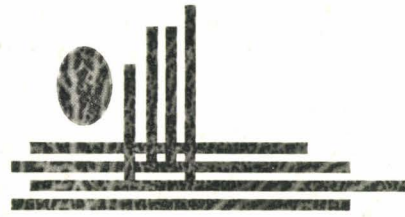


\*50346  
1997  
467



Institut Pasteur de Lille



Université des Sciences et  
Technologies de Lille (USTL)

**THESE**

Présentée par

**Bassam Abomoelak**

pour obtenir

Le grade de **DOCTEUR EN SCIENCE** de l'Université des  
Sciences et Technologies de Lille (USTL)

**Développement et immunogénicité de souches  
recombinantes de BCG produisant des antigènes  
bactériens chimériques**

Soutenue le 28 Mars 1997

Devant la Commission d'examen composée de

Mme	Brigitte Gicquel	Rapporteur
M	Michel Simonet	Rapporteur
M	André Dhainaut	Examineur
Mme	Kris Huygen	Examineur
M	Steven Ball	Examineur
M	Camille Loch	Directeur de thèse



D 030 176612 7

*Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements,*

*A mon directeur de recherche, le Dr Camille Locht, pour ses conseils scientifiques au cours de mon travail expérimental et aussi pendant la rédaction de ma thèse au sein de l'unité 447 (INSERM) à l'Institut Pasteur de Lille.*

*A toute l'équipe de l'unité 447, avec laquelle j'ai passé les moments les plus inoubliables de ma vie. C'est vrai, Il me paraît difficile de trouver une ambiance pareille ailleurs.*

*A tous les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail.*



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique  
ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
BCG: Bacille de Calmette et Guérin  
hCG $\beta$ : sous-unité  $\beta$  de l'hormone Chorionique Gonadotrope humaine  
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CTL: Lymphocyte T Cytotoxique  
DTH: Delayed Type Hypersensitivity  
EPI: Programme d'Immunsation Etendu  
GST: Glutathion S-transférase  
HSP: Protéine de choc thermique  
IMC: Immunité à médiation cellulaire  
iNOS: forme inductible de la NO-synthase  
IFN- $\gamma$ : Interféron gamma  
Ig: Immunoglobuline  
IL: Interleukine  
kb: kilobase  
kDa: kilodalton  
LAM: Lipoarabinomannane  
LAMP-1: Lysosomal Membrane Protein  
LPS: Lipopolysaccharide  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PPD: Purified Protein Derivative  
SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise  
Sm28GST: Glutathion S- transférase de 28 kDa de *Shistosoma. mansoni*  
TetC: fragment C de la toxine tétanique  
Th1: cellules T auxiliaires de type 1  
Th2: cellules T auxiliaires de type 2  
TNF- $\alpha$ : Facteur de Nécrose des Tumeurs  $\alpha$   
TNF- $\beta$ : lymphotoxine  
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

# Table des matières

## I. INTRODUCTION GENERALE

### I. La vaccination

1. <u>Histoire de la vaccination</u>	5
2. <u>Situation sanitaire dans le tiers monde</u>	6
3. <u>Les vaccins actuels</u>	9
3.1. Les vaccins inactivés	9
3.2. Les vaccins sous-unitaires	9
3.3. Les vaccins anti-idiotypiques	10
3.4. Les vaccins à ADN	10
3.5. Les vaccins vivants atténués	11
3.5.1. Les vaccins viraux atténués	11
3.5.2. Les vaccins bactériens atténués	11
3.5.2.1. <i>Salmonella typhi</i>	12
3.5.2.2. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	12
3.6. Les vaccins vivants recombinants	14
3.6.1. Les vecteurs recombinants viraux	14
3.6.1.1. Le virus recombinant de la vaccine	14
3.6.1.2. Les adénovirus recombinants	15
3.6.2. Les vecteurs bactériens recombinants	15
3.6.2.1. <i>Salmonella</i> recombinante	15
3.6.2.2. Autres bactéries recombinantes	16
3.6.2.3. Le BCG recombinant (BCGr)	17
3.7. Immunité mucoale	19

### II. Les mycobactéries

1. <u>Classification</u>	21
1.1. Les mycobactéries à croissance rapide	22
1.2. Les mycobactéries à croissance lente	22
2. <u>Structure des mycobactéries</u>	23
2.1. Paroi des mycobactéries	23
2.1.1. Le complexe peptidoglycane-mycoloyl-arabinogalactane	23
2.1.2. Les lipopolysaccharides	23
2.2. Architecture moléculaire de la paroi: organisation des différents lipides	24
2.3. Structure antigénique du complexe 'tuberculosis'	26
2.3.1. La tuberculine	26
2.3.2. Les protéines cytoplasmiques	26
2.3.2.1. Les enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés	26
2.3.2.2. Les protéines de stress	27
2.3.3. Les protéines sécrétées	27
2.3.3.1. Les protéines associées à la membrane ou à la paroi	28
2.3.3.2. Les protéines exportées	28
3. <u>Relations mycobactéries/macrophages</u>	30
3.1. Attachement des mycobactéries à la cellule cible	30
3.2. La fusion phagosome-lysosome	31
3.3. Survie intracellulaire des mycobactéries dans les macrophages	32
3.3.1. Les radicaux oxydés (ROI)	32

3.3.2. Les radicaux à l'azote (RNI)	32
<b>4. <u>La réponse immunitaire au cours de la tuberculose</u></b>	<b>33</b>
4.1. La réponse humorale au cours de la tuberculose	33
4.2. La réponse cellulaire au cours de la tuberculose	33
4.3. La vaccination contre la tuberculose	35
<b>5. <u>L'infection mycobactérienne</u></b>	<b>35</b>
<b>II. CADRE ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE</b>	<b>37</b>
<b>III. RESULTATS</b>	
- Article I. Humoral and cellular immune responses elicited in mice immunised with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein ( <i>Infection and Immunity</i> , soumis) .....	39
- Article II. Construction of a chimeric protein containing pertussis, tetanus and diphtheria protective epitopes and expression in <i>Mycobacterium bovis</i> BCG (Vaccine, soumis) .....	64
- Article III. Analysis of the secretion signals of the mycobacterial antigen 85 complex ( <i>Journal of Bacteriology</i> , soumis) .....	81
<b>IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>106</b>
<b>V. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>114</b>

# I. INTRODUCTION GENERALE

## I. La vaccination

---

### 1. Histoire de la vaccination

Les mesures préventives contre la transmission des maladies infectieuses se pratiquent depuis plusieurs siècles. Les moyens les plus simples, et pendant longtemps les seuls utilisés, étaient l'isolement des individus infectés dans des endroits clos ou l'élimination des foyers infectieux. En 1804, une épidémie de choléra a pu être jugulée à Londres grâce à la fermeture du réservoir qui fournissait de l'eau contaminée à la ville. Malheureusement, toutes les maladies infectieuses ne se combattent pas aussi facilement. Par exemple, entre 1780 et 1800, la tuberculose tua 36 000 personnes à Londres (Mackett et Williamson, 1995). Cette maladie fut responsable de la mort d'une personne sur dix parmi les adultes, et de neuf sur dix parmi les enfants de moins de cinq ans.

