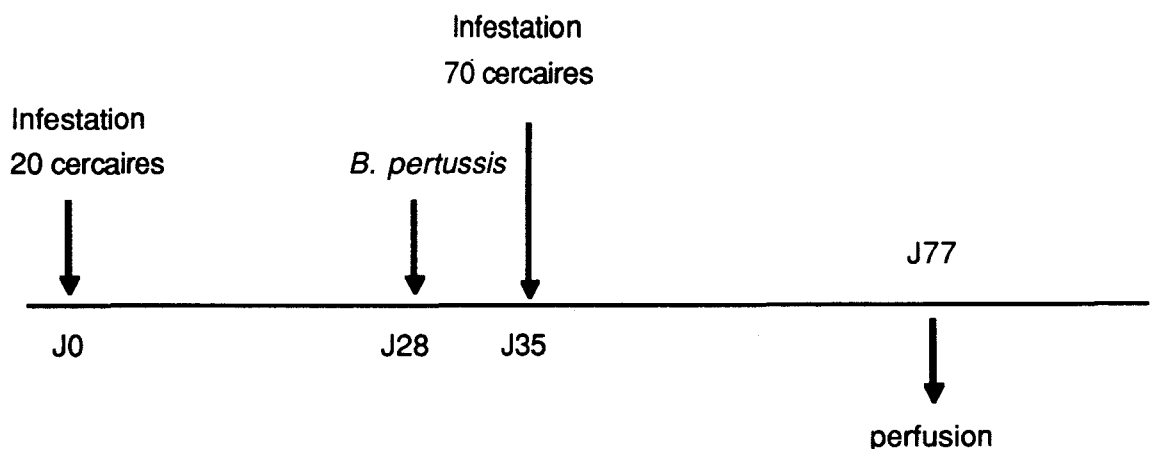
Les résultats obtenus nous indiquent qu'il est possible de mettre en évidence une activité inhibitrice (de l'ordre de 50%) de l'activité enzymatique de la Sm28GST par les anticorps présents dans les LBA des souris infectées par *S. mansoni*, puis immunisées nasalement avec la BPGR60. N'ayant pu détecter d'anticorps sériques au temps correspondant aux prélèvements des LBA, nous pouvons supposer qu'il s'agit ici d'une activité portée par des anticorps sécrétoires. Les souris ayant été d'abord infectées avec la souche recombinante BPGR60 (exprimant une protéine de fusion FHA-Sm28GST où la protéine parasitaire a perdu son activité enzymatique) puis ayant reçu différents types de rappel sont incapables d'exprimer une telle activité inhibitrice.

Suite à ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'administration nasale d'une souche recombinante de *B. pertussis* chez des souris déjà infectées par *S. mansoni*,

pouvait protéger contre une seconde infection par le parasite. Afin de maintenir en vie suffisamment longtemps les souris, la première infestation a été réalisée avec 20 cercaires. Un mois plus tard, 5 souris contrôle ont été perfusées afin de vérifier la qualité de l'infection par *S. mansoni* (le nombre de parasites moyen récupérés étant de 8 vers par souris). Les animaux ont alors été infectés nasalement soit avec les souches recombinantes BPGR60 (virulente) ou BPNX (atténuée), soit avec la souche sauvage BPSM. La seconde infestation, effectuée cette fois-ci avec 70 cercaires, est réalisée une semaine après l'administration des souches de *B. pertussis*.

Lors de l'infestation, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital. Les animaux ayant reçu une semaine auparavant les souches virulentes de *B. pertussis* n'ont pas supporté cette anesthésie: 80% des souris immunisées avec BPGR60 et 50% des souris immunisées avec BPSM sont mortes. Cependant, aucune des souris ayant reçu la souche atténuée BPNX n'a succombé à l'anesthésie, renforçant encore davantage le concept d'atténuation de ce vecteur.

6 semaines après la seconde infestation, les souris sont perfusées afin de déterminer la charge en vers. La charge en oeufs est estimée dans le foie et l'intestin et une moyenne est faite pour la charge en oeufs par gramme d'organes (foie et intestin associés). Le pourcentage de protection est calculé par rapport au groupe de souris infectées par 20, puis 70 cercaires. Les résultats sont donnés dans le tableau:



groupe (nbre de souris)	Nombre de vers	Pourcentage de protection	Nombre d'oeufs par gramme d'organes	Pourcentage de réduction
contrôle (11)	39 ± 3,24		16422 ± 1137	
BPNX (11)	23 ± 2,3	- <b>40,4%</b> (p=0,0004)	10468 ± 949	- <b>36,3%</b> (p=0,0003)
BPGR60 (3)	45 ± 6,44	+ <b>13,5%</b> (NS)	18901 ± 3905	+ <b>13,1%</b> (NS)
BPSM (10)	62 ± 4,05	+ <b>36,5%</b> (p=0,0002)	19975 ± 1390	+ <b>17,8%</b> (p=0,03)

Chez des souris préalablement infectées par *S. mansoni*, une unique administration de la souche recombinante atténuée de *B. pertussis* protège les souris contre une seconde infection par *S. mansoni* avec une réduction du nombre de vers de l'ordre de 40% et une réduction du nombre d'oeufs de l'ordre de 36%.

Par contre, l'administration de souches virulentes (recombinante ou non) entraîne une augmentation de la parasitémie. Cet effet est probablement dû au fait que les souris sont alors déjà affaiblis par la coqueluche.



## ***Discussion - Perspectives***

Le système immunitaire muqueux fait l'objet, depuis plusieurs années, de nombreuses recherches tant au point de vue fondamental qu'appliqué. En effet, l'exploitation du tissu muqueux en tant que cible d'une stratégie vaccinale est très prometteuse puisqu'elle permet d'induire à la fois une réponse locale et une réponse systémique. De nombreux vecteurs vaccinaux, vivants ou synthétiques, ont ainsi été développés, notamment dans le cadre d'une administration par voie orale. Très peu d'études ont porté sur l'exploitation des muqueuses du tractus respiratoire comme tissu cible pour des vecteurs recombinants vivants.

Dans ce contexte, notre travail de thèse a consisté à évaluer le potentiel de *Bordetella pertussis* comme vecteur vivant capable de présenter un antigène hétérologue aux muqueuses des voies respiratoires.

La démarche entreprise a été orientée par plusieurs questions:

- Comment faire exprimer l'antigène hétérologue par *B. pertussis* ?
- Quelle est l'efficacité des souches recombinantes ?
- Peut-on atténuer ces souches tout en conservant leur efficacité ?
- Peut-on appliquer cette stratégie à un modèle ayant déjà été vacciné contre la coqueluche ou infecté par *B. pertussis* ?

Afin d'apporter une réponse à toutes ces questions, nous avons choisi comme protéine hétérologue modèle, la Sm28GST de *S. mansoni*. Le choix de cette molécule repose sur deux considérations, l'une étant théorique, l'autre appliquée:

- L'intérêt de cet antigène dans notre approche réside dans le fait que cette protéine a été extrêmement étudiée, notamment dans le laboratoire du Pr. Capron, ce qui a permis de définir la plupart de ses caractéristiques aussi bien biochimiques qu'immunologiques. De plus, ces études ont permis de mettre en évidence un pouvoir vaccinal important dans

plusieurs modèles animaux, ce qui nous a donné l'avantage de pouvoir tester l'efficacité de nos souches recombinantes contre une infection par *S. mansoni*.

- Le développement d'une souche recombinante de *B. pertussis* exprimant la Sm28GST et induisant une réponse protectrice chez la souris suite à son administration par voie intranasale pourrait représenter une avancée considérable dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la bilharziose.

### **I. Expression d'un antigène hétérologue par *B. pertussis*.**

Parmi les différentes protéines exprimées par *B. pertussis*, la FHA était particulièrement intéressante dans notre approche car elle est présente à la surface de la bactérie et sous forme sécrétée. Plusieurs études (pour revue, Loch, C. et al. 1993) avaient déjà permis de cloner le gène de structure codant pour la FHA, d'étudier sa structure protéique, et de mettre en évidence des propriétés d'adhésion et d'immunogénicité. L'idée originale de ce travail a donc consisté à exploiter les propriétés de la FHA pour présenter la Sm28GST aux muqueuses des voies respiratoires.

Pour mettre au point ce système d'expression hétérologue, nous avons dans un premier temps étudié le mécanisme de sécrétion de la FHA. Ce travail réalisé en collaboration avec Geneviève Renaud-Mongénie et Françoise Jacob-Dubuisson a fait l'objet de deux articles et a permis de proposer un mécanisme de sécrétion de la FHA à travers les deux membranes de *B. pertussis* (cf. Résultats p57).

L'étude de ce mécanisme nous a également amené à imaginer un système où la protéine sécrétée purifiée pourrait être utilisée pour le ciblage de vecteurs synthétiques vers les muqueuses des voies respiratoires. L'administration par voie intranasale de liposomes contenant de la Sm28GST et présentant à leur surface de la FHA a permis d'augmenter la réponse sérique anti-Sm28GST, par un mécanisme probable d'adhésion à la surface des muqueuses entraînant une meilleure stimulation du système immunitaire. Des expériences complémentaires à l'aide de liposomes contenant d'autres antigènes hétérologues devraient nous permettre de confirmer cette propriété. Cette propriété devrait permettre de diminuer la quantité d'antigènes vaccinaux à incorporer dans les préparations liposomales afin d'obtenir une réponse immune spécifique.

L'administration intranasale de ces liposomes FHA-Sm28GST induit également la production d'anticorps anti-FHA, démontrant la potentialité de ces préparations liposomales en tant que vaccin polyvalent. D'autre part, l'utilisation de protéines tronquées de la FHA (par exemple la FHA-44 qui ne possède pas le site RGD de fixation aux macrophages et

qui est fortement sécrétée) nous permettra de cibler de façon plus précise les cellules auxquelles vont adhérer les liposomes possédant des protéines dérivées de la FHA à leur surface, et de déterminer éventuellement les régions de cette protéine bactérienne impliquée dans un phénomène d'adjuvantité.

Une application importante de l'étude de la sécrétion de la FHA était de cibler le site idéal d'intégration du gène hétérologue dans la séquence codant pour la protéine bactérienne. En effet, lors de l'insertion de la Sm28GST, il était important de conserver intact les régions du précurseur de la FHA impliquées dans le mécanisme de sécrétion.

Nous avons également voulu exploiter l'efficacité de sécrétion de la FHA-44, correspondant à la région N-terminale de la FHA. Pour cela, nous avons réalisé une fusion génétique entre la FHA-44 et le peptide 190-211 immunodominant de la Sm28GST. Cette construction plasmidique s'est malheureusement révélée instable chez la souris. Nous avons, par la suite, intégré cette construction au niveau génomique (résultats non présentés). Le niveau d'expression de la protéine de fusion était identique que la construction soit plasmidique ou chromosomique, confirmant les résultats obtenus avec la FHA-44, et démontrant que le niveau de sécrétion élevé n'était pas dû au nombre de copies du gène. Cependant, l'immunisation de souris à l'aide de cette souche recombinante n'a pas permis de détecter de réponse sérique anti-190-211. Ce résultat corrobore les observations faites suite à l'immunisation intrapéritonéale de souris à l'aide du peptide 190-211 où l'immunité induite était cellulaire et non humorale (Panqué et *al.* 1994).

Nous avons alors tenté de mettre à profit l'efficacité du système de sécrétion de la FHA-44 pour présenter la Sm28GST à la surface de la bactérie. Malheureusement, la protéine de fusion FHA-44-Sm28GST n'était pas détectée dans le surnageant de culture de cette souche recombinante. Par la suite, nous avons réalisé différentes constructions où la Sm28GST était en fusion avec la FHA entière (Renauld-Mongénie et *al.* 1996). De la même façon, un niveau réduit de sécrétion de la protéine de fusion était observée. Ce faible taux de sécrétion est indépendant de la taille de la protéine hétérologue fusionnée à la FHA, puisque des constructions ont été réalisées avec une protéine de 170 kDa, et elles ont permis d'obtenir une protéine hybride sécrétée en grande quantité par la bactérie recombinante (Coppens. communication personnelle).

Ce faible niveau de sécrétion de la Sm28GST est retrouvé chez de nombreux système d'expression hétérologue, tel que le BCG (Kremer. 1995) ou le virus de la vaccine recombinant (Pierce. communication personnelle), et semble indiquer que des propriétés intrinsèques de la protéine parasite gênaient sa sécrétion efficace. L'étude du profil d'hydrophilicité de la Sm28GST montre que la protéine parasite renferme plusieurs régions hydrophobes. Ces zones hydrophobes pourraient gêner la translocation

membranaire et empêcher la sécrétion efficace de l'antigène. Il serait intéressant de réaliser des délétions de ces régions hydrophobes et d'analyser ensuite l'efficacité de sécrétion de cette Sm28GST mutée.

## II. Efficacité des souches recombinantes de *B. pertussis*.

Malgré la faible efficacité de sécrétion de la protéine de fusion FHA-Sm28GST par BPGR60, l'administration intranasale de cette souche recombinante de *B. pertussis* entraîne la production d'IgA anti-Sm28GST dans les LBA (Renauld-Mongénie et *al.* 1996) et induit une mémoire immune spécifique de la Sm28GST (Mielcarek et *al.* sous presse). Ainsi, la sécrétion de la Sm28GST ne semble pas indispensable à l'obtention d'une réponse immune spécifique. Cette sécrétion faible, supposée initialement être un inconvénient de ce système d'expression hétérologue, s'avère donc être une problématique mineure dans l'optique d'application de *B. pertussis*, comparée à l'avantage certain de posséder une souche génétiquement stable où le gène hétérologue est inséré dans le génome de la bactérie.

D'autre part, le fait que l'administration de la BPGR60 entraîne la production d'anticorps sériques spécifiques de la FHA mais pas de la protéine parasitaire, peut s'expliquer par la différence de taille des deux molécules. La FHA (220 kDa) va ainsi présenter un nombre d'épitopes beaucoup plus important que la Sm28GST (28 kDa). D'autre part, la protéine bactérienne semble présenter une immunogénicité plus importante que la Sm28GST (Poulain-Godefroy. et *al.* en préparation). L'ensemble de ces observations pourrait expliquer l'orientation de la réponse vers la production d'anticorps anti-FHA après une administration de BPGR60.

Par contre, le rappel avec la rSm28GST libre va stimuler les cellules mémoires, induites suite à l'administration de la souche recombinante de *B. pertussis*, et entraîner la production d'anticorps anti-Sm28GST sériques. La présence de complexes Sm28GST/IgA anti-Sm28GST dans les LBA des souris rappelées avec la rSm28GST peut également contribuer à l'augmentation de la réponse anti-Sm28GST. En effet, Weltzin et *al.* (1989) ont montré que les complexes IgA-antigène adhéraient de manière beaucoup plus efficace aux cellules M des plaques de Peyer que les antigènes libres. Les cellules M étant également présentes au niveau des muqueuses du tractus respiratoire, un tel mécanisme de capture pourrait contribuer, dans notre modèle, à l'établissement de la réponse secondaire contre la Sm28GST.

Le profil de la réponse isotypique anti-Sm28GST obtenue suite à notre protocole d'immunisation avec la souche recombinante BPGR60 et le rappel avec la rSm28GST, est

caractérisé par la présence d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b, ainsi que d'IgA, suggérant une réponse de type mixte Th1/Th2. Ce profil est intéressant du fait que le mécanisme de protection contre la bilharziose fait intervenir des composantes cellulaires et humorales. D'autre part, l'induction d'IgA anti-Sm28GST est particulièrement intéressante dans la mesure où une corrélation étroite entre ce taux d'IgA et l'acquisition d'une résistance à la réinfection a été démontré dans le cas d'infections touchant des populations humaines (Grzych et *al.* 1993).

Dans la protéine hybride produite par la souche recombinante de *B. pertussis*, la Sm28GST ne possède pas d'activité enzymatique, et l'administration intranasale de BPGR60 n'induit pas la production d'anticorps ayant une activité inhibitrice sur l'activité glutathion *S*-transferase de la rSm28GST. Or, nous avons pu mettre en évidence un effet protecteur contre une infection expérimentale par *S. mansoni* après administration de la souche BPGR60 et rappel avec la rSm28GST, qui se traduit par une réduction du nombre de vers et du nombre d'oeufs, mais pas par une réduction de la fécondité des vers femelles. L'efficacité de la réponse protectrice induite avec notre modèle pourrait donc probablement encore être améliorée par la construction d'une souche recombinante de *B. pertussis* exprimant une protéine de fusion où la Sm28GST conserverait son activité enzymatique.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse montre donc l'efficacité de *B. pertussis* en tant que vecteur recombinant vivant administrable par voie nasale. La souche BPGR60 est, en effet, capable d'induire une réponse locale au niveau du tractus respiratoire, ainsi qu'une mémoire immune spécifique de l'antigène hétérologue fusionné à la FHA. Cette méthode d'immunisation permet d'induire une immunité protectrice chez la souris contre une infection par la souche sauvage de *B. pertussis* ainsi que contre une infection par *S. mansoni*.

Cependant, la virulence de la souche recombinante empêchait toute application potentielle chez l'homme. Devant les résultats encourageants obtenus avec la souche BPGR60, nous avons décidé d'atténuer cette souche par délétion chromosomique du gène codant pour PTX.

### III. Construction d'une souche recombinante atténuée de *B. pertussis*.

L'un des problèmes majeurs rencontrés lors de cette étape dans tout développement d'un vecteur recombinant vivant, réside dans le fait que généralement la diminution de la pathogénicité du vecteur est corrélée à la diminution de son immunogénicité.

*B. pertussis* se révéla faire exception à cette règle, puisque l'analyse de la réponse sérique après administration d'une souche BPRA, déficiente dans la production de la toxine, mettait en évidence une augmentation de la production d'anticorps anti-FHA comparée à celle induite par la souche sauvage BPSM.

Nous avons pu démontrer que l'activité enzymatique de PTX, portée par la sous-unité S1, jouait un rôle important sur l'intensité de la réponse anti-FHA, suggérant une activité immunosuppressive de la PTX enzymatiquement active. Or, il est troublant de remarquer que les espèces *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* qui ne synthétisent pas de PTX, produisent également moins de FHA que *B. pertussis*. On peut imaginer que *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* vont produire assez de FHA pour adhérer aux muqueuses des voies respiratoires, mais en quantité suffisamment réduite pour ne pas induire une forte réponse anti-FHA qui entrainerait l'élimination des bactéries par l'organisme infecté. *B. pertussis* ne serait pas "limitée" dans la quantité de FHA produite dans la mesure où la PTX entrainerait une réduction de la réponse anti-FHA, suggérant l'existence d'une balance entre la production de la FHA et la présence de la PTX.

Suite à ces résultats, nous avons supposé que la réponse anticorps spécifique de l'antigène hétérologue fusionné à la FHA pourrait, de la même manière, être augmentée si cette protéine hybride était exprimée par une souche recombinante atténuée. Cette hypothèse nous offrait une ouverture inespérée vers une application potentielle de *B. pertussis* en tant que vecteur recombinant vivant, puisque cela signifiait que la diminution de la pathogénicité du vecteur était corrélée avec une augmentation de l'immunogénicité de la FHA et de l'antigène vaccinal fusionné.

La souche BPGR60 a donc été délétée du gène codant pour la toxine de pertussis par une technique de double recombinaison homologue. L'administration intranasale de cette souche recombinante atténuée, appelée BPNX, entraîne la production d'anticorps anti-FHA, et, comme nous l'espérons, anti-Sm28GST. L'efficacité de cette souche a alors été testée lors d'une infection expérimentale par *S. mansoni*.

Plusieurs éléments de cette expérience se révèlent surprenants:

-Le taux de protection supérieur obtenu avec la souche BPGR60 par rapport à BPNX, pourrait s'expliquer par la forte inflammation au niveau pulmonaire provoquée lors de l'administration de la souche virulente BPGR60 comparée à celle induite avec BPNX.

Ainsi, après une infection expérimentale par *S. mansoni* dans le modèle de vaccination à l'aide de cercaires irradiés, la formation d'agrégats de cellules inflammatoires, constitués majoritairement de lymphocytes T CD4+ et de macrophages, autour des parasites au moment où ils traversent les poumons, rend la migration des schistosomules extrêmement difficile, (Wilson et al. 1986; Smythies et al. 1996). Les parasites qui n'ont pas atteint le système portal hépatique avant l'épuisement de leurs réserves vitales ou avant leur développement en une forme non-migrante, vont se loger dans le système vasculaire des organes internes et éventuellement mourir. De plus, Wynn et al. (1994) a montré que la NO synthétase est induite dans les poumons de ces souris vaccinées avec les cercaires irradiés puis infectées par *S. mansoni*. L'expression de cet enzyme est localisé majoritairement au niveau de l'agrégat de cellules inflammatoires autour des schistosomules. Il est possible que la production locale de NO soit directement toxique pour les parasites qui migrent à travers les poumons (James and Glaven. 1989). De plus, l'inflammation pulmonaire, qui freine la migration, va augmenter le temps d'exposition des schistosomules au NO.

Ce mécanisme d'attrition au niveau pulmonaire pourrait s'appliquer à notre modèle d'immunisation par *B. pertussis*. La souche BPGR60, virulente, protège davantage les souris contre une infection par *S. mansoni* que BPNX, souche atténuée. Le phénomène inflammatoire, au niveau des poumons, provoqué suite à l'administration de BPGR60 est beaucoup plus important que celui observé avec BPNX. Le retard de migration des schistosomules, lié à l'inflammation, pourrait donc être plus élevé chez les souris immunisées avec la souche virulente. De plus, la souche BPGR60 produit de la PTX qui est connue pour induire la production d'IFN $\gamma$  (Mu et al. 1994). Or, cette cytokine active la production de NO, *in vitro*, notamment par les macrophages (James and Nancy. 1993), et nous avons vu précédemment le rôle toxique de la NO sur les schistosomules. L'ensemble de ces observations pourrait expliquer la différence du taux de protection contre *S. mansoni* obtenue après immunisation intranasale avec BPGR60 ou BPNX.

Il sera intéressant de réaliser une analyse du profil de cytokines induites suite à l'administration de BPGR60 et de BPNX au niveau local et au niveau périphérique. Une étude comparative de la réponse cytokine précoce devra être effectuée lors de l'immunisation, et l'analyse de la réponse mémoire pourra être réalisée après restimulation avec les antigènes bactériens.



- La diminution de l'efficacité de la protection suite au rappel avec la rSm28GST

L'une des hypothèses était une modification du profil de la réponse anticorps suite au rappel avec la rSm28GST. Or, l'analyse du profil isotypique de la réponse anti-Sm28GST dans le sérum des différents groupes de souris ne montre aucune différence entre les souris ayant reçu un rappel avec la rSm28GST et celles qui n'ont pas été rappelées.

Le rappel avec la protéine libre est effectué une semaine avant l'infestation par *S. mansoni*. L'administration de l'antigène au niveau des poumons, déjà stimulés par l'administration des bactéries 2 mois auparavant, pourrait créer un "traumatisme" et provoquer une altération du système vasculaire drainant les poumons juste avant l'infestation. Or, les parasites au cours de leur cycle vont passer par les poumons. Une lésion au niveau de cet organe pourrait éventuellement faciliter leur passage directement dans le système sanguin de la souris, ce qui expliquerait le nombre plus élevé de parasites chez les souris rappelées avec la rSm28GST.

Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il nous faudra réaliser une autre expérience d'infection par *S. mansoni* où un groupe de souris sera immunisé avec la souche recombinante de *B. pertussis* puis rappelé avec du PBS une semaine avant l'infestation. Une autre expérience pourrait consister à décaler dans le temps l'infestation par rapport au rappel avec la rSm28GST. Ceci devrait nous permettre de déterminer si le phénomène d'altération des tissus pulmonaires peut être à l'origine de ce phénomène de diminution de la protection suite au rappel avec la rSm28GST.

Chez les souris immunisées avec la souche atténuée non-recombinante, on observe une diminution du nombre de vers par rapport aux souris contrôles, diminution qui augmente après le rappel avec la rSm28GST. La différence porte ici sur l'absence de réponse anti-Sm28GST chez les souris immunisées avec BPRa avant le rappel avec la Sm28GST. Le rappel avec la rSm28GST jouerait donc ici son rôle attendu d'induction d'une immunité protectrice contre le parasite.

La différence dans les taux de protection obtenus lors de cette infection expérimentale par *S. mansoni* et celle décrite dans l'article "Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen" est également surprenante et nécessiterait la mise en place d'une troisième expérience de protection. L'une des explications possibles est basée sur une différence qualitative des cercaires utilisés lors de l'infestation. Lors de l'expérience décrite dans l'article précédemment cité, les parasites provenaient d'un cycle où plusieurs passages sur hamster avaient été réalisés. Au cours de ces passages successifs, les mollusques hôtes intermédiaires produisaient de moins en moins de cercaires. Ceux-ci avaient peut-être également subi des modifications physiologiques entraînant une différence de comportement vis-à-vis de la Sm28GST, expliquant la moins bonne efficacité de

protection observée après immunisation avec les souches recombinantes et les différences suite au rappel avec la rSm28GST.