D'autres mesures de prévention sont donc nécessaires. Le 18<sup>ème</sup> siècle a vu la naissance de la vaccinologie suite à l'observation que les fermiers travaillant au contact des vaches étaient plus résistants à l'infection par la variole que d'autres personnes (Stern, 1927). Edward Jenner fut le premier à mener une étude scientifique sur ce phénomène. Après injection d'inoculats de vaccine à des individus sains, il observa que ces individus étaient devenus résistants à l'infection par la variole (Jenner, 1798; Fenner *et al.*, 1988).

A partir du 19<sup>ème</sup> siècle, la vaccination contre la variole a été adoptée en Europe et aux Etats-Unis. A la fin du siècle, la vaccinologie entre dans une ère nouvelle suite à la découverte des microbes et de leur pouvoir pathogène pour les êtres humains et les animaux.

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le travail de Louis Pasteur et collaborateurs a abouti au développement d'un vaccin efficace contre la rage par le passage du virus sauvage chez un lapin pour produire un virus atténué (Mackett et Williamson, 1995). Pasteur et son équipe ont aussi réussi à atténuer par la chaleur *Bacillus anthracis*, l'agent de la maladie du charbon ou anthrax. Ce vaccin atténué a été utilisé chez les moutons et les vaches afin de les protéger contre cette maladie (Pasteur *et al.*, 1881).

Un des vaccins bactériens le plus utilisé dans le monde fut développé à Lille par Albert Calmette et Camille Guérin pour lutter contre la tuberculose (Calmette *et al.*, 1924). Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) a été obtenu par passages successifs d'une souche virulente de *Mycobacterium bovis* agent de la tuberculose bovine, sur un milieu *in vitro* (213 passages sur une durée de 13 ans) (Calmette, 1927). C'est un des rares vaccins à base de bactéries vivantes qui soit administré à très grande échelle sans provoquer d'effets secondaires graves.

La découverte du pouvoir immunogène des toxoïdes (toxines bactériennes inactivées) a permis d'élaborer des vaccins efficaces contre le tétanos et la diphtérie (Roux et Yersin, 1888; Park, 1922; Ramon, 1928).

Néanmoins, plus de cent ans après les travaux de Pasteur, les maladies infectieuses continuent à causer la mort de plusieurs millions de personnes chaque année. L'absence de vaccins efficaces contre la plupart des maladies tropicales, les dysenteries, l'hépatite C, le SIDA, les maladies parasitaires et les maladies sexuellement transmissibles, ainsi que l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Harold, 1992) justifient pleinement les tentatives d'amélioration des vaccins existants et de développement de nouveaux vaccins (Leclerc, 1995).

## **2. Situation sanitaire dans le tiers monde**

Les trois quarts de la population vivent dans le tiers monde qui comptabilise aussi 96% de la mortalité infantile mondiale (Bloom, 1989). Chaque année, le monde voit naître quelques 145 millions d'enfants. Plusieurs millions d'entre eux n'ont qu'une brève existence marquée par la souffrance et la maladie, et tragiquement interrompue par une mort précoce (Robbins, 1990) (tableau 1).

En 1993, plus de 12,2 millions d'enfants de moins de 5 ans sont décédés, ce qui représente l'équivalent des populations de la Norvège et de la Suède combinées. Dans les pays en développement, plus de 4 millions d'enfants meurent chaque année suites d'infections respiratoires aiguës. Un quart est lié à la malnutrition et un autre quart à des complications pulmonaires, de la rougeole, de la coqueluche, du paludisme et du SIDA (OMS, 1995).

Les maladies diarrhéiques sont associées à la pauvreté et à l'ignorance ou au non-respect des règles d'hygiène. En 1993, les maladies diarrhéiques ont tué environ 3 millions d'enfants dans les pays en voie de développement. La prévention et la lutte contre ces maladies ne reposent pas uniquement sur les services de santé, mais dépendent aussi de l'éducation et du développement économique dans ces pays (OMS, 1995).

Le tétanos néonatal est généralement lié à la contamination du bébé par des spores du bacille du tétanos soit au cours de l'accouchement, lors de la section du cordon ombilical avec un instrument non aseptisé, soit après l'accouchement lorsque les blessures sont mal soignées. On a estimé le nombre de victimes à 560 000 en 1993. Le tétanos néonatal a pu être éliminé dans certains pays grâce à la vaccination anti-tétanique systématique des femmes enceintes et à l'utilisation d'instruments aseptisés lors de l'accouchement (OMS, 1995).

D'après les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la tuberculose a tué quelques 3 millions de personnes en 1993. En 1995, 8,8 millions de nouveaux cas ont été déclarés. Considérée comme une maladie du passé jusqu'à ces dernières années, la tuberculose fait donc à nouveau peser une lourde menace sur la santé publique, si bien qu'en 1993, l'OMS a signalé une situation d'urgence mondiale. Cette maladie frappe surtout les pauvres, mais elle progresse aussi dans les pays industrialisés (Bloom, 1992). Quant à la lèpre, on compte 600 000 nouveaux cas par an; la majorité des victimes se trouve en Inde et au Brésil.

En outre l'OMS estime qu'un quart de la population mondiale souffre de parasitoses intestinales chroniques qui ont des effets graves sur la nutrition et la croissance des enfants. Le paludisme, seul ou en association avec une infection respiratoire aiguë ou une anémie, tue plus d'un million d'enfants par an dans le monde en développement, principalement en Afrique.

Parmi les autres maladies parasitaires qui frappent les pays en développement, la maladie de Chagas touche environ 17 millions de personnes dans 21 pays d'Amérique Latine et provoque chaque année 45 000 décès et 400 000 cas de maladies du coeur ou de l'estomac. La maladie du sommeil (trypanosomiase africaine), transmise par la mouche tsé-tsé, est mortelle en absence de soins efficaces. On estime le nombre de victimes à 55 000 par an (OMS, 1995).



La schistosomiase (bilharziose) frappe 200 millions de personnes dans 74 pays en Amérique, Afrique et Asie, et tue 200 000 personnes par an (OMS, 1995).

La leishmaniose est localisée dans une zone géographique peuplée par environ 350 millions de personnes et 13 millions d'individus sont infectés. La forme la plus grave de la leishmaniose, la forme viscérale est presque toujours mortelle en absence de traitement efficace. En 1992, la leishmaniose a ainsi provoqué la mort de 80 000 personnes (OMS, 1995).

L'OMS a mis en place le Programme Elargi d'Immunsation (PEI) pour vacciner chaque année 60 millions d'enfants contre la diphtérie, la coqueluche, le tétanos, la poliomyélite, la rougeole et la tuberculose (Bloom, 1989). Les activités de l'OMS se sont intensifiées ces dernières années. L'OMS a pour objectif de vacciner au moins 90% des femmes et des enfants de moins d'un an contre les maladies cibles de l'enfance (diphtérie, coqueluche, tétanos, rougeole, poliomyélite et tuberculose), d'éradiquer la poliomyélite d'ici l'an 2000, de réduire l'incidence de la rougeole de 90% et la mortalité par rougeole de 95%, d'éliminer le tétanos néonatal, de réduire l'incidence de la diarrhée de 25% et la mortalité par diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans de 50%, de réduire d'un tiers la mortalité due aux infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de 5 ans, et de réduire le nombre d'enfants ayant un poids insuffisant à la naissance.

Selon les sources de l'OMS, les vaccins ont permis de préserver la vie de 1,5 millions d'enfants annuellement dans les pays en développement. Le vaccin contre la rougeole a sauvé 750 000 enfants, celui contre la coqueluche 320 000 et les vaccins contre la poliomyélite et le tétanos 200 000 enfants (Robbins, 1990).