#### **IV. Utilisation des souches recombinantes de *B. pertussis* dans des conditions particulières.**

La couverture vaccinale contre la coqueluche est très étendue dans les pays industrialisés, alors que, dans les PVD, la maladie touche encore une grande partie de la population. Notre protocole vaccinal utilisant *B. pertussis* recombinant a donc été testé dans les conditions défavorables que sont une primo-vaccination avec le Tétracoq ou une primo-infection avec la souche sauvage de *B. pertussis*.

Les souches recombinantes BPGR60 et BPNX sont administrées intranasalement, 5 semaines après la vaccination ou l'infection. La courbe d'élimination des bactéries recombinantes est très similaire dans les deux types d'expériences. Cependant, l'analyse de la réponse sérique anti-Sm28GST montre des différences importantes, puisqu'un rappel avec la rSm28GST est nécessaire à la production d'anticorps spécifiques chez les souris vaccinées, alors que cette réponse est détectable 15 jours après administration de BPNX à des souris préalablement infectées par BPSM. Cette différence pourrait être liée au fait que le Tétracoq a été administré par voie sous-cutanée, alors que l'infection par *B. pertussis* est effectuée par voie intranasale. En effet, la colonisation des poumons par BPSM (pendant un mois) induit un recrutement des cellules du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, etc...). Lors de l'administration intranasale des souches recombinantes, l'ensemble des cellules impliquées dans l'établissement d'une réponse immune, notamment les cellules présentatrices d'antigènes, sont déjà présentes au niveau pulmonaire et peuvent jouer immédiatement leur rôle dans l'induction d'une réponse anticorps, minimisant ainsi les conséquences de la durée réduite de présence des bactéries recombinantes. L'injection sous-cutanée du Tétracoq ne va pas induire ce recrutement cellulaire au niveau des poumons. Néanmoins, la colonisation réduite des souches BPGR60 et BPNX s'avère suffisante pour induire une mémoire immune spécifique, ce qui permettra la production d'anticorps anti-Sm28GST après le rappel avec l'antigène parasitaire.

Un autre type d'expérience a été réalisé afin de déterminer si l'administration d'une souche recombinante de *B. pertussis* pouvait prévenir une seconde infection par *S. mansoni*.

Nous avons infecté les souris avec 20 cercaires, puis réalisé une seconde infection une semaine après l'immunisation avec BPGR60 et BPNX. Ce protocole se justifiait par la

mise en évidence, à cette période, d'une réponse IgA anti-Sm28GST lors d'une expérience préliminaire.

Cependant, ce temps correspond également à la multiplication des bactéries dans les poumons. L'administration de l'anesthésique, à ce moment-là, s'est révélée fatale pour nombre de souris ayant reçu la souche virulente (recombinante ou non), du fait probablement de la forte réaction inflammatoire au niveau des poumons responsable d'un affaiblissement des souris. Les résultats de protection contre une seconde infection, obtenus avec la souche BPGR60 ne sont donc pas significatifs puisque basés sur les trois souris survivantes. D'autre part, la survie de ces souris repose peut-être sur une mauvaise qualité d'immunisation avec BPGR60.

Ainsi, cette expérience nous a permis de conforter la notion d'innocuité de la souche BPNX, puisqu'aucune souris n'a succombé à l'anesthésie. De plus, la diminution du nombre de vers adultes et de la charge en oeufs suite à l'administration intranasale de BPNX est probablement dû à l'induction d'une réponse protectrice contre les parasites provenant de la seconde infestation. Néanmoins, on ne peut ignorer une action éventuelle sur les vers de la première infection, comme cela a été décrit très récemment après l'administration intranasale de Sm28GST couplée à la CTB (Sun. Giens.1996).

## V. Perspectives.

L'ensemble de ce travail constitue un premier pas très encourageant vers l'utilisation de *B. pertussis* atténué comme vecteur recombinant vivant, capable de protéger à la fois contre la coqueluche et contre d'autres maladies. Cependant, de nombreuses étapes restent encore à franchir avant son utilisation éventuelle chez l'homme.

L'atténuation obtenue par délétion du gène codant pour PTX correspond à une première étude. En effet, cette toxine étant également un antigène protecteur majeur contre *B. pertussis*, une mutation entraînant une perte des fonctions cytotoxiques tout en conservant les propriétés immunogéniques de cette protéine, semble préférable à une absence d'expression. Dans ce contexte, la souche BPDS1, possédant une délétion du résidu Cys-41 au niveau de la sous-unité S1, serait un bon modèle afin de déterminer si la présence de l'oligomère B de PTX (sans S1) améliorerait le niveau de protection contre une infection par *B. pertussis*, par rapport à BPRA. Une autre solution consisterait à utiliser une souche produisant une PTX mutée qui exprime une sous-unité S1 ne possédant pas d'activité enzymatique, responsable de la majorité des effets toxiques. Nous pourrions, dans ce but, utiliser l'exemple de la PTX mutée (PT-9K/129G) décrite par Roberts *et al.* (1995).

D'autre part, la PTX ne représente qu'un des facteurs de virulence dont il serait important d'altérer l'expression pour obtenir une souche suffisamment atténuée.

La toxine adénylate cyclase (Ac-Hly) est responsable d'une activité cytotoxique qui est à l'origine de lésions pulmonaires durant l'infection par *B. pertussis* (Khelef et al. 1994). Elle est également essentielle aux stades précoces de la colonisation du tractus respiratoire (Gross et al. 1992; Khelef et al. 1992), et son absence pourrait réduire de manière importante la durée de présence de la bactérie au niveau des poumons. De plus, l'Ac-Hly est un antigène protecteur important dans un modèle respiratoire murin (Guiso et al. 1991), et des anticorps dirigés contre Ac-Hly ont été détectés dans le sérum d'enfants et d'adultes infectés par *B. pertussis* (Arciniaga et al. 1991). Il serait donc préférable de réaliser des mutations dans la partie N-terminale enzymatiquement active de Ac-Hly afin de conserver les épitopes protecteurs de cette toxine tout en éliminant ses effets nocifs.

L'expression de la toxine dermonécrotique (DNT), très active puisque la dose létale chez des souris adultes est obtenue avec des nanogrammes de toxine (Zhang et al. 1991), représente également un inconvénient pour l'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur vaccinal. La délétion du gène codant pour cette protéine nous permettrait d'obtenir une souche moins toxique dont l'efficacité devra être évaluée.

La cytotoxine trachéale (TCT) est un monomère de peptidoglycane qui est relargué par *B. pertussis* durant sa phase de croissance (Cookson et al. 1989). La TCT est responsable de la destruction des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, affaiblissant ainsi le processus de "nettoyage" de cet épithélium. Cette destruction favorise la colonisation du tractus respiratoire par *B. pertussis*. De manière générale, les bactéries Gram négatives produisent ces monomères par clivage des peptidoglycannes par des enzymes périplasmiques, mais ces produits sont recyclés par les microorganismes et non pas rejetés comme chez *B. pertussis*. Dans le cas d'*E. coli*, ce mécanisme de recyclage est permis par la présence d'un transporteur (AmpG) présent sur la membrane cytoplasmique. Un plasmide contenant le gène *ampG* d'*E. coli* a été introduit dans *B. pertussis* et une réduction du relargage de la TCT de 85 à 90% a été observée par cette souche (Stith et al. 1996). La recherche du gène *ampG* de *B. pertussis* nous permettrait de déterminer si ce gène est absent, et dans ce cas l'insertion du gène *ampG* d'*E. coli* dans le chromosome de *B. pertussis* devrait permettre de réduire la production de TCT. Si le gène est présent mais faiblement exprimé, l'insertion d'un promoteur fort devrait augmenter son expression, et enfin si *B. pertussis* possède un gène *ampG* inactif, des mutations génétiques nous permettraient d'obtenir la production d'une protéine capable de recycler le produit de clivage correspondant à TCT, réduisant ainsi la toxicité de *B. pertussis*.

L'un des problèmes qui pourraient alors se poser serait que l'ensemble de ces mutations conduise à une souche de *B. pertussis* beaucoup moins toxique, mais qui se révélerait également beaucoup moins efficace dans sa capacité à coloniser le tractus respiratoire du sujet receveur. Cependant, comme nous avons pu montrer que l'intensité de la réponse en anticorps anti-FHA augmentait après administration nasale d'une souche déficiente dans la production de PTX, et plus précisément d'une PTX enzymatiquement active, nous pouvons espérer que cette augmentation de l'immunogénicité de la FHA se retrouvera dans des souches plus atténuées et qu'elle sera suffisante à l'obtention d'une réponse immune contre la FHA et contre un antigène hétérologue fusionné à la FHA.

La construction de souches recombinantes atténuées de *B. pertussis* exprimant d'autres antigènes étrangers représente également une des priorités dans le développement de ce modèle. En effet, cette approche pourrait être très efficace pour l'obtention d'une protection contre des pathogènes respiratoires. De plus, de part le fait qu'il existe un système immunitaire mucosal commun (Mestecky *et al.* 1987), ce mode de vaccination pourrait également prévenir des infections au niveau des muqueuses uro-génitales ou intestinale.

L'application de notre protocole d'immunisation à l'aide d'une souche recombinante de *B. pertussis* dans le cadre d'une stratégie vaccinale reste encore une perspective à long terme. Cependant, l'obtention d'une souche totalement atténuée de *B. pertussis* nous permettrait de pouvoir évaluer l'efficacité de notre protocole, dans un premier temps chez un modèle plus proche de l'homme comme le porc, et peut être ensuite chez l'homme.

D'autre part, l'intérêt de la vaccination par voie nasale ne cesse d'augmenter. Des essais de vaccination, chez des enfants en bas-âge, à l'aide d'un virus atténué par voie nasale contre la rougeole sont déjà en cours (Lambert. communication personnelle). Lors de ces immunisations, il est important de tenir compte de l'état de santé des enfants. En effet, les taux de protection contre la rougeole variaient de 30 à 80% selon que les enfants étaient ou n'étaient pas enrhumés.

La vaccination par voie nasale à l'aide d'un vecteur synthétique ou vivant atténué est ainsi l'une des méthodes prometteuses qui sera probablement développée durant les prochaines décennies.

## ***Annexe Technique***

## I. Techniques utilisées pour la construction et l'analyse de l'antigénicité des différentes souches recombinantes de *B. pertussis*.

### A. Culture des souches de *B. pertussis*.

Les différentes souches de *B. pertussis* sont mises en culture sur un milieu solide Bordet-Gengou (BG) ou dans un milieu liquide Stainer-Scholte (SS).

Milieu Stainer & Scholte (SS) : 1L de fraction A additonné de 10ml de fraction B.

- Fraction A, pour 1L : 11,84g Na-l-glutamate H<sub>2</sub>O, 0,24g L-proline, 2,5g NaCl, 0,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g KCl, 0,1g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1ml (solution à 20g/L), 1,5g Tris, 10g Casaminoacide, 1g Cyclodextrine.

- Fraction B pour 10 ml : L-cystéine 1ml (solution à 40g/L), FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1ml (solution à 10g/L), acide nicotinique 1ml (solution à 4g/L), 0,4g acide ascorbique, 0,15g glutathion forme réduite.

Milieu Bordet-Gengou (BG) pour 1L : 36g milieu BG Agar base (Difco), 10ml glycérol, 200ml sang de mouton défibriné prélevé aseptiquement.

### B. Construction des plasmides.

Cette étape est réalisée selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.* (1989). Les plasmides initiaux sont digérés par des enzymes de restriction choisis afin de permettre l'insertion d'un fragment d'ADN ayant, lui aussi, subi une digestion enzymatique appropriée. Lorsque la construction le nécessite, le plasmide est déphosphorylé par la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP). La ligation entre le plasmide et l'insert est réalisée dans une proportion 1/4 avec la ligase du bactériophage T4. Le mélange de ligation est incubé toute la nuit à 15°C.

La méthode utilisée pour la préparation des cellules compétentes et la transformation bactérienne avec des plasmides est celle décrite par Hanahan *et al.* (1983). Les transformants

sont ensuite sélectionnés sur des milieux contenant l'antibiotique approprié, les plasmides introduits dans ces bactéries portant le gène de résistance à cet antibiotique.

Après vérification de la construction, l'ADN plasmidique est purifié par passage sur une résine échangeuse d'anions à l'aide du kit "Qiagen".