Les maladies infectieuses restent cependant omniprésentes malgré les efforts remarquables réalisés dans le domaine de la lutte contre ces maladies. A présent, une prise de conscience internationale des problèmes du tiers monde s'impose afin de dégager une volonté collective pour résoudre les difficultés économiques et sanitaires des pays en développement (Bloom, 1994).

Tableau 2:

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

(d'après Leclerc, 1995)

### **3. Les vaccins actuels**

Dans la plupart des cas, un vaccin se compose d'une molécule, d'une bactérie ou d'un virus qui, introduit dans l'organisme, provoque une réponse du système immunitaire capable de neutraliser un micro-organisme donné. Les vaccins viraux, bactériens ou parasitaires actuellement disponibles ou en cours de développement sont de six types (tableau 2):

1. Les vaccins inactivés
2. Les vaccins sous-unitaires
3. Les vaccins anti-idiotypiques
4. Les vaccins aux acides nucléiques
5. Les vaccins vivants
6. Les vaccins vivants recombinants

#### **3.1. Les vaccins inactivés**

Les principes actifs des vaccins inactivés sont obtenus à partir de souches virales ou bactériennes choisies pour la qualité de leur équipement antigénique. Ces souches sont multipliées de telle sorte qu'elles conservent ces propriétés. Les virus ou les bactéries sont inactivés par des agents soit physiques (chaleur, rayonnement ultraviolet ou ionisant,...), soit chimiques (formaldéhyde, phénol, éthylèneamine,...), soit par l'action conjuguée de deux ou plusieurs agents (chaleur et formaldéhyde par exemple). Des adjuvants et des agents de stabilisation et de conservation sont généralement ajoutés dans ces vaccins.

Ce type de vaccin nécessite une administration répétée pour obtenir l'établissement d'une protection satisfaisante et durable. Parmi les vaccins inactivés, on peut citer le premier vaccin antioquelucheux à base de *Bordetella pertussis* inactivée par le formol (Fulginiti, 1984).

#### **3.2. Les vaccins sous-unitaires**

Ce type de vaccin représente une forme plus élaborée de vaccins inactivés. Ils sont constitués des seules fractions immunologiquement actives des virus, bactéries ou parasites. Ces fractions permettent d'obtenir un niveau de protection élevé tout en réduisant ou en éliminant les effets nocifs éventuels des vaccins inactivés composés de cellules entières. Les extraits doivent être associés à de puissants adjuvants pour produire des vaccins dont les qualités protectrices alliées à une parfaite innocuité constituent un progrès décisif dans le domaine des vaccins inactivés. Ils nécessitent plusieurs administrations pour générer chez les vaccinés une réponse immunitaire protectrice. Les vaccins contre l'hépatite B actuellement commercialisés, produits soit par des levures (Valenzuela *et al.*, 1982), soit par des cellules de mammifères (Michel *et al.*, 1984) représentent des exemples de vaccins sous-unitaires.

### 3.3 Les vaccins anti-idiotypiques

Ils reposent sur le principe que le site actif d'un anticorps, l'idiotype, est complémentaire d'un déterminant spécifique de l'antigène, l'épitope. Un deuxième anticorps anti-idiotypique, c'est à dire dirigé contre cet idiotype, peut mimer l'épitope et déclencher une réponse immunitaire spécifique. Ce type de vaccin peut être envisagé lorsque l'antigène est difficile à purifier ou bien quand seul l'un de ses épitopes peut générer une protection satisfaisante, alors que les autres épitopes induisent une maladie auto-immune (Mackett et Williamson, 1995).

### 3.4 Les vaccins à ADN

Les vaccins à base d'acides nucléiques sont de développement très récents suite à l'observation dans les années 70 que la transfection *in vitro* de cellules eucaryotes par de l'ADN viral purifié permet l'assemblage de virus dans les cellules (Schödel *et al.*, 1994). Plus tard, l'injection d'ADN viral dans des souris a permis d'obtenir la multiplication des virus *in vivo* (Israel *et al.*, 1979; Chan *et al.*, 1979). L'injection d'ADN purifié du virus de l'hépatite B à des chimpanzés a provoqué le développement de l'hépatite B chez ces primates (Will *et al.*, 1982).

Récemment, l'injection intramusculaire d'un vecteur d'expression exprimant le fragment C de la toxine tétanique sous contrôle d'un promoteur viral, a induit chez la souris des réponses humorale et cellulaire capables de protéger l'animal contre la toxine tétanique (Anderson *et al.*, 1996).

Dans un autre travail récent, la vaccination de souris avec des plasmides porteurs du gène 85A de *M. tuberculosis* produisant la protéine 85A sous une forme cytoplasmique ou sécrétée a induit des réponses humorale et cellulaire contre cette protéine. Les réponses générées ont été capables de protéger les animaux contre l'épreuve par *M. tuberculosis* (Huygen *et al.*, 1996).

En vaccinant des souris avec un plasmide codant pour une partie du récepteur TcR des lymphocytes T, elles ont pu être protégées contre une maladie auto-immune, l'EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*). La réponse générée contre les cellules T responsables de la maladie fut suffisante pour protéger ces animaux (Waisman *et al.*, 1996).

Les vaccins à ADN présentent de multiples avantages. Les antigènes synthétisés à partir d'ADN viral ou bactérien injecté peuvent se diriger vers le CMH de classe I ou de classe II, générant une réponse immunitaire de type Th1 ou Th2. Les antigènes peuvent être présentés au système immunitaire sous une forme native. Enfin, avec ce type de vaccin, seuls les antigènes clonés sont fabriqués, sans recours à un virus ou à une bactérie. Les inconvénients de ces

vaccins restent une efficacité variable et des dangers éventuels liés à la possibilité d'intégration de l'ADN injecté dans le chromosome (Smith, 1994; Robertson, 1994).

### 3.5 Les vaccins vivants atténués

Ces vaccins sont des virus, des bactéries ou des parasites dont le pouvoir pathogène a disparu suite à des mutations survenues soit spontanément, soit à l'occasion de passages répétés dans des animaux ou dans des conditions de culture infra-optimales, soit encore sous l'effet d'agents physiques ou chimiques, ou par des moyens génétiques (recombinaison, mutagenèse, délétion,...) (Cirillo *et al.*, 1995). Ces vaccins ne nécessitent pas d'adjuvant et ils sont généralement capables d'induire une réponse immunitaire rapide, intense et de longue durée.

#### 3.5.1 Les vaccins viraux atténués

D'abord les virus inactivés (tués) de la rougeole et des oreillons ont été utilisés comme vaccins contre ces maladies (Hilleman, 1970), mais à cause d'une protection insuffisante, ou d'effets secondaires graves, cette approche a été abandonnée en faveur des vaccins atténués par passages successifs sur des cultures cellulaires (Markowitz et Bernier, 1987; André et Peetermans, 1986; Glück *et al.*, 1986). La combinaison de trois vaccins atténués contre la rougeole, les oreillons et la rubéole a été adoptée aux USA et en Europe. Généralement, une dose est recommandée pour les enfants de 18 mois et une deuxième dose est proposée à l'âge de 12 ans. Il est conseillé d'administrer ce vaccin en combinaison avec les vaccins contre la poliomyélite, la diphtérie, le tétanos et la coqueluche à l'âge de 15 mois (Deforest *et al.*, 1988). L'efficacité de ce vaccin est de l'ordre de 90-95% (Bart *et al.*, 1986).