### C. Construction dans *Bordetella pertussis*.

Deux techniques ont été utilisées lors de la construction des différentes souches recombinantes de *B. pertussis*.

#### 1. Électroporation de *B.pertussis* avec de l'ADN plasmidique d'*E.coli*.

Après 48 hrs de culture liquide de la souche BPGR4 de *B.pertussis*, du diméthylsulfoxyde est ajouté à raison de 5 à 7% final. Les cellules peuvent être conservées à -20°C. Les bactéries sont ensuite remises en culture pendant 24 hrs. Après centrifugation, le culot de cellules fragilisées est lavé deux fois dans de l'eau stérile puis repris dans une solution de glycérol 10% et mis en contact avec l'ADN plasmidique dialysé. L'électroporation est réalisée avec l'appareil BioRad (600Ω, 25μF, 2500V). Les bactéries sont ensuite transférées dans du milieu SS et incubées 6 hrs à 36°C avant d'être étalées sur les milieux de sélection.

#### 2. Croisement entre une souche de *B.pertussis* et une souche d'*E.coli*.

Nous avons choisi la technique de double recombinaison homologue pour remettre les constructions génétiques au locus chromosomique de la FHA. Après culture des souches de *B.pertussis* et d'*E.coli* sur des milieux de sélection appropriés, le croisement s'effectue sur un milieu non sélectif. La méthode suivie est celle décrite par Stibitz *et al.* (1989).

Brièvement, la construction génétique que l'on désire insérer dans le génome de *B. pertussis* est placée dans un plasmide navette mobilisable (dérivé du plasmide pSO (ref)), possédant les régions flanquantes du locus chromosomique dans lequel on souhaite transférer la construction. Une souche d'*E. coli* (S17-1) est transformée par ce plasmide recombinant. Le choix de cette bactérie repose sur le fait qu'elle possède les gènes de transfert *tra* qui agissent en trans sur l'origine de transfert portée par le plasmide recombinant et permet ainsi sa mobilisation (Simon *et al.* 1983).

Par exemple, la souche S17-1 (pSOX) (streptomycine sensible (S<sup>S</sup>), gentamycine résistante (G<sup>R</sup>), acide nalidixique sensible (N<sup>S</sup>)) est croisée sur un milieu solide BG (donc sans pression sélective) avec la souche BPGR4 (S<sup>R</sup>, G<sup>S</sup>, N<sup>R</sup>). Cette souche étant dépourvue de la majorité du gène de structure *thaB*, les événements de double recombinaison homologue seront "forcés" au niveau des régions flanquantes de ce gène. 6 heures plus tard, les



transconjuguants sont sélectionnés sur un milieu sélectif BG contenant 25 µg/ml de gentamycine et 10 µg/ml d'acide nalidixique (BG G<sub>25</sub>N<sub>10</sub>). La résistance à la gentamycine étant amenée par le plasmide pSOX et celle à l'acide nalidixique étant portée par le chromosome de BPGR4. A partir de cette boîte, 50 colonies isolées sont repiquées sur BG G<sub>25</sub>N<sub>10</sub>. Afin de déterminer dans quels clones a eu lieu le premier événement de recombinaison entraînant l'intégration du plasmide dans le chromosome, et qui sont devenus de ce fait, S<sup>S</sup> et G<sup>R</sup> (le caractère de sensibilité à la streptomycine étant dominant sur celui de la résistance), chaque clone est repiqué sur BG S<sub>100</sub> puis sur BG G<sub>25</sub>N<sub>10</sub>. La même technique est appliquée par la suite pour sélectionner les bactéries qui ont subi le second événement de recombinaison. Si cet événement se réalise au même endroit que la première fois, on retrouve le plasmide avec la construction de départ et le chromosome initial de BPGR4. S'il a lieu dans l'autre région recombinogène, la construction sera intégrée dans le génome de *B. pertussis*. La perte du plasmide ayant apporté la construction est sélectionnée par l'apparition du phénotype S<sup>R</sup>G<sup>S</sup>.

#### **D. Analyse de la fraction protéique associée aux cellules et du surnageant de culture des différentes souches de *B. pertussis* par immunoblot.**

Le culot et le surnageant de culture sont traités puis mis à migrer en système d'électrophorèse SDS-PAGE. Après migration, le transfert des protéines se fait sur feuille de nitrocellulose (Schleicher&Schuell) pendant 3h à 60V. La membrane est ensuite saturée dans du 3% PBS-BSA pendant 1 h. Elle est alors mise en contact avec l'anticorps primaire pendant toute la nuit. Après plusieurs lavages, un anticorps secondaire marqué à la peroxydase (conjugué anti-IgG(H+L) de lapin (Diagnostics Pasteur, France) ou à la phosphatase alcaline (conjugué anti-IgG(H+L) de rat (Jackson ImmunoResearch), conjugué anti-IgG(H+L) de souris (Promega, USA) est ajouté. La réaction est révélée respectivement par une réaction enzymatique avec le substrat (4-chloro-1-naphtol, BioRad) de la HRP ("Horse Radish Peroxydase") en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour le premier enzyme et par la réaction avec le NBT (nitro blue tetrazolium) et le BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) pour le second.

## **II. Analyse des différentes souches de *B. pertussis* *in vivo*.**

### **A. Le modèle animal.**

Nos travaux étant orientés vers une stratégie vaccinale, les souris utilisées sont des souris OF1 (race non pure) dont l'hétérogénéité génétique peut être représentative de ce qu'on

peut observer dans une population humaine. Nos expériences sont réalisées sur des souris femelles âgées de 4 semaines au début de l'étude.

## **B. Administration et évaluation de la colonisation des poumons par les différentes souches de *B. pertussis*.**

$5 \cdot 10^6$  bactéries *B. pertussis* en suspension dans du PBS stérile (cellules grattées d'une culture sur milieu solide BG) sont administrées intranasalement à raison de 25  $\mu$ l par narine, à des souris sous anesthésie au pentobarbital (200 $\mu$ l d'une solution au 1/20 dans du PBS par 10g de souris). Les poumons de trois souris sont ensuite prélevés 3h après l'injection, puis à 7, 14, 21 jours, etc... après l'injection. Les poumons sont alors homogénéisés dans 5 ml de PBS stérile. Les colonies bactériennes sont ensuite comptées 3 à 4 jours après étalement des broyats sur milieu solide BG contenant 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et 25  $\mu$ g/ml d'acide nalidixique (BGSN).

## **C. Analyse histologique de l'inflammation au niveau des poumons.**

Pour analyser l'intensité de l'infiltration cellulaire, les poumons sont prélevés 14 jours après l'administration de *B. pertussis*. Les poumons sont fixés dès le prélèvement dans du paraformaldéhyde à 4% pendant une nuit à 4°C. Les organes sont déshydratés par bains successifs d'éthanol (Merck) à concentration croissante, puis mis en contact avec du 1-butanol (Merck) pendant 24h à 4°C pour améliorer l'infiltration de la paraffine. L'inclusion est alors réalisée par infiltration de la paraffine (Paraplast Lancer) 4 à 5h à 56°C. Les coupes sur lames, de 6  $\mu$ m d'épaisseur, sont réalisées au microtome. Préalablement au marquage, les coupes doivent être déparaffinées au toluène (Merck) et réhydratées. La réhydratation des coupes, réalisées par des bains d'alcool en concentration décroissante, se termine en utilisant un tampon TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4). La coloration des noyaux cellulaires est effectuée par contact durant 10 mn avec de l'hématoxyline, suivi d'un rinçage des lames pendant 40 mn sous l'eau courante.

## **D. Analyse de la réponse en anticorps par test ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assays).**

Les souris sont saignées au niveau du plexus rétroorbital. Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) sont obtenus, à l'aide d'une cannule introduite dans la trachée, après trois lavages consécutifs avec 0,5 ml de PBS, et sont ensuite centrifugés à 4000 trs/min pendant

10 mn. Les sérums et les LBA sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse par ELISA de leur contenu en anticorps.

Le taux d'anticorps spécifiques de la FHA et de la Sm28GST dans les sérums et les LBA est évalué par ELISA. Brièvement, 50  $\mu\text{l}$  d'une solution à 10  $\mu\text{g/ml}$  de FHA ou de Sm28GST diluées dans du PBS sont déposés dans chaque puits d'une microplaque (Immulon III; Dynatech laboratories, Virginia USA) pendant 2h30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ .

Pour la détermination du taux d'anticorps sériques, les sérums, dilués dans du PBS contenant 0,1% de Tween 20 (PBS/Tw) et 0,5% de gélatine (PBS/Tw/gel), sont déposés sur les plaques ELISA après 3 lavages en PBS/Tw, et incubés toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le lendemain, les plaques sont laissées pendant 30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis lavées 3 fois avec du PBS/Tw, avant d'être incubées 1h30mn à  $37^{\circ}\text{C}$  avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué à la peroxydase (IgG-HRP; Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA).

Pour la détermination des anticorps présents dans les LBA, les plaques sont saturées pendant 30mn avec du PBS/gel puis lavées 3 fois avec du PBS/Tw, avant de déposer les LBA dilués dans du PBS/Tw et de mettre à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant toute la nuit. Un anticorps anti-IgA de souris marqué à la biotine (Amersham, Bucks., U.K.) dilué dans du PBS/Tw/gel est ajouté et les plaques sont incubées pendant 1h30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après 5 lavages en PBS/Tw, un conjugué streptavidine-peroxydase (Amersham) est ajouté pendant 3 mn à  $37^{\circ}\text{C}$ .

La révélation du test ELISA est réalisée par addition, après 6 lavages en PBS/Tw, de 1 mg/ml d'orthophényldiamine (Sigma) dans un tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 5,5), contenant 0,03% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et incubation pendant 30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ . La réaction est arrêtée par addition de 50 $\mu\text{l}$  de 2N HCl. La densité optique (DO) est mesurée à 492 nm et une courbe de régression linéaire de  $\log(\text{DO})$  en fonction de la dilution du sérum ou du LBA est tracée. Les résultats sont exprimés en DO ou en titre, calculé comme étant la réciproque de la dilution donnant une DO équivalente, pour les sérums, à 3 fois la DO obtenue avec le contrôle conjugué, et à 2 fois la DO du conjugué pour les LBA.

Pour la détermination des complexes IgA/antigènes présents dans les LBA, 100  $\mu\text{l}$  d'une solution à 5  $\mu\text{g/ml}$  d'IgG anti-Sm28GST de lapin (fraction purifiée d'un sérum polyclonal) dilués dans un tampon contenant 15 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM de  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) sont déposés dans chaque puits d'une microplaque pendant 2h30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les plaques sont ensuite saturées pendant 30mn avec du PBS/gel puis lavées 3 fois avec du PBS/Tw, avant de déposer les LBA dilués dans du PBS/Tw et de mettre à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant toute la nuit. Un anticorps anti-IgA de souris marqué à la biotine (Amersham, Bucks., U.K.) dilué dans du PBS/Tw/gel est ajouté et les plaques sont incubées pendant 1h30mn à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après 5 lavages en PBS/Tw, un conjugué streptavidine-peroxydase (Amersham) est ajouté pendant 3 mn à  $37^{\circ}\text{C}$ .

## **E. Analyse de l'activité enzymatique de la Sm28GST en fusion avec la FHA.**

L'activité enzymatique de la Sm28GST en fusion avec la FHA, protéine hybride purifiée à partir d'un surnageant de culture de la souche BPGR60, est mesurée dans 820 ml de tampon de réaction (50 mM tampon phosphate (pH 6,5) contenant 0,36 mM de 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB, Sigma) et 4,76 mM de glutathion réduit (GSH). La réaction enzymatique débute avec l'ajout de 10 ml de solution de protéines à tester et est suivie pendant 20 mn à 340 nm.

L'inhibition enzymatique des sérums est testée par mélange de 24 ml de sérum avec 12 µg de rSm28GST (diluée dans 1,2 µl de tampon phosphate 0,05 µ pH 6,5) pendant 1h à 37°C puis 4h à 4°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans des microplaques NUNC (InterMed, Danemark) (21 µl/puits contenant 0,1 µg de GST). L'activité résiduelle de la Sm28GST dans chaque préparation est évaluée en présence de 1 mM CDNB et 1 mM de GSH dans un volume de 200 µl de tampon phosphate. La D.O. est mesurée à 340 nm sur un temps de 10 mn. Le bruit de fond a été soustrait par rapport à chaque échantillon traité dans les mêmes conditions mais sans enzyme.

## **III. Analyse de l'effet protecteur contre une infection par *S. mansoni*.**

Le cycle parasitaire de la souche Guadeloupe de *S. mansoni*, est maintenu en utilisant le hamster comme hôte définitif et *Biomphalaria glabrata* comme mollusque hôte intermédiaire. Les souris sont infestées par passage à travers la peau de 70 cercaires selon la méthode de Smithers *et al.* (1969). Une perfusion totale est effectuée 42 jours après l'infestation et les vers sont comptés au microscope optique, en double aveugle. Au moment de la perfusion, l'intestin et le foie sont prélevés et digérés séparément par de la potasse à 4% afin d'estimer le nombre d'oeufs par tissu. Le pourcentage de protection est calculée suivant la formule  $(A-B/A) \times 100$ , où A représente le nombre de vers moyen déterminé dans les souris contrôle, et B le groupe de souris immunisées. L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du test de Student.

## ***Références***

- Actor, J.K., Shirai, M., Kullberg, M.C., Buller, R.M.L., Sher, A., and Berzofsky, J.A. 1993. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:948-954.
- Actor, J.K., Marshall, M.A., Eltoun, I.A., Buller, R.M.L., Berzofsky, J.A, and Sher, A. 1994. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur. J. Immunol.* 24:3050-3056.
- Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. 1988. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden-protective efficacy and adverse events. *Lancet.* 1:955-960.
- Akerley, B.J., and Miller, J.F. 1996. Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends in Microbiol.* 4:141-146.
- Albina, J.E., Abate, J.A., and Henry, W.J. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.* 147:144-148.
- Amiri, P., Locksley, R.M., Parslow, T.G., Sadick, M., Recto, E., Ritter, D., and McKerrow. 1992. Tumor necrosis factor a restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature.* 356:604-606.
- Amory-Soisson, L.M., Masterson, C., Tom, T.D., McNally, M.T., Lowell, G.H., and Strand, M. 1992. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* 149:3612-3620.
- Amsbaugh, D.F., Li, Z.M., and Shahin, R.D. 1993. Long-lived respiratory immune response to filamentous hemagglutinin following *Bordetella pertussis* infection. *infect. Immun.* 61:1447-1452.
- Antoine, R., and Locht, C. 1990. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 58:1518-1526.

- Arciniaga, J.L., Hewlett, E.L., Johnson, F.D., Deforest, A., Wassilak, S.G.F., Onorato, I.M., Manclark, C.R., and Burns, D.L. 1991. Human serologic response to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. J. Infect. Dis. 163:135-142.
- Ashworth, L.A.E., Fitzgeorge, R.B., Irons, L.I., Morgan, C.P., and Robinson, A. 1982. Rabbit nasopharyngeal colonization by *Bordetella pertussis*: the effects of immunization on clearance and on serum and nasal antibody levels. J. Hyg. 88:475-486.
- 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., Ouassi, M.A., Torpier, G., Eisen, H., and Capron, A. 1981. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. Parasite Immunol. 3:33-39.
- 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 the T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model using synthetic peptides. J. Immunol. 141:1687-1694.
- Bacon, G.A., Burrows, T.W., and Yates, M. 1951. The effect of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. Br. J. Exp. Pathol. 32:85-96.
- Balloul, J.M., Pierce, R.J., Grzysch, J.M., and Capron, A. 1985. In vitro synthesis of a 28 kDa antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 17:105-114.
- Balloul, J.M., Grzysch, J.M., Pierce, R.J., and Capron, A. 1987a. A purified 28 kDa 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., Grzysch, J.M., Pierce, R.J., Carvalho, 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., Grzysch, J.M., Pierce, R.J., Carvalho, D., Lecocq, J.P., and Capron, A. 1987c. Vaccination of baboons

- with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In: Molecular Paradigms for the eradication of helminth parasites. A.J. MacInnis, ed, Alan R. Liss, New York, pp. 77-84.
- Barenkamp, S.J., and Leininger, E. 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 60:1302-1313.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Goodwin, M.S.M. 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* 173:720-726.
- Beattie, D.T., Shahin, R., and Mekalanos, J.J. 1991. A vir-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence. *Infect. Immun.* 60:571-577.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., and Sebo, P. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269:27231-27239.
- Bergquist, N.R. 1995. Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option? *Parasitol. Today.* 11:191-194.
- Betsou, F., Sebo, P., and Guiso, N. 1993. CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61:3583-3589.
- Betsou, F., Sebo, P., and Guiso, N. 1995. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 63:3309-3315.
- Bienenstock, J., Johnson, N., and Perey, D.Y.E. 1973. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab. Invest.* 28:686-692.
- Bienenstock, J., and Clancy, R. 1994. Bronchial mucosal lymphoid tissue. In: Handbook of Mucosal immunology. Eds Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R., and Bienenstock, J. pp529-538.



- Black, W.J., Munoz, J.J., Peacock, M.G., Schad, P.A., Cowell, J.L., Burchall, J.J., Lim, M., Kent, A., Steinman, L., and Falkow, S. 1988. ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin and immunomodulation by *Bordetella pertussis*. *Science*. 240:656-659.
- Boehm, D.F., Welch, R.A., and Snyder, I.S. 1990. Domain of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58:1951-1958.
- Bordet, J., and Gengou, O. 1906. Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 20:731-741.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D., and Locht, C. 1994. The modular architecture of bacterial response regulators. *J. Mol. Biol.* 241:363-377.
- Boucher, P., Sato, H., Sato, Y., and Locht, C. 1994. Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect. Immun.* 62:449-456.
- Boulanger, D., Reid, G.D.F., Sturrock, R.F., Wolowczuk, 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., 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.
- Boyland, E., and Chasseaud, L.F. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferase in merapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.* 32:173-219.
- Brahams, D. 1988. Pertussis vaccine: court finds no justification for association with permanent brain damage. *Lancet*. i:837.
- Brandtzaeg, P. 1989. Overview of the mucosal immune system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146:13-21.

- Brines, R. 1996. Two hundred years on: Jenner and the discovery of vaccination. *Immun. Today*. 17:203-204.
- Bromberg, K., Tannis, G., and Steiner, P. 1991. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with human immunodeficiency virus infection. *Infect. immun.* 59:4715-4719.
- Brophy, P.M., and Barret, 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.
- Burnette, W.N., Mar, V.L., Cieplak, W., Morris, C.F., Kaljot, K.T., Marchitto, K.S., Sachdev, R.K., Locht, C., and Keith, J.M. 1988. Direct expression of *Bordetella pertussis* toxin subunits to high levels in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*. 6:699-706.
- Bushara, H.O., M.E.N. Bashir, K.H.E. Malik, M.M. Mukhtar, F. Trottein, A. Capron, and M.G. Taylor. 1993. Suppression of *S. Bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione *S*-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasit. Immunol.* 15:383-390.
- Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., and Rees, P.M. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*. 256:727-730.
- Butterworth, A.E. 1992. Vaccines against schistosomiasis: where do we stand ? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:1-2.
- Cahill, E.S., O'Hagan, D.T., Illum, L., Barnard, A., Mills, K.H.G., and Redhead, K. 1994. Immune responses and protection against *Bordetella pertussis* infection after intranasal immunization of mice with filamentous hemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles. *Vaccine*. 13:455-462.
- 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.

- Capiau, C. Petre, J., Van damme, J., Puype, M., and Vanderkerckhove, J. 1986. Protein-chemical analysis of pertussis toxin reveals homology between the subunits S2 and s3, between S1 and the A chains of enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* and identifies S2 as the haptoglobin-binding subunit. FEBS Lett. 204:336-340.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., and Bazin, H. 1975. Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. Nature. 253:274-275.
- Capron, M., Bazin, H. Joseph, M. and Capron, A. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. J. Immunol. 126:1764-1768.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Ouma, J.H., and Butterworth, A.E. 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. Science. 238:1065-1072.
- Capron, A. 1995a. Le langage moléculaire des parasites. Médecine & Sciences. 11:431-433.
- Capron, A., Riveau, G., Grzysch, J.M., Boulanger, D., Capron, M., and Pierce, R. 1995b. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90:235-242.
- Chanock, R.M., and Murphy, B.R. 1980. Use of temperature-sensitive and cold-adapted mutant viruses in immunoprophylaxis of acute respiratory tract disease. Rev. Infect. Dis. 2:421-432.
- Charles, I.G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., and Fairweather, N.F. 1989. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:3554-3558.
- 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.
- Chong, P., Zobrist, G., Sia, C., Loosmore, S., and Klein, M. 1992. Identification of T- and b-cell epitopes of the S2 and S3 subunits of pertussis toxin by use of synthetic peptides. 60:4640-4647.

- 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.
- Cookson, B.T., Tyler, A.N., and Goldman, W.E. 1989. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochem.* 28:1744-1749.
- Coon, M.J., and Vaz, A.D.N. 1988. Role of cytochrome-P450 in hydrocarbon formation from xenobiotic and lipid hydroperoxyde. *Prog. Clin. Biol. Res.* 274:497-507.
- Coote, J.G. 1991. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2493-2503.
- Coote, J.G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.* 88:137-162.
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L., and Manclark, C.R. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 25:896-901.
- Crabtree, J.E., and Wilson, R.A. 1986. The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 8:265-285.
- Croitoru, K., and Bienenstock, J. 1994. Characteristics and functions of Mucosa-associated Lymphoid tissue. In: *Handbook of Mucosal immunology*. Eds Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R., and Bienenstock, J. pp141-149.
- Czerkinsky, C., and Holmgren, J. 1995. The mucosal immune system and prospects for anti-infectious and anti-inflammatory vaccines. *The Immunol.* 3:97-103.
- Delisse-Gathoye, A.M., Loch, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, Heron, I., Ruelle, J.L., De Wilde, M., and Cabezon, T. 1990. Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 58:2895-2905.
- Delventhal, S., Hensel, A., Petzoldt, K., and Pabst, R. 1992. Effects of microbial stimulation on the number size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in pig. *Int. J. Exp. Pathol.* 73:351-357.

- Demeure, C.E., Rihet, P., Abel, L., Ouattara, M., Bourgois, A., and Dessein, A.J. 1993. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 168:1000-1011.
- Devillier, P., et P. Saliou. 1991. Virus de l'hépatite B et vaccins. *Med. Chir. Dis.* 20:421-425.
- Dickinson, B.L., and Clements, J.D. 1995. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63:1617-1623.
- Di Tommaso, A., Domenighini, M., Bugnoli, M., Tagliabue, A., Rappuoli, R., and de Magistris, M.T. 1991. Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect. Immun.* 59:3313-3315.
- Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V., and Rappuoli, R. 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* 4:787-800.
- Dupré, L., Poulain-Godefroy, O., Ivanoff, N., Mekranfar, M., Schacht, A.M., Capron, A., and Riveau, G. Immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase. *Soumis.*
- Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J., Kariuki, H.C., Langley, J.G., Ouma, J.H., Capron, A., Pierce, R., and Sturrock, R.F. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22:1483-1488.
- 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.* 89:778-787.
- Editorial. 1992. Typhoid vaccination: Weighing the options. *Lancet.* 340:341.
- Edwards, K.M., Decker, M.D., Graham, B.S., Mezzatesta, J., Scott, J., and Hackell, J. 1993. Adult immunization with acellular pertussis vaccine. *JAMA.* 269:53-60.

- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F., and Isaacs, N.W. 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*. 381:90-92.
- Ewanowich, C.A., Sherburne, R.K., Man, S.F.P., and Pepler, M.S. 1989. *Bordetella parapertussis* invasion of HeLa 229 cells and human respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* 57:1240-1247.
- Fallon, P.G., and Doenhoff, M.J. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:83-88.
- Fallon, P.G., Sturrock, R.F., Niang, A.C., and Doenhoff, M.J. 1995. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:61-72.
- Fallon, P.G., Tao, L.F., Ismail, M.M., and Bennet, J.L. 1996. Schistosome resistance to praziquantel: fact or artifact ? *Parasitol. Today*. 12:316-322.
- Fenner, F. and Cairns, J. 1959. The viruses. In: Ed Burnet, F.M. and Stanley, W.N. Academic Press, New York, USA, pp 225-250.
- Fine, P.E.M., and Clarkson, J.A. 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 9:866-883.
- Fishelson, Z. 1995. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 90:289-301.
- Flament-Saillour, M., and Peronne, C. 1996. La coqueluche de l'adulte. *Lettr. Infect.* 7:169-171.
- Friedman, R.L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T., and Yocum, D.E. 1992. Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* 60:4578-4585.
- Garg, M., and Subbarao, B. 1992. Immune responses of systemic and mucosal lymphoid organs to prn-immune vaccine as a function of age and the efficacy of monophosphoryl lipid A as an adjuvant. *Infect. Immun.* 60:2327-23 .