Le vaccin contre la poliomyélite, une paralysie infantile, à base de virus inactivé (IPV) a été adopté dans les années 1950 aux USA (Schonberger *et al.*, 1984). Ce vaccin s'est avéré efficace pour diminuer le nombre de cas cliniques dans certains pays, mais il a provoqué des accidents parfois graves (méningite,...) (Wilson, 1967). Dans les années 60, un autre vaccin atténué (OPV) a été développé par passage sur cultures cellulaires (Cryz, 1991) et il est aujourd'hui commercialisé aux USA et dans les pays européens. La vaccination par l'OPV a permis d'éliminer la poliomyélite des pays industrialisés. La protection générée est proche de 100%.

#### 3.5.2. Les vaccins bactériens atténués

Le vaccin contre l'agent de la typhoïde, *Salmonella typhi* et le BCG, le vaccin contre la tuberculose, sont deux exemples de vaccins bactériens atténués.

### 3.5.2.1 *Salmonella typhi*

La typhoïde reste un problème de santé important, surtout dans les pays en développement (Levine *et al.*, 1989). Le premier vaccin contre la typhoïde, composé de *S. typhi* inactivée par la chaleur ou l'acétone (Wright, 1896), provoquait des effets secondaires tels que fièvre et malaise générale (Ashcroft *et al.*, 1964). Dans les années 70, Germanier et Furer (1975) ont développé par mutagenèse chimique un mutant *galE* (UDP-galactose-4-épimérase) de *S. typhi* (Ty21a). Cette souche, appelée Ty21a, était immunogène et capable de survivre au passage dans l'estomac (Gilman *et al.*, 1977). Le mutant Ty21a induisait une réponse humorale dans le sérum et muco-sale dans les intestins (Cancelleri et Fara, 1985) ainsi qu'une réponse cellulaire nécessaire à la protection des sujets immunisés (Black *et al.*, 1983). L'administration orale de ce vaccin a permis d'éviter les voies invasives. Cependant, bien qu'il ait fait ses preuves en Egypte et au Chili pour protéger la population de la fièvre typhoïde, ce vaccin présente deux inconvénients majeurs, (i) la mutagenèse chimique provoque généralement de mutations ponctuelles et les gènes mutés ne sont pas toujours identifiés; par conséquent, le risque de réversion du vaccin vers la virulence ne peut pas être écarté, (ii) trois immunisations orales par Ty21a ont été nécessaires pour obtenir 70% de protection au Chili (Levine *et al.*, 1987) et 95% de protection en Egypte (Wahdan *et al.*, 1982).

Depuis lors, d'autres souches auxotrophes de *S. typhi* ont été développées par délétion chromosomique d'un ou plusieurs gène(s) essentiel(s) à la survie *in vivo* de la bactérie, comme par exemple les gènes de biosynthèse d'acides aminés (*aro*) (Hoiseth et Stocker, 1981 et 1985; Brown et Stocker, 1987). Ces mutants, appelés 541Ty et 543Ty, sont génétiquement stables *in vivo*, dénués de virulence et capables de générer chez un hôte une réponse cellulaire détectable, mais la réponse humorale est généralement faible (Mukkur *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1987; Edward et Stocker, 1988).

### 3.5.2.2. *Mycobacterium bovis* BCG

Le BCG est, jusqu'à présent, le seul vaccin disponible contre la tuberculose. C'est le vaccin le plus utilisé dans le monde, puisque d'après les statistiques de l'OMS, 100 millions d'enfants ont été vaccinés par le BCG en 1992 (OMS, 1992). Il fut développé à l'Institut Pasteur de Lille, dans les années 20 par passages successifs d'une souche virulente de *Mycobacterium bovis* sur un milieu à base de pomme de terre bilié (Calmette, 1927). Ce vaccin présente de nombreux avantages: administration unique dès la naissance, stabilité, facilité de la surveillance épidémiologique, faible coût et complète innocuité (Fine et Rodrigues, 1990).

Cependant, le pouvoir protecteur du BCG contre la tuberculose semble être très variable dans différentes parties du monde comme l'attestent plusieurs études indépendantes (Fine, 1981 et 1989; Smith, 1988). Une protection de 80% a été signalée en Haïti (Vandiviere *et al.*, 1973)

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

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

et au Canada (Ferguson et Simes, 1949), tandis que des taux de protection s'échelonnant de 0-14% aux USA (Comstock *et al.*, 1976) et de 37% en Afrique de Sud ont été observés (Coetzee et Berjak, 1968) (tableau 3).

Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer les variations de la protection conférée par le BCG. Premièrement, elles pourraient résulter de l'utilisation de souches de BCG différentes. Trois souches de BCG sont recommandées par l'OMS: Glaxo-1077, Tokyo-172, et Pasteur-1173P2 (OMS, 1966). Elles représentent 90% des vaccins actuellement utilisés. Ces souches vaccinales ont été cultivées partout dans le monde, dans des conditions de culture qui ont pu affecter leur morphologie, leur pouvoir de présenter les antigènes et leur viabilité (Osborn, 1983; Milstien et Gibson, 1989). A Hong-Kong, une étude a révélé une différence statistiquement significative entre la protection générée par les souches pasteurienne et japonaise (ten Dam, 1993).

La seconde hypothèse soulevée est celle du rôle de la différence génétique entre les populations vaccinées et, au sein d'une même population, de la sensibilité des individus à la vaccination par le BCG (Stead *et al.*, 1990; Stead, 1992; Fine, 1981). Récemment, des expériences ont mis en évidence sur le chromosome 1 de la souris un locus génétique impliqué dans le contrôle de la résistance contre l'infection par le BCG, *Leishmania* spp, et *Salmonella* spp (Schurr *et al.*, 1991). Ce locus présente une homologie avec un transporteur de nitrate chez les eucaryotes (Vidal *et al.*, 1993). L'ADNc du gène correspondant a été récemment cloné chez l'homme (Cellier *et al.*, 1994; Blackwell *et al.*, 1994). Ce gène pourrait être impliqué dans le transport, dans les endosomes et les phagolysosomes, de nitrate ou nitrite, substances nécessaires au contrôle de la répllication intracellulaire de bacilles virulents dans les macrophages activés par l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) et par le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ ). Son rôle dans la variabilité individuelle de résistance à la tuberculose humaine n'est pas encore établi.

La troisième hypothèse est la possibilité de différences dans les isolats virulents de *M. tuberculosis* à travers le monde. Une étude menée sur la virulence d'isolats de *M. tuberculosis* en Afrique du Sud a montré que les souches de *M. tuberculosis* y sont plus virulentes qu'en Europe (Mitchison, 1964). Ces résultats restent à confirmer.

Palmer et Long ont proposé une quatrième explication de la variabilité du pouvoir protecteur du BCG. Ils ont suggéré que l'infection par des mycobactéries atypiques de l'environnement peut générer une protection contre la tuberculose (Palmer et Long, 1966). Cette protection semble variable suivant la fréquence de l'infection et de la souche de mycobactérie impliquée dans l'infection (Kirschner *et al.*, 1992). Cette observation a été confirmée par une étude établie sur 1722 cobayes préalablement exposés à quatre souches de mycobactéries: *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. kansasii*, et *M. gauss*. Ces cobayes ont développé des degrés



différents de protection après épreuve par *M. tuberculosis*. Par ailleurs, cette étude a montré que l'effet protecteur du BCG n'était pas additif chez les animaux (Palmer et Long, 1966).