- Germanier, R. and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *gaE* mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131:553-558.
- Geuijen, C.A.W., Willems, R.J.L., and Mooi, F.R. 1996. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. Infect. Immun. 64:2657-2665.
- 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 engineering of live recombinant vaccines. Biologicals. 23:113-118.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., and Danchin, A. 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. EMBO J. 7:3997-4004.
- Grezel, D., Capron, M., Grzysch, 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.
- Gross, M.K., Douglas, O.A., Smith, A., and Storm, D.R. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional CyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:4898-4902.
- 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. 129:2739-2744.
- Grzych, J.M., Capron, M., Dissous, C., and Capron, A. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. J. Immunol. 133:998-1004.
- Grzych, J.M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z.A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F., and Sher, A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. 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 mansonii. *J. Immunol.* 150:527-535.
- Guiso, N., Szatanik, M., and Rocancourt, M. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase against bacterial colonization. *Microb. Pathog.* 11:423-431.
- Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., and Gupta, C.K. 1993. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 11:293-306.
- Gupta, R.K., and Siber, G.R. 1995. Adjuvant for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine.* 13:1263-1276.
- Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E., and Storsaeter, J. 1996. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- Guzman, C.A., Brownlie, R.M., Kadurugamuwa, J., Walker, M.J., and Timmis, K.N. 1991. Antibody responses in the lungs of mice following oral immunization with *Salmonella typhimurium aroA* and invasive *Escherichia coli* strains expressing the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 59:4391-4397.
- Guzman, C.A., Molinari, G., Fountain, M.W., Rohde, M., Timmis, K.N., and Walker, M.J. 1993. Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral immunization with liposomes coated with filamentous hemagglutinin and pertussis toxoid. *Infect. Immun.* 61:573-579.
- Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunn, D., Simpson, A.J.G., and Wilkins, H.A. 1991. Human, IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* 349:243-245.
- Hanahan, I. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-566.
- Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Loch, C., and Brennan, M.J. 1994. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* 62:5010-5019.



- Hanson, L.A., Adlerberth, I., Carlsson, B., Zaman, S., Hahnzoric, M., and Jalil, F. 1990. Antibody-mediated immunity in the neonate. *Paediatr. Paedol.* 25:371-376.
- Harn, D.A. 1985. Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:345-354.
- Hausman, S.Z., Burns, D.L., Sickler, V.C., and Manclark, C.R. 1989. Immune response to dimeric subunits of the pertussis toxin B oligomer. *Infect. Immun.* 57:1760-1764.
- Hazenbos, W.L.W., van den Berg, B.M., Geuijen, C.A.W., Mooi, F.R., and van Furth, R. 1995. Binding of FimD on *B. pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinase. *J. Immunol.* 155:3972-3978.
- Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R., and Goldman, W.E. 1993. Interleukine-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect. Immun.* 61:3123-3128.
- Hoiset, S.K. and Stocker, B.A.D. 1981. Aromatic-dependant *Salmonella typhimurium* are non virulent and effective as live vaccines. *Nature.* 291:238-239.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N., and Svennerholm, A.M. 1992. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiol.* 184:157-179.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A., and McMenamin, P.G. 1990. Dendritic cells in the respiratory tract. *Int. Rev. Immunol.* 6:139-149.
- Hommel, M. 1995. Vaccin contre le paludisme: pourquoi, pour qui et comment?. *Med. Trop.* 55:47-51.
- Hughes, H.A. 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol. Today.* 4:340-347.
- Hughes, H.P.A. and Babiuk, L.A. 1994. Potentiation of vaccines through effective adjuvant formulations and manipulation of the immune response. In: *Modern Vaccinology*. Ed. E. Kurstak, Plenum Medical, N.Y. pp 87-118.
- Ibsen, P.H., Holm, A., Petersen, J.W., Olsen, C.E., and Heron, I. 1993. Identification of B-cell epitopes on the S4 subunit of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 61:2408-2418.

- Ishibashi, Y., Claus, S., and Relman, D.A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leucocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* 180:1225-1233.
- Ismail, M.M., Taha, S.A., Farghaly, A.M., and el Azony, A.S. 1994. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 24:685-693.
- Ivanoff, N., Phillips, N., Schacht, A.M., Heydari, C., Capron, A., and Riveau, G. 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm 28kDa glutathione S-transferase. *Vaccine*.14: 1123-1131.
- Johnson, F.D., and Burns, D.L. 1994. Detection and subcellular localization of three Ptl proteins involved in the secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 176:5350-5356.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H., and Viens, P. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* 303:810-811.
- Kaper, J.B., Lockman, H., Baldini, M.M., and Levine, M.M. 1984. Recombinant non toxigenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature.* 308:655-656.
- Katada, T., Tamura, M., and Ui, M. 1983. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 224:290-298.
- Kazanji, M., F. Laurent, and P. Péry. 1994. Immune response 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 Clarck, A.G. 1988. Soluble glutathione transferase isoenzyme. In: *Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H., and Ketterer, B. eds.), pp. 73-135. Academic Press, London.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J.M., Butterworth, A.E., Dunne, D., and Ouma, J. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164:1626-1640.

- Khalife, J., Dunne, D.W., Richardson, B.A., Mazza, G. Thorne, K.J.I., Capron, A., and Butterworth, A.E. 1989. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 142:4422-4427.
- 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. 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.* 91:11261-11265.
- Khelef, N., Sakamoto, H., and Guiso, N. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb. Pathog.* 12:227-235.
- Khelef, N., Zychlinsky, A., and Guiso, N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61:4064-4071.
- Khelef, N., Bachelet, C.M., Vargaftig, B.B., and Guiso, N. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect. Immun.* 62:2893-2900.
- Kim, J.K., Burnette, W.N., Sublett, R.D., Manclark, C.R., and Kenimer, J.G. 1989. Epitopes on the S1 subunit of pertussis toxin recognized by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 57:944-950.
- Kimura, M. 1991. Japanese clinical experiences with acellular pertussis vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 73:5-9.
- Klugman, K.P., Gilbertson, I.T., Koornhof, H.J., Robbins, J.B., Schneerson, R., Schultz, D., Cadoz, M., and Armand, J. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.* 2:1165-1169.
- Kotob, S.I., Hausman, S.Z., and Burns, D.L. 1995. Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 63:3227-3230.
- Kraehenbuhl, J.P., and Neutra, M.R. 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Reviews.* 72:853-879.

- Kramer, D.R., Sutherland, R.M., Bao, S., Husband, A.J. 1995. Cytokines mediated effects in mucosal immunity. *Immunol. Cell Biol.* 73:389-396.
- Kremer, L. 1995. Développement d'un BCG recombinant exprimant la glutathion S-transferase de *Schistosoma mansoni* dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. Thèse de doctorat Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lille I.
- Kremer, L., Riveau, G., Baulard, A., Capron, A., and Loch, C. 1996. Antibody responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *J. Immunol.* 156: 4309-4317
- Kurstak, E. 1993. World conference on poliomyelitis and measles. *Vaccine.* 11:93-95.
- Kurstak, E. 1994. Modern vaccinology: progress towards the global control of infectious diseases. In: *Modern Vaccinology*. Ed. E. Kurstak, Plenum Medical, N.Y. pp1-9.
- Lang, A.B., Ganss, M.T., and Cryz, Jr.S.J. 1989. Monoclonal antibodies that define neutralizing epitopes of pertussis toxin: conformational dependence and epitope mapping. *Infect. Immun.* 57:2660-2665.
- Larivière, M. 1993. Épidémiologie des bilharzioses humaines. *Rev. Prat.* 43:417-423.
- Lebman, D.A., and Coffman, R.L. 1994. Cytokines in the mucosal immune system. In: *Handbook of Mucosal immunology*. Eds Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R., and Bienenstock, J. pp243-250.
- Leclerc, C. 1995. Le bel avenir des vaccins. *La Recherche.* 276:548-555.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., and Brennan, M.J. 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promote adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:345-349.
- Leininger, E., Probst, P.L., Brennan, M.J., and Kenimer, J.G. 1993. Inhibition of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin-mediated cell adherence with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:31-38.
- Levine, M.M., Black, R.E., Ferreccio, C., Clements, M.L., Lanata, C., Rooney, J. and Germanier, R. 1985. The efficacy of attenuated *Salmonella typhi*, oral vaccine strain Ty21a

- evaluated in controlled field trials. In: Development of vaccines and drugs against diarrhea. Ed Holmgren, J., Lindberg, A. And Möllby, R. Student litteratur, Stockholm, pp 90-101.
- Levine, M.M., Herrington, D., Morris, J.G., Losonsky, J., Murphy, J., Tall, B. And Stocker, B. 1987. Safety, infectivity, immunogenicity and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541 Ty and 543 Ty, used as oral vaccine in man. J. Clin. Invest. 79:888-902.
- Lindberg, A.A., Karnell, A., Stocker, B.A.D., Katakura, S., Sweika, H. and Reinholt, F.P. 1988. Development of an auxotrophic oral live *Shigella flexneri* vaccine. Vaccine. 6:146-150.
- Liu, J.L., Fontaine, J., Capron, A., and Grzych, J.M. 1996. Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitology. 113:377-391.
- Lobet, Y., Feron, C., Dequesne, G., Simoen, E., Hauser, P., and Locht, C. 1993. Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. J. Exp. Med. 177:79-87.
- Locht, C., and Keith, J.M. 1986. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. Science. 232:1258-1264.
- Locht, C., Cieplak, W., Marchitto, K.S., Sato, H. and Keith, J.M. 1987. Activities of complete and truncated forms of pertussis toxin subunits S1 and S2 synthesized by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 55: 2546-2553.
- Locht, C., Lobet, Y., Feron, C., Cieplak, W., and Keith, J.M. 1990. The role of cysteine 41 in the enzymatic activities of the pertussis toxin S1-subunit as investigated by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 265:4552-4559.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D., and Renauld, G. 1993. The filamentous hemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella spp*. Mol. Microbiol. 9:653-660.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J.M., Lemoine, Y., and Lecocq, J.P. 1989. High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 5:497-507.

- Loosmore, S., Zealey, G., and Klein, M. 1994. The new generation of recombinant pertussis vaccines. In: *Modern Vaccinology*. Ed. E. Kurstak, Plenum Medical, N.Y. pp319-340.
- Lycke, N., Ericksen, L., and Holmgren, J. 1987. Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.* 25:413-419.
- Lycke, N., Tsuji, T., and Holmgren, J. 1992. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* 22:2277-2281.
- Lyons, C.R., Ball, E.J., Toews, G.B., Weissler, J.C., Stastny, P., and Lipscomb, M.F. 1986. Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T cell-macrophage binding. *J. Immunol.* 137:1173-1180.
- Mackett, M., and Williamson, J.D. 1995. *Human vaccines and vaccination*. Bios. Scientific Publishers.
- Makhov, A.M., Hannah, J.H., Brennan, M.J., Trus, B.L., Kocsis, E., Conway, J.F., Wintfield, P.T., Simon, M.N., and Steven, A.C. 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J. Mol. Biol.* 241:110-124.
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., and Dwarki, V. 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: Studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Therapy.* 4:419-431.
- Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S., and Lamm, M.E. 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today.* 9:430-435.
- McDermott, M.R., and Bienenstock, J. 1979. Evidence for a common mucosal immunologic system: I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J. Immunol.* 122:1892-1898.
- McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M., and Kiyono, H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. 10:75-88.

- 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: glutathion *S*-transferase from *Schistosoma japonicum* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246:21-27.
- McWilliam, A.S., Nelson, D., Thomas, J.A., and Holt, P.G. 1994. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* 179:1331-1336.
- 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.
- Menziozi, F.D., Gantiez, C., and Locht, C. 1991. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol. Lett.* 78:59-64.
- Menziozi, F.D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J.H., Leininger, E., Brennan, M.J., and Locht, C. 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 62:769-778.
- Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7:265-276.
- Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H., and Brawson, N.S.B. 1981. Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children. *Brit. Med. J.* 282:1595-1599.
- Mills, K.H.G., Barnard, A., Watkins, J., and Redhead, K. 1993. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: Role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect. Immun.* 61:399-410.
- Mitchell, G.F. 1989. Glutathione *S*-transferase-potential component of anti-schistosome vaccines? *Parasitol. Today.* 5:34-37.