Une étude récente réalisée à l'Institut Pasteur de Paris a mis en évidence des différences marquées entre cinq souches vaccinales de BCG, Glaxo 1077, Japanese 172, Pasteur 1173P2, Prague et la souche Russe dans leur capacité à persister *in vivo* chez la souris ainsi que celle d'induire chez l'hôte une réponse cellulaire de type Th1, la production de cytokines, une réponse d'hypersensibilité de type retardé et une réponse cytotoxique (Lagranderie *et al.*, 1996).

Ces hypothèses sont peut-être collectivement impliquées dans l'efficacité variable de la vaccination par le BCG et il peut s'avérer difficile de déterminer avec précision la part de chaque facteur dans cette variabilité.

### 3.6. Les vaccins vivants recombinants

L'efficacité relative des vaccins composés de molécules purifiées a amené certains chercheurs à proposer des stratégies nouvelles, utilisant les vaccins vivants existants comme véhicules porteurs de molécules vaccinales hétérologues. Ces vaccins vivants viraux ou bactériens possèdent en effet la capacité d'induire de fortes réponses immunitaires humorale et/ou cellulaire. Ainsi, divers micro-organismes tel le virus de la vaccine et plus généralement tous les poxvirus, les adénovirus, le virus de l'herpès, le BCG, des souches non pathogènes de *Salmonella*, de *Shigella*, de *Listeria*, de *Vibrio cholerae* et de *Bordetella pertussis* ont été génétiquement modifiés afin de produire des antigènes étrangers (Cirillo *et al.*, 1995). Si leur facilité de production, leur faible coût de revient et leur efficacité rendent les vaccins recombinant très attractifs, ils posent dans certains cas des problèmes de sécurité.

#### 3.6.1 Les vecteurs recombinants viraux

##### 3.6.1.1 Le virus recombinant de la vaccine

Le virus de la vaccine a été génétiquement modifié par la délétion dans son génome de 18 phases ouvertes de lecture essentielles pour sa virulence *in vivo* (Tartaglia *et al.*, 1990). Ces mutants ont donné des souches virales atténuées, comme le NYVAC capable de se multiplier *in vivo* dans plusieurs espèces animales sans provoquer de complications (Pincus *et al.*, 1995). Par ailleurs, il existe aussi l'ALVAC, une souche de poxvirus d'oiseau (canarypox), totalement sans danger pour l'homme et capable d'induire une réponse immunitaire protectrice (Taylor *et al.*, 1988). Le gène codant pour une glycoprotéine du virus de la rage a été exprimé dans ces deux souches atténuées. Les souches recombinantes sont capables d'induire une excellente protection contre la rage chez les renards (Tartaglia *et al.*, 1992). D'autres essais utilisant des souches recombinantes de poxvirus qui expriment des

gènes de l'hépatite B codant des protéines de surface et, d'autre part, des gènes du virus Epstein-Barr ont produit des réponses immunitaires chez les animaux (Perkus *et al.*, 1985).

#### 3.6.1.2 Les adénovirus recombinants

Des adénovirus (Ad) atténués par délétion génomique de régions non-essentiels et capables de produire des antigènes hétérologues ont également été développés (Jones et Shenk, 1978; Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987; Chanda *et al.*, 1990; Mason *et al.*, 1990). Ils représentent une option intéressante en raison de leur sécurité parfaite chez l'homme (Horowitz, 1990), leur stabilité, la possibilité de pouvoir être administrés par multiples voies et leur facilité de stockage (Randrianarison-Jewtoukoff et Perricaudet, 1995). De plus, ces vecteurs d'expression sont capables de produire de grandes quantités d'antigènes présentant les modifications post-traductionnelles attendues telles que glycosylation et phosphorylation. Les essais d'immunisation avec les Ad exprimant l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) ont induit, chez l'animal de laboratoire, une réponse humorale et une protection contre l'hépatite B (Ballay *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1985). Chez la souris, l'immunisation par Ad exprimant une glycoprotéine du virus de l'herpès simplex (HSV1) a induit un bon titre d'anticorps neutralisants contre ce virus (McDermott *et al.*, 1989).

#### 3.6.2 Les vecteurs bactériens recombinants

*Salmonella* spp, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis* et le BCG figurent parmi les bactéries choisies comme vecteurs vivants pour présenter des antigènes hétérologues.

##### 3.6.2.1 *Salmonella* recombinante

Les souches atténuées de cette bactérie présentent de nombreux avantages pour exprimer des antigènes hétérologues: complète innocuité, stabilité génétique, pouvoir de générer des réponses immunitaires variables, humorale et/ou cellulaire (Black *et al.*, 1983; Sarosombath *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1989) et enfin administration aisée par voie orale. Une souche recombinante de salmonelle exprimant le fragment C de la toxine tétanique, un fragment non toxique, a été capable de générer un bon titre d'anticorps neutralisants contre la toxine tétanique chez les souris et de les protéger contre le tétanos (Chatfield *et al.*, 1992a et 1992b; Fairweather *et al.*, 1990). L'immunisation de la souris avec une souche recombinante exprimant l'antigène HBC du virus de l'hépatite B (HBV) a induit une réponse cellulaire. Une réponse humorale contre une fusion entre les antigènes HBc et S2 de HBV, a été obtenue chez des souris immunisées par une salmonelle recombinante exprimant cette chimère (Shödel et Will, 1990). Enfin, une souche recombinante de *S. typhimurium* atténuée exprimant l'antigène de surface de l'HBV a induit chez la souris la production d'IgA sécrétoire dans les intestins, la