- 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.
- Mooi, F.R., van der Heide, H.G.J., ter Avest, A.R., Wellinger, X.G., Livey, I., van der Zeijst, and Gastra, W. 1987. Characterization of the fimbriae subunits from *Bordetella* species. *Microbiol. Pathogen.* 2:473-484.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G., and Klinkert, M.Q. 1991. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266:8447-8453.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173.
- Moss, J., and Vaughan, M. 1988. ADP-ribosylation of guanine nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol.* 61:303-379.
- Mu, H.H., and Sewell, W.A. 1993. Enhancement of interleukin-4 production by pertussis toxin. *Infect. Immun.* 61:2834-2840.
- Muller, A.S., Leeuwenburg, J., and Pratt, D.S. 1986. Pertussis: epidemiology and control. *Bull. WHO.* 64:321-331.
- Munoz, J.J. 1985. Biological activities of pertussigen (pertussis toxin). Academic Press; Orlando, FL.
- Munoz, J.J. 1988. Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system. In: A.C. Wardlaw and R. Parton (ed.), *Pathogenesis and immunity in pertussis*. John Wiley & Sons Inc., New York. pp173-192.
- Nathan, C.F., and Hibbs, J.J. 1991. Role of the nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65-70.
- National Institut of Allergy and Infectious diseases. 1992. In: *The Jordan report. Accelerated development of vaccines*. National Institut of Health, Bethesda, Maryland.



- Ndhlovu, P., Cadman, H., Vennervald, B.J., Christensen, N.O., Chidimu, M., and Chandiwana, S.K. 1996. Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community in Zimbabwe. *Parasite Immunol.* 18:181-192.
- Nencioni, L., Pizza, M., Volpini, G., De Magistris, M.T., Giovannoni, F., and Rappuoli, R. 1991. Properties of the B oligomer of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 59:4732-4734.
- Neutra, M.R., and Kraehenbuhl, J.P. 1992. Transepithelial transport of antigens and pathogens by M cells for production of protective secretory IgA antibodies. *Vaccine Res.* 3:207-213.
- Nicosia, A., Perugini, M., Franzini, C., Casagli, M.C., Borri, M.G., Antoni, G., Almoni, M., neri, P., Ratti, G., and Rappuoli, R. 1986. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4631-4635.
- Oksenberg, J.R., Ko, C., Judd, A.K., Lim, M., Kent, A., Schoolnik, G.K., and Steinman, L. 1989. Multiple T and B cell epitopes in the S1 subunit ("A"-monomer) of the pertussis toxin molecule. *J. Immunol.* 143:4227-4231.
- O'Leary, K.A., and Tracy, J.W. 1991. *Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase catalyzed detoxification of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 72:355-361.
- Onorato, I.M., Wassilak, S.G., and Meade, B. 1992. Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA.* 267:2745-2749.
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Guerret, S., Copin, M.C., Delanoy, A., Capron, A., and Auriault, C. 1993. Role of rSm28GST-specific T cells in the reduction of the hepatic lesions in schistosomiasis. *J. Immunol.*
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Bossus, M., Gras-Masse, H., Guerret, S., Delanoy, A., Capron, A., and Auriault, C. 1994. Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Mol. Immunol.* 31:1247-1256.
- Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E., and Sher, A. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5678-5682.

- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzysch, J.M., Lewis, F.A., and Sher, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173:159-166.
- Petersen, J.W., Holm, A., Ibsen, P.H., Haslov, K., Capiou, C., and Heron, I. 1992a. Identification of human T-cell epitopes on the S4 subunit of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 60:3962-3970.
- Petersen, J.W., Ibsen, P.H., Haslov, K., and Heron, I. 1992b. Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by lymphocytes isolated from tracheo-broncheal lymph nodes and spleens of mice aerosol infected with *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 60:4563-4570.
- 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.
- Philip, R., Liggitt, D., Philip, M., Dazin, P., and Debs, R. 1993. In vivo gene delivery: Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J. Biol. Chem.* 268:16081-16090.
- Picot, H. 1993. La lutte contre les schistosomiasis. *Rev. Prat.* 43:462-465.
- Pierce, R.J., and A. Capron. 1994a. Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. In: *Modern Vaccinology*. Ed. E. Kurstak, Plenum Medical, N.Y. pp357-380.
- Pierce, R.J., Khalife, J., Williams, D.L., Kanno, R., Trottein, F., LePresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T., and A. Capron. 1994b. *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.
- Poulain-Godefroy, O., Gaubert, S., Lafitte, S., Capron, A., and Grzysch, J.M. 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: Stimulatory role of egg antigens. *Infect. Immun.* 64:763-768.
- Precious, W.Y., and Barret, J. 1989. The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem. Biophys. Acta.* 992:215-222.

- Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. 1993. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 61:2780-2785.
- Randrianarison-Jewtoukoff, V., and Perricaudet, M. 1995. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals.* 23:145-157.
- Redhead, K., Watkins, J., Barnard, A., and Mills, K.H.G. 1993. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 61:3190-3198.
- Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., and Falkow, S. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2637-2641.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K., and Wright, S.D. 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 61:1375-1382.
- Report European Commission COST/STD Initiative. 1996. New vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine:* 14:691-700.
- Reynolds, S.R., Shoemaker, C.B., and Harn, D. 1992. T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 149:3995-4001.
- Ricci, S., Rappuoli, R., and Scarlato, V. 1996. The pertussis toxin liberation genes of *Bordetella pertussis* are transcriptionally linked to pertussis toxin operon. *Infect. Immun.* 64:1458-1460.
- Richard-Lenoble, D., Kombila, M., Duong, T.H., and Gendrel, D. 1993. Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*, bilharziose récente et oubliée. *Rev. Prat.* 42:432-439.
- Rihet, P., Demeure, C., Bourgois, A., Prata, A., and Dessein, A.J. 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21:2679-2684.
- Riveau, G. and Audibert, F. 1990. Synthetic vaccines: current and future prospects. *Trends in Pharmacological Sciences.* 11:194-198.

- Riveau, G. J. and Capron, A. 1996. vaccination against schistosomiasis: concepts and strategies. In Concepts in Vaccine Design. S.H.E. Kaufmann ed. Walter de Gruyter and co. Berlin, New York. p509-532.
- Roberts, M., Maskell, D., Novotny, P., and Dougan, G. 1990. Construction and characterisation *in vivo* of *Bordetella pertussis aroA* mutants. Infect. Immun. 58:732-739.
- Roberts, M., Copley, I., Chatfield, S., and Dougan, G. 1993. Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. Vaccine. 11:866-872.
- Roberts, M., Bacon, A., Rappuoli, R., Pizza, M., Copley, I., Douce, G., Dougan, G., Marinaro, M., McGhee, J., and Chatfield, S. 1995. A mutant pertussis toxin that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. Infect. Immun. 63:2100-2108.
- Robinson, A.L., Ashworth, A.E., and Irons, L.I. 1989. Serospecific protection of mice against intranasal infection with *B. pertussis*. Vaccine. 7:321-324.
- 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. 138:149-154.
- Rogel, A., and Hanski, E. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. J. Biol. Chem. 267:22599-22605.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., and Ladan, D. 1992. *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase toxin: structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. J. Biol. Chem. 267:13598-13602.
- Sakurai, S., Kamachi, K., Konda, T., Miyajima, N., Kohase, M., and Yamamoto, S. 1996. Nitric oxide induction by pertussis toxin in mouse spleen cells via gamma interferon. Infect. Immun. 64:1309-1313.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual.
- Sansonetti, P.J. 1989. Attenuation de la virulence et construction de vaccins vivants. Med. Maladies Infect. 11:554-559.

- Sato, H., and Sato, Y. 1990. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* 58:3369-3374.
- Saukkonen, K., Cabellos, C., Burroughs, M., Prasad, S., and Tuomanen, E. 1991. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J. Exp. Med.* 173:1143-1149.
- Saukkonen, K., Burnette, W.N., Mar, V., Masure, H.R., and Tuomanen, E. 1992. Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:118-122.
- Sebo, P. And Ladant, D. 1993. Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin translocator. *Mol. Microbiol.* 9:999-1009.
- Sedegah, M., R. Hedstrom, P. Hobart, and S.L. Hoffman. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:9866-9870.
- Service, R.F. 1994. Triggering the first line of defense. *Science.* 265:1522-1524.
- Sewell, W.A., Munoz, J.J., and Vadas, M.A. 1983. Enhancement of the intensity, duration and passive transfer of delayed-type hypersensitivity by pertussigen in mice. *J. Exp. Med.* 157:2087-2096.
- Shahin, R.D., Witvliet, M.H., and Manclarck, C.R. 1990a. Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* 58:4063-4068.
- Shahin, R.D., Brennan, M.J., Li, Z.M., Meade, B.D., and Manclarck, C.R. 1990b. Characterization of the protection capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:3554-3558.
- Shahin, R.D., Amsbaugh, D.F., and Leef, M.F. 1992. Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect. Immun.* 60:1482-1488.
- Shapiro, E.D. 1993. Infections caused by *Haemophilus influenzae* type B. The beginning of the end? *JAMA.* 209:264-2 .

- Short, R.B. 1983. Sex and the single schistosomes. *J. Parasitol.* 69:4-22.
- Siebers, A., and Finlay, B. 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* 4:22-29.
- Simon, R., Prierer, U., and Pülher, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negativ bacteria. *Bio/Technology.* 784-791.
- Simpson, A.J.G., Sher, A., and McCutchan, T.F. 1982. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:125-137.
- Simpson, A., Dias Neto, E., Vidigal, T., Pena, H., Carvalho, O., and Pena, S. 1995. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90:211-232.
- Smith, D.J., Taubman, M.A., and Ebersole, J.L. 1985. Salivary IgA antibody to glucosyltransferase in man. *Clin. Exp. Immunol.* 61:416-424.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *S.mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology.* 55:697-702.
- Smythies, L.E., Coulson, P.S., and Wilson, R.A. 1992. Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.* 149:3654-3661.
- Smythies, L.E., Betts, C., Coulson, P.S., Dowling, M.A., and Wilson, R.A. 1996. Kinetics and mechanism of effector focus formation in the lungs of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 18:359-369.
- Soussi-Gouni, A., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J.P., and Capron, M. 1995. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.* 367:183-185.
- Southgate, V.R. 1978. On factors possibly restricting the distribution of *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934. *Z. Parasitenkunde.* 56:183-193.

- Stibitz, S., and Garletts, T.L. 1992. derivation of a physical map of the chromosome of *Bordetella pertussis* Tohama I. J. Bacteriol. 174:7770-7777.
- Stith, R., Flak, T., and Goldman, W.E. 1996. The link between tracheal cytotoxin production and peptidoglycan recycling in *Bordetella pertussis*. 96 th ASM General Meeting. Abstract B-169, p184.\*
- Stribling, R., Brunette, E., Liggit, D., Gaensler, K., and Debs, R. 1992. Aerosol gene delivery in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:11277-11281.
- Sun, J.B., Holmgren, J., and Czerkinsky, C. 1994. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:10795-10799.
- Sun, J.B., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J., and Czerkinsky, C. 1996. Treatment of experimental encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7196-7201.
- Svanborg-Edén, C., and Svennerholm, A.M. 1978. Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. Infect. Immun. 22:790-797.
- Szewczuk, M.R., Campbell, R.J., and Jung, L.K. 1981. Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes. J. Immun. 126:2200-22 .
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., and Ishii, S. 1982. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. Biochemistry. 21:5516-5522.
- Tamura, M., Nogimori, K., Yajima, M., Ase, K., and Ui, M. 1983. A role of the B-oligomere moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. J. Biol. Chem. 258:6756-6761.
- Taylor, J.B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D.J., Roitsch, C., Balloul, J.M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J.P., Capron, A., and Ketterer, B. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. EMBO J. 7:465-472.

- Tchuem Tchuente, L.A. 1995. Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology*. 110:45-52.
- Tchuem Tchuente, L.A., Southgate, V.R., Combes, C., and Jourdane, J. 1996. Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful ? *Parasitol. Today*. 12:231-236.
- Tendler, M., Vilar, M.M., Brito, C.A., Da Serra freire, N.M., Katz, N., and Simpson, A. 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 90:255-265.
- Théron, A., and Combes, C. 1988. Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma mansoni*. *Behav. Gen.* 18:201-209.
- Thomas, M.G., Ashworth, L.A.E., Miller, E., and Lambert, H.P. 1989. Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *B. pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J. Infect. Dis.* 160:838-845.
- Tolpin, M.D., Clements, M.L., Levine, M.M. et al. 1982. Evaluation of a phenotypic revertant of the A/Alaska/77-ts-1A2 reassortant virus in hamsters and in seronegative adult volunteers: Further evidence that the temperature-sensitive phenotype is responsible for attenuation of ts-1A2 reassortant viruses. *Infect. Immunol.* 36:645-650.
- Tomasi, T.B., Tan, E.M., Solomon, A., and Prendergast, R.A. 1965. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.* 121:101-124.
- 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 *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *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. 1992a. Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54:63-72.
- Trottein, F., Vaney, M.C., Bachet, B., Pierce, R.J., Colloc'h, N., Lecocq, J.P., Capron, A., and Moron, J.P. 1992b. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a



- protective cloned 28 kDa glutathion S-transferase from *Schistosoma mansoni*. J. Mol. Biochem. 224:515-518.
- Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G. Braun, D., Hansson, G., Larson, G., and Hill, R. 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies which inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. J. Exp. Med. 168:267-277.
- Ui, M. 1988. The multiple biological activities of pertussis toxin. In: Wardlaw AC, Parton R., eds. Pathogenesis and immunity in pertussis. Chichester, England: J. Wiley. pp121-145.
- Ui, M. 1990. Pertussis toxin as a valuable probe for G-protein involvement in signal transduction. In: Moss, J., vaughan, M., eds. ADP-ribosylating toxins and G proteins: Insights into signal transduction. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp45-77.
- Ulmer, J.B., Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnelly, J.J., and Liu, M.A. 1994. Generation of humoral and cellular immune responses by expression of a viral protein in muscle cells in vivo.
- Van strijp, J.A.G., Russel, D.G., Tuomanen, E., Brown, E.J., and Wright, S.D. 1993. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha M beta 2, Mac-1). Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. J. Immunol. 151:3324-3331.
- Van't Wout, J., Burnette, W.N., Mar, V.L., Rozdzinski, E., Wright, S.D., and Tuomanen, E. 1992. Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. Infect. Immun. 60:3303-3308.
- Verwaerde, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R., Damonville, M., Velge, F., Auriault, C., and Capron, A. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. 138:4441-4447.
- Weltzin, R. A., P. Lucia Jandris, P. Michetti, B. N. Fields, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra. 1989. Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. J. Cell. Biol. 108:1673-1685.

- Weinstock, J.V., and Boros, D.L. 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 127:1906-1913.
- Weiss, R. 1992. Measles battle loses potent weapon. *Science.* 258:546-548.
- Weiss, A.A., Johnson, F.D., and Burns, D.L. 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2970-2974.
- Wiest, P.M., Wu, G., Zhong, S., McGarvey, S.T., Tan, E., Yuan, J., Peters, P., Olveda, R.M., and Olds, G.R. 1993. Schistosomiasis japonica on Jishan Island, Jiangxi Province, People's Republic of China: persistence of hepatic fibrosis after reduction of the prevalence of infection with age. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:290-294.
- Wiest, P.M. 1996. The epidemiology of morbidity in schistosomiasis. *Parasitol. Today.* 12:215-220.
- Willems, R.J.L., Paul, A., van der Heide, H.G.J., ter Avest, A.R., and Mooi, F.R. 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J.* 9:2803-2809.
- Willems, R.J.L., Geuijen, C., van der Heide, H.G.J., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W.M.R., Locht, C., and Mooi, F.R. 1994. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol.* 11:337-347.
- Wilson, A.D., Clarke, C.J., and Stokes, C.R. 1990. Whole cholera toxin and B subunit act synergistically as an adjuvant for the mucosal immune response of mice to keyhole limpet haemocyanin. *Scand. J. Immunol.* 31:433-451.
- Witvliet, M.H., Burns, D.L., Brennan, M.J., Poolman, J.T., and Manclark, C.L. 1989. Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infect. Immun.* 57:3324-3330.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R., and Berkowitz, S.A. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:3841-3844.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465-1468.

- 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* P28-1 antigen. *J. Immunol.* 142:1342-1350.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R.J., Grezel, D., Reid, G.D.F., Tartar, A., and Capron, A. 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28GST antigen in rat, mouse and monkey. *J. Immunol.* 146:1987-1995.
- Wolowczuk, I., Kimani, G., Boulanger, D., Butterworth, A.E., Gras-Masse, H., Tartar, A., Ouma, J.H., Tarara, R., Reid, G.D.F., Koech, D., Auriault, C., and Capron, A. 1993. A study of the human and primate lymphocyte responses to synthetic peptides of the Sm28GST protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *J. Clin. Microbiol.*
- World Health Organization. 1990. Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines. *Vaccine* 8:425-437
- World Health Organization. 1992. Expanded Program for Immunization. Program report. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. 1993. Expanded Programme on Immunization. W.H.O. *Wkly Epidemiol. Rec.* 68:17-24.
- 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., Tartar, 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 carboxy-terminal domains. *J. Immunol.* 150:940-949.
- Zackrisson, G., Lagergard, B., Trollfors, B., and Krantz, I. 1990. Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 28:1502-1505.
- Zhang, Y.L., and Sekura, R.D. 1991. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 59:3754-3759.

<b>Abréviations</b> .....	<b>p11</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>p12</b>

## **Première partie: Introduction générale**

### **Chapitre I: La vaccination**

<b>I. De Jenner à nos jours</b> .....	<b>p14</b>
<b>II. La vaccination en 1996: Définition générale du problème</b> .....	<b>p17</b>
A. Manque de quelques vaccins essentiels .....	<b>p17</b>
B. Nécessité de vaccins réellement adaptés aux besoins spécifiques des pays en voie de développement .....	<b>p18</b>
<b>III. Exigences actuelles concernant le développement d'un nouveau vaccin</b> ..	<b>p19</b>
A. L'inocuité .....	<b>p20</b>
B. L'efficacité .....	<b>p20</b>
<b>IV. Les principales stratégies vaccinales</b> .....	<b>p21</b>
A. Les sous-unités vaccinales .....	<b>p21</b>
B. La vaccination génique .....	<b>p21</b>
C. Les vaccins cellulaires .....	<b>p22</b>
a. inactivés .....	<b>p22</b>
b. atténués .....	<b>p22</b>
D. Les vaccins recombinants vivants .....	<b>p24</b>
a. Les virus recombinants .....	<b>p25</b>
b. Les vecteurs bactériens .....	<b>p26</b>
<b>V. L'administration par voie muqueuse</b> .....	<b>p27</b>
A. Les avantages de l'immunisation muqueuse .....	<b>p27</b>
B. Le système immunitaire muqueux: Généralités .....	<b>p28</b>
a. Organisation du tissu lymphoïde associé aux muqueuses .....	<b>p29</b>
b. Présentation des antigènes au MALT .....	<b>p30</b>
c. Les réponses immunes induites au niveau du MALT .....	<b>p31</b>
1. Maturation des cellules B en plasmocytes producteurs d'IgA .....	<b>p31</b>
2. Rôle des IgA sécrétoires .....	<b>p32</b>
3. L'immunité à médiation cellulaire .....	<b>p32</b>
4. Tolérance immunologique .....	<b>p33</b>

## Chapitre II: *Bordetella pertussis*

I. La coqueluche .....	p34
II. Les facteurs de virulence de <i>Bordetella pertussis</i> .....	p35
A. La régulation de l'expression des facteurs de virulence .....	p35
a. La modulation phénotypique .....	p35
b. La variation de phase .....	p37
B. La toxine de pertussis (PTX) .....	p37
a. Génétique de la toxine de pertussis .....	p37
b. Structure protéique .....	p38
c. Fonction biologiques de PTX .....	p38
C. Autres facteurs de virulence de <i>B. pertussis</i> .....	p39
a. La toxine adénylate cyclase .....	p39
b. La toxine dermonécrotique .....	p40
c. La cytotoxine trachéale .....	p40
d. La pertactine (P69) .....	p41
e. Les fimbriae .....	p41
D. L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) .....	p41
a. Structure et biogénèse de la FHA .....	p42
b. Les activités d'adhésion de la FHA .....	p42
III. <i>B. pertussis</i> et réponse immune .....	p44
A. PTX et réponse immune .....	p44
B. Le rôle de la FHA dans l'immunité protectrice .....	p46
C. L'immunité à médiation cellulaire .....	p47
IV. La vaccination contre la coqueluche .....	p48

## Chapitre III: La schistosomiase ou bilharziose

I. Un problème de santé publique .....	p50
II. La répartition géographique .....	p51
III. Le parasite .....	p52
A. Généralités .....	p52
B. Le cycle évolutif des schistosomes .....	p53
IV. Les pathologies associées aux schistosomiasés .....	p54
V. Les traitements .....	p55
VI. Réponse immune développée au cours d'une infection à <i>S. mansoni</i> .....	p57
A. La réponse anticorps et les phénomènes d'ADCC: les mécanismes effecteurs chez l'homme et le rat .....	p57

B. L'immunité protectrice chez la souris .....	p58
C. Les mécanismes de contrôle de la réponse immune de l'hôte développés par le parasite..	p59
<b>VI. Approches vaccinales contre une infection à <i>S. mansoni</i></b> .....	<b>p60</b>
A. Les antigènes à potentiel vaccinal .....	p60
B. La Sm28GST .....	p62
a. Découverte et caractérisation de la Sm28GST .....	p62
b. La famille des GSTs .....	p62
1. Généralités .....	p62
2. Les GSTs chez les schistosomes .....	p63
c. Propriétés immunologiques de la Sm28GST .....	p64
1. L'effet protecteur de la Sm28GST .....	p64
2. Sm28GST et anticorps .....	p65
3. Sm28GST et réponse cellulaire T .....	p66

## **Deuxième partie:**

<b><i>Cadre et objectifs de recherche</i></b> .....	<b>p67</b>
---	------------

## **Troisième partie: Résultats**

<b>I. Contribution à l'étude de la biogénèse de la FHA</b> .....	<b>p73</b>
A. La sécrétion de la FHA .....	p73
B. Applications: utilisation de la FHA en vaccinologie.....	p100
<b>I. Construction de souches recombinantes de <i>B. pertussis</i> et analyse de la réponse immune induite après administration intranasale</b> .....	<b>p129</b>
A. Constructions plasmidiques, expression des protéines hybrides et stabilité plasmidique chez <i>B. pertussis</i> .....	p129
B. Constructions chromosomiques de souches recombinantes de <i>B. pertussis</i> exprimant la Sm28GST en fusion avec la FHA .....	p130
C. Etude de la protéine hybride FHA-Sm28GST produite par la souche BPGR60 ....	p139
D. Production de cytokines inflammatoires au niveau pulmonaire après administration intranasale de la souche recombinante BPGR60 .....	p140
E. Mémoire immune induite par l'administration intranasale d'une souche recombinante de <i>B. pertussis</i> : production d'anticorps sériques spécifiques de l'antigène hétérologue.....	p169

<b>III. Atténuation des souches de <i>B. pertussis</i></b> .....	<b>p200</b>
A. Protection contre une infection par <i>B. pertussis</i> de souris préalablement immunisées avec différentes souches déficientes dans la production d'un ou plusieurs facteurs de virulence .....	<b>p216</b>
B. Analyse histologique de l'inflammation au niveau des poumons induite par l'administration nasale d'une souche de <i>B. pertussis</i> déficiente dans la production de la toxine de pertussis .....	<b>p218</b>
C. Analyse de la réponse immune sérique anti-FHA après administration nasale des différentes souches bactériennes .....	<b>p220</b>
D. Étude du rôle de l'activité enzymatique de PTX sur la réponse sérique anti-FHA .....	<b>p224</b>
E. Protection induite par l'administration intranasale des souches recombinantes de <i>B. pertussis</i> lors d'une infection expérimentale par <i>S. mansoni</i> .....	<b>p225</b>
<b>IV. Cas particuliers d'utilisation des souches recombinantes de <i>B. pertussis</i></b> ...	<b>p229</b>
A. Immunisation de souris vaccinées contre la coqueluche .....	<b>p229</b>
B. Immunisation de souris infectées par <i>B. pertussis</i> sauvage .....	<b>p231</b>
C. Immunisation de souris infectées par le parasite <i>S. mansoni</i> .....	<b>p234</b>

### **Quatrième partie: Discussion-Perspectives.**

I. Expression d'un antigène hétérologue par <i>B. pertussis</i> .....	<b>p240</b>
II. Efficacité des souches recombinantes de <i>B. pertussis</i> .....	<b>p242</b>
III. Construction d'une souche recombinante atténuée de <i>B. pertussis</i> .....	<b>p244</b>
IV. Utilisation des souches recombinantes de <i>B. pertussis</i> dans des conditions particulières .....	<b>p247</b>

<b>Annexe technique</b> .....	<b>p251</b>
-------------------------------	-------------

<b>Références</b> .....	<b>p258</b>
-------------------------	-------------