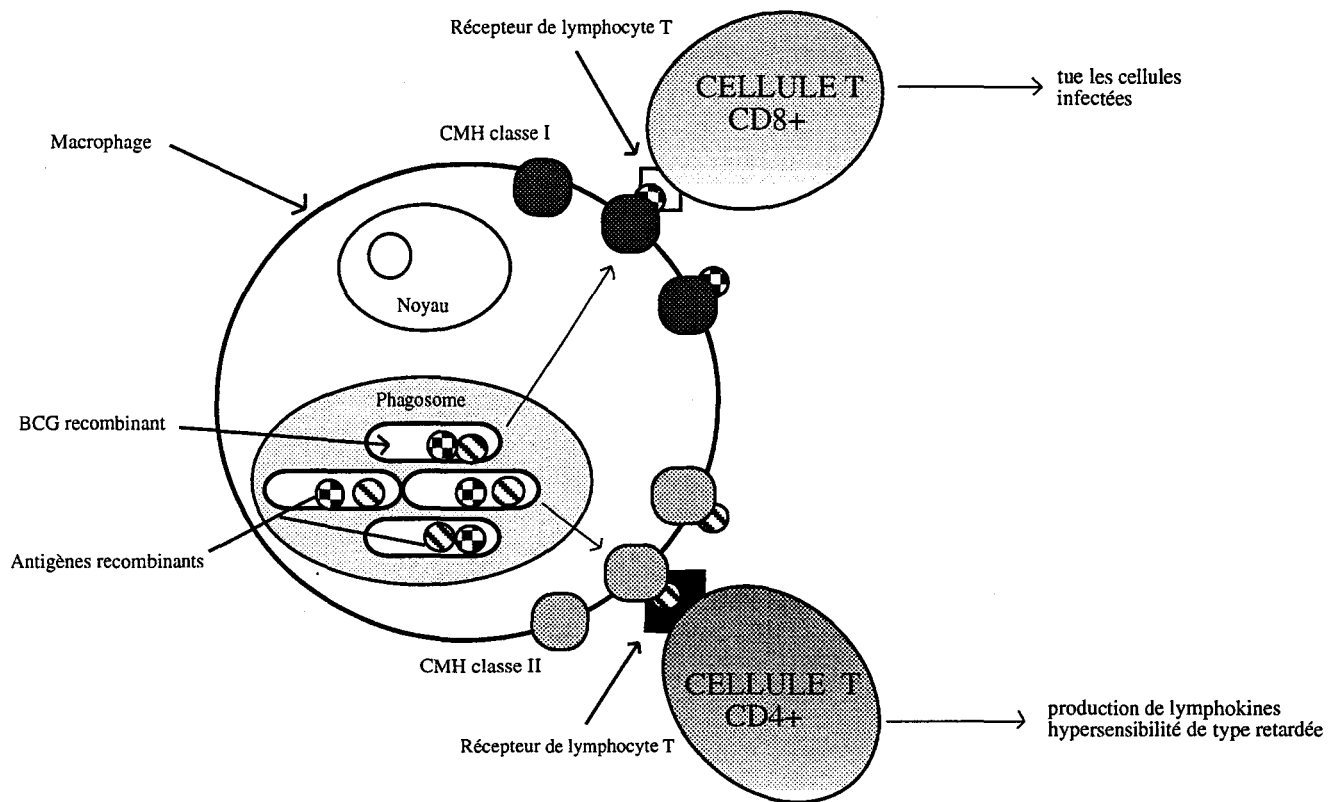
salive et le sérum quelles que soient les voies d'immunisation : orale, nasale, rectale ou vaginale (Hopkins *et al.*, 1995).

*S. typhimurium* portant une mutation (*aroA*) et exprimant le gène codant une protéine de circumsporozoite de *Plasmodium yoellii* a généré une réponse cellulaire cytotoxique (CTL) contre la protéine chez la souris (Flynn *et al.*, 1990). Des fusions protéiques entre le fragment C de la toxine tétanique et la glutathion S-transférase de *Schistosoma mansoni* entière (Sm28GST) ou des peptides immunogènes produites dans une souche *aro* de *S. typhimurium* ont généré une réponse humorale contre les deux domaines de la protéine hybride et une réponse humorale protectrice après épreuve par la toxine tétanique (Khan *et al.*, 1994a et 1994b). Une autre souche recombinante de *S. typhimurium*, exprimant une protéine chimérique composée d'une protéine de HSV fusionnée au fragment C de la toxine tétanique a induit une réponse humorale protectrice capable de neutraliser le HSV *in vitro* (Chabalgoity *et al.*, 1996). Récemment, une souche recombinante de *S. typhi*, capable de produire une protéine hybride comprenant la sous-unité S1 de la toxine pertussique et le fragment C de la toxine tétanique, sous le contrôle d'un promoteur inductible *in vivo* a été développée. Les essais d'immunisation chez la souris ont donné des résultats variables, selon la voie d'immunisation nasale ou orale et suivant le mode de présentation de l'antigène. La réponse humorale contre la partie pertussique de la protéine hybride était généralement faible même après 4 immunisations par voie nasale (Barry *et al.*, 1996).

#### 3.6.2.2 Autres bactéries recombinantes

Sory et Cornelis ont construit une souche de *Yersinia enterocolitica* recombinante synthétisant une protéine chimérique entre une protéine impliquée dans la virulence, YopH et la sous-unité B de la toxine cholérique. Cette souche recombinante, administrée oralement, a induit chez la souris une réponse humorale contre la sous-unité B de la toxine. Cette bactérie présente l'avantage de pouvoir coloniser les intestins et les tissus lymphoïdes, et d'être facilement administrée par voie orale. Dans un premier temps, les vecteurs d'expression posaient des problèmes d'instabilité *in vivo* dans les souches recombinantes, mais plus récemment l'information génétique a été stabilisée dans la souche recombinante par intégration chromosomique par recombinaison homologue (Sory *et al.*, 1990).

Une réponse immunitaire mucoale dans la salive et les poumons (IgA) ainsi qu'une réponse systémique (IgG) ont été obtenues chez la souris après immunisation, par voie orale ou nasale avec *Streptococcus gordonii* recombinant, une bactérie commensale à Gram positif, produisant un allergène (Ag5,2) (Medaglini *et al.*, 1995). L'utilisation de bactéries commensales représente un avantage considérable, car ces bactéries complètement inoffensives pour les êtres humains et les animaux permettent d'éviter d'éventuels risques associés à l'utilisation de pathogènes, même génétiquement atténués.



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

Une autre bactérie à Gram positif recombinante, *Listeria monocytogenes* produisant une nucléoprotéine du virus LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*), a généré une réponse cellulaire cytotoxique CD8<sup>+</sup> protégeant les souris immunisées (Hao Shen *et al.*, 1995). Cette bactérie est capable de s'échapper de la vacuole phagocytaire vers le cytoplasme où elle peut présenter les antigènes bactériens ou les antigènes hétérologues clonés, via le CMH-I, aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> qui peuvent générer une réponse cellulaire cytotoxique.

Récemment, une souche recombinante de *B. pertussis* a été développée dans notre laboratoire. Cette souche recombinante qui exprime la Sm28GST de *S. mansoni* en fusion avec l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de la bactérie a généré une réponse mucoale de type IgA et IgG contre l'antigène hétérologue chez la souris après une seule injection intranasale (Renauld-Mongénie *et al.*, 1996).

D'autres travaux sont actuellement en cours pour développer une souche atténuée de *Shigella flexneri*, capable de présenter des antigènes hétérologues afin d'induire une réponse immunitaire mucoale locale dans les sécrétions intestinales. Un problème à résoudre, est la nécessité de plusieurs rappels pour induire une réponse immunitaire protectrice et afin de générer une réponse immunitaire de type mémoire (Phalipon et Sansonetti, 1995). Récemment, une souche atténuée de *S. flexneri* 2a a été développée par délétions dans les gènes *aroA* et *virG*. Cette souche atténuée est stable génétiquement et génère une réponse immunitaire considérable chez les êtres humains (Kotloff *et al.*, 1996). La même souche atténuée était capable d'exprimer des antigènes hétérologues de souches pathogènes d'*E. coli* et elle a induit chez la souris et les cobayes une réponse humorale de type IgG et IgA dans les sérums et les larmes contre les antigènes clonés (Noriega *et al.*, 1996).

### 3.6.2.3. Le BCG recombinant (BCGr)

Resté longtemps réfractaire aux approches de la biologie moléculaire, le BCG représente pourtant un vecteur de choix pour présenter des antigènes hétérologues au système immunitaire afin de générer une réponse humorale et/ou cellulaire contre ceux-ci (Jacobs *et al.*, 1987; Snapper *et al.*, 1988) (figure 1). Les premiers vecteurs d'expression construits par B. Bloom et W. Jacobs (Stover *et al.*, 1991), le vecteur répliatif pMV261 et le vecteur intégratif pMV361, contenant tous deux le promoteur du gène *hsp60* (*heat shock protein*) ont été utilisés pour produire des antigènes d'intérêt vaccinal chez le BCG (Lee *et al.*, 1991). La première protéine exprimée chez le BCG fut la  $\beta$ -galactosidase et ce BCGr induisait après inoculation à l'animal de laboratoire une réponse humorale et cellulaire (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) contre la protéine exprimée (Stover *et al.*, 1991). La lipoprotéine OspA (*outer surface protein*) de *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme, synthétisée chez le BCG soit sous une

forme sécrétée à partir du promoteur *hsp60* et du peptide signal de l'antigène mycobactérien 85B ou fusionnée avec une lipoprotéine mycobactérienne de 19 kDa, soit sous une forme cytoplasmique à partir du promoteur *hsp60*, a permis d'obtenir une réponse humorale chez trois lignées différentes de souris (Stover *et al.*, 1993, Langermann *et al.*, 1994). Un certain niveau de protection a été observé après immunisation des souris avec une souche de BCG exprimant une glycoprotéine de surface (gp63) de *Leishmania major* (Connell *et al.*, 1993). Des BCGr produisant les antigènes Pol, Gag ou Env du virus de SIDA sous le contrôle du promoteur du gène *hsp70* ont induit une réponse humorale et cellulaire (auxiliaire et cytotoxique) chez les souris Balb/c (Aldovini et Young, 1991). La production d'anticorps neutralisants a aussi été obtenue chez des souris immunisées par une souche recombinante de BCG exprimant la Sm28GST de *S. mansoni* (Kremer *et al.*, 1996).

D'autres systèmes d'expression hétérologue ont été mis au point chez le BCG (Murray *et al.*, 1992; Giquel, 1995). Le promoteur P<sub>AN</sub> de la séquence d'insertion IS900 a été isolé chez *Mycobacterium paratuberculosis* et utilisé pour exprimer le gène *nef* du virus SIV<sub>mac</sub> chez le BCG. La souche recombinante a induit des réponses cellulaires proliférative et cytotoxique chez les souris (Winter *et al.*, 1991 et 1995). Un système intégratif d'expression a été développé par l'équipe de McFadden. Le système utilise les signaux d'expression d'une protéine 19 kDa de *Mycobacterium leprae* ce qui a permis d'exprimer deux gènes viraux, *gag* de SIV et *VP1* de FMDV (*Foot and Mouth Disease Virus*) (Dellagostin *et al.*, 1993). Le promoteur et le peptide signal de la protéine de 19 kDa de *M. tuberculosis*, utilisés pour sécréter OspA de *B. burgdorferi* chez le BCG a permis d'augmenter de 100 à 1000 fois la réponse humorale générée contre OspA par rapport à la réponse humorale engendrée par la forme cytoplasmique de la protéine (Stover *et al.*, 1993). Ce système d'expression a aussi permis d'obtenir une réponse humorale protectrice chez les souris immunisées par un BCGr exprimant la protéine de surface PspA de *Streptococcus pneumoniae*, pathogène de la pneumonie bactérienne (Langermann *et al.*, 1994). Le même système a en outre permis de développer un BCG capable de synthétiser la nucléoprotéine N du virus de la rougeole et les essais immunologiques chez la souris ont induit une réponse humorale et une réponse cellulaire. Cette réponse humorale (anticorps neutralisants) a induit un niveau de protection considérable lors d'une épreuve intracérébrale virale chez la souris (Fennelly *et al.*, 1995).

Un autre système d'expression utilisé pour présenter les antigènes hétérologues sous une forme sécrétée fait appel aux signaux d'expression du gène 85B (antigène alpha) de *Mycobacterium kansasii*. Ces signaux ont permis de construire des BCGr sécrétant des antigènes du virus HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Kameoka *et al.*, 1994) et SIV (Yasutomi *et al.*, 1993). Ces souches de BCG ont induit des réponses cellulaires cytotoxiques chez le singe. Une autre expérience, réalisée avec les mêmes signaux d'expression pour produire le peptide V3 du HIV chez le BCG a induit une réponse cellulaire cytotoxique et une

réponse humorale capable de bloquer la réplication virale chez la souris SCID (*Severe Combined Immune Deficient*) reconstituées avec des cellules humaines du foie et du thymus (Honda *et al.*, 1995). Une réponse humorale faible mais durable a été obtenue chez la souris, après immunisation par un BCGr exprimant un épitope B de *Plasmodium yoelii* (Matsumoto *et al.*, 1996).

Des souches recombinantes de BCG capables d'exprimer et de sécréter des cytokines humaines et murines ont été construites afin d'augmenter le pouvoir immunostimulateur du BCG. Les essais d'immunisation chez la souris ont induit une hausse de production d'IFN- $\gamma$ , une cytokine importante dans l'activation des macrophages infectés par les mycobactérie, dans les rates des souris immunisées avec ces souches recombinantes de BCG (O'Donnell *et al.*, 1994 ; Kong et Kunimoto, 1995; Murray *et al.*, 1996).

Dans notre laboratoire, les signaux d'expression du gène 85A de *M. tuberculosis* ont tout d'abord été utilisés pour produire des antigènes hétérologues sous une forme sécrétée. Deux antigènes de parasites ont été synthétisés chez le BCG, la Sm28GST de *S. mansoni* et Gra1 (antigène des granules denses) de *Toxoplasma gondii*. Dans les deux cas, les antigènes étaient sécrétés dans le surnageant de culture. Le BCG exprimant la Sm28GST a induit une réponse cellulaire faible, mais spécifique, chez plusieurs lignées de souris, mais aucune réponse humorale n'a été observée malgré les multiples voies d'immunisation essayées (Kremer *et al.*, 1995). Dans le deuxième cas, le BCG exprimant Gra1 n'a pas généré de réponse humorale après immunisation de souris OF1, mais cette souche recombinante a été capable de déclencher une réponse cellulaire proliférative de type Th1 chez le mouton. Dans une épreuve contre le parasite, la courbe thermique des moutons immunisés correspond à celui de moutons protégés (Supply *et al.*, soumis). Un autre travail réalisé aussi dans notre laboratoire fut le développement d'une souche recombinante de BCG capable de sécréter, sous le contrôle des signaux d'expression de 85A, la hCG $\beta$ , une des sous-unités de l'hormone chorionique gonadotrope sécrétée par les cellules cancéreuses de la vessie et récemment identifiée comme marqueur de la transformation maligne des cellules vésicales. Le taux d'expression et la sécrétion était relativement élevés par rapport à ceux des deux antigènes précédents (Baulard *et al.*, 1996).

### 3.7. L'immunité mucoale

Cet aspect d'immunisation a commencé de prendre une grande ampleur surtout au cours des dernières années. Le système immunitaire muqueux est particulièrement complexe. Il permet la mise en place d'une immunité locale pour constituer une «barrière» efficace contre l'entrée des micro-organismes pathogènes dans l'organisme. La réponse générée comporte les deux axes de l'immunité, la réponse humorale est de type IgA solubles et la réponse immunitaire

à médiation cellulaire se développe aussi par les lymphocytes T. De nombreuses stratégies vaccinales, visant à protéger les muqueuses, ont pour but de stimuler elles aussi la sécrétion d'IgA spécifiques. Les avantages de ce type de vaccination sont multiples: une meilleure efficacité d'induire une immunité mucoale et systémique par rapport les autres voies de vaccination comme dans le cas d'immunisation intranasale par le virus atténué de la grippe qui induit une protection plus significative que l'immunisation par voie invasive (Treanor *et al.*, 1992), une innocuité et quasi absence d'effets secondaires, stabilité de la réponse immunitaire générée avec l'âge et finalement la facilité d'administration (Walker, 1994).

L'immunisation mucoale pourrait aussi jouer un rôle essentiel dans la lutte contre les maladies causées par des pathogènes respiratoires qui résident dans les voies aériennes. Un exemple de ces pathogène est *B. pertussis* l'agent de la coqueluche chez les enfants. Cette bactérie colonise seulement les voies respiratoires de l'homme. Une immunisation mucoale par le vaccin cellulaire anti-coqueluche après une immunisation systémique par le vaccin sous-unitaire induite au niveau de ces voies pourrait éliminer la colonisation bactérienne (Walker, 1994).

A cet égard, une approche particulièrement intéressante. Il concerne l'utilisation des souches virales ou bactériennes vivantes capables de produire des antigènes hétérologues. Ces organismes atténués sont théoriquement capables de coloniser les tissus des muqueuses et par conséquent, ont la capacité d'induire une réponse immunitaire spécifique contre le vecteur vivant et au même temps contre l'antigène. Jusqu'à présent, deux organismes sont autorisés d'être administré par voie orale, le virus atténué de la poliomyélite (polio) et *Salmonella typhi* Ty21a.

Le BCG se donnait depuis sa découverte par voie orale, mais cette voie a été abandonnée à la faveur de la voie intradermique pour deux raisons (i) la voie orale nécessite une grande dose de BCG à cause de milieu acide de l'estomac, (ii) cette voie est généralement accompagnée d'effets secondaires chez les enfants. Des études récentes ont montré que l'immunisation des souris par la souche recombinante de BCG exprimant OspA par voie intranasale induit une réponse immunitaire plus forte contre le BCG et contre l'antigène par rapport les autres voies. En plus, cette voie est associée à une réduction dans le nombre des lésions dans les poumons en comparaison avec une administration intraveineuse. La dose de BCG administré pourrait être un facteur déterminant dans l'équilibre Th1/Th2 (Bretcher, 1992).



## II. Les mycobactéries

---

### 1. Classification

L'identification des mycobactéries commença vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle après la découverte des bacilles tuberculeux (*Bacterium tuberculosis*) par Zopf et de la lèpre (*Bacterium leprae*) par Hansen. En 1896 la classification des mycobactéries débuta avec la proposition de Lehmann et Neumann d'utiliser le genre *Mycobacterium* pour ces espèces, rebaptisées *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, et placées dans la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycétales*, classe des *Actinomycètes* (Shinnick et Good, 1994).

Les caractères qui définissent les mycobactéries sont la résistance à la décoloration par l'alcool acidifié, la présence d'acides mycoliques dans la paroi, et la présence d'un taux élevé (61-71%) de guanine et cytosine dans le génome mycobactérien (Levy et Portaels, 1992). A l'heure actuelle, 71 espèces mycobactériennes ont été décrites et classées en deux principaux groupes suivant le temps nécessaire à la formation de colonies visibles sur un milieu de culture solide. Le premier groupe comprend les espèces à croissance rapide et le second celles à croissance lente. Il existe aussi des espèces non cultivables *in vitro*, comme *M. leprae*, l'agent responsable de la lèpre.

Récemment, l'analyse de la séquence des ARN ribosomiaux (ARNr) a permis de préciser la classification des mycobactéries et de construire un arbre phylogénétique des mycobactéries (Pitulle *et al.*, 1992; Rogall *et al.*, 1990). Le terme "complexe" dans la mycobactériologie regroupe plusieurs espèces dont la différenciation est sans grande importance médicale. Par exemple la tuberculose pulmonaire causée par *M. africanum* est soignée comme celle causée par *M. tuberculosis*.

### 1.1. Les mycobactéries à croissance rapide

Ces mycobactéries forment des colonies sur un milieu de culture solide en moins d'une semaine. Ces espèces ne sont généralement pas pathogènes pour l'homme ou l'animal. La majorité des infections humaines générées est attribuée aux infections par des membres du complexe *M. fortuitum* (Wayne et Sramek, 1992). Des études épidémiologiques ont mis en évidence de rares cas d'infections chez l'homme par *M. flavescens*, *M. neoaurum*, *M. smegmatis* et *M. thermoresistibile* (Wayne et Sramek, 1992) et chez les animaux par *M. porcinum* et *M. senegalense*. La majorité des espèces non-pathogènes pour l'homme et les animaux sont isolées essentiellement du sol (Shinnick et Good, 1994).

### 1.2. Les mycobactéries à croissance lente

Ces mycobactéries forment des colonies visibles en deux à trois semaines. Les espèces mycobactériennes les plus pathogènes appartiennent à ce groupe: le complexe de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* et *M. microti*), responsable de la tuberculose pulmonaire chez l'homme et chez les animaux (Good, 1992) et le complexe de *M. avium* (MAC), composé de *M. avium* et *M. intracellulare*, responsables d'infections pulmonaires et non pulmonaires, surtout chez les sujets immunodéprimés (Havlir, 1994).

D'autres espèces ont été impliquées dans des infections pulmonaires chez les sujets immunocompétents ou chez les malades immunodéficients (SIDA), comme par exemple *M. malmoense*, *M. xenopi* (Hoffner, 1994), *M. celatum* (Butler *et al.*, 1993), *M. shimoidei*, (Wayne et Sramek, 1992), *M. simiae* (Hoffner, 1994) et *M. genavense* (Böttger, 1994). *M. haemophilum*, *M. ulcerans* et *M. marinum* sont responsables la plupart du temps d'infections cutanées chez l'homme (Kiehn et Smith, 1994; Wolinsky, 1979; Wayne et Sramek, 1992). *M. kansasii*, cause une maladie pulmonaire chronique semblable à la tuberculose humaine (Hoffner, 1994), *M. asiaticum*, associé à une infection respiratoire chez l'homme (Hoffner, 1994). Il existe aussi des espèces non-pathogènes parmi les mycobactéries à croissance lente, comme le complexe *M. terrae* (*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, et *M. triviale*) et aussi *M. gastri* (Wayne et Sramek, 1992).

## **2. Structure des mycobactéries**

### **2.1. Paroi des mycobactéries**

La paroi mycobactérienne est composée d'environ 60% de glycolipides, lipopolysaccharides et polysaccharides. Dans un grand nombre de cas, les structures de ces molécules sont spécifiques du genre *Mycobacterium*, voire de l'espèce mycobactérienne.

#### **2.1.1. Le complexe peptidoglycane-mycoloyl-arabinogalactane**

Le peptidoglycane, de structure analogue à celui des autres bactéries, confère sa rigidité à la paroi mycobactérienne. Il est composé d'une chaîne glycanique formée d'unités alternées de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine et d'acide N-glycolyl- $\beta$ -D-muramique. Sur les groupes carboxyles des résidus de l'acide muramique sont greffés les tétrapeptides L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-Dap-D-Ala. Les résidus Dap-D-Ala et Dap-Dap (Dap signifie acide diaminopimélique) établissent des liaisons peptidiques interchaînes donnant naissance à la structure du peptidoglycane.

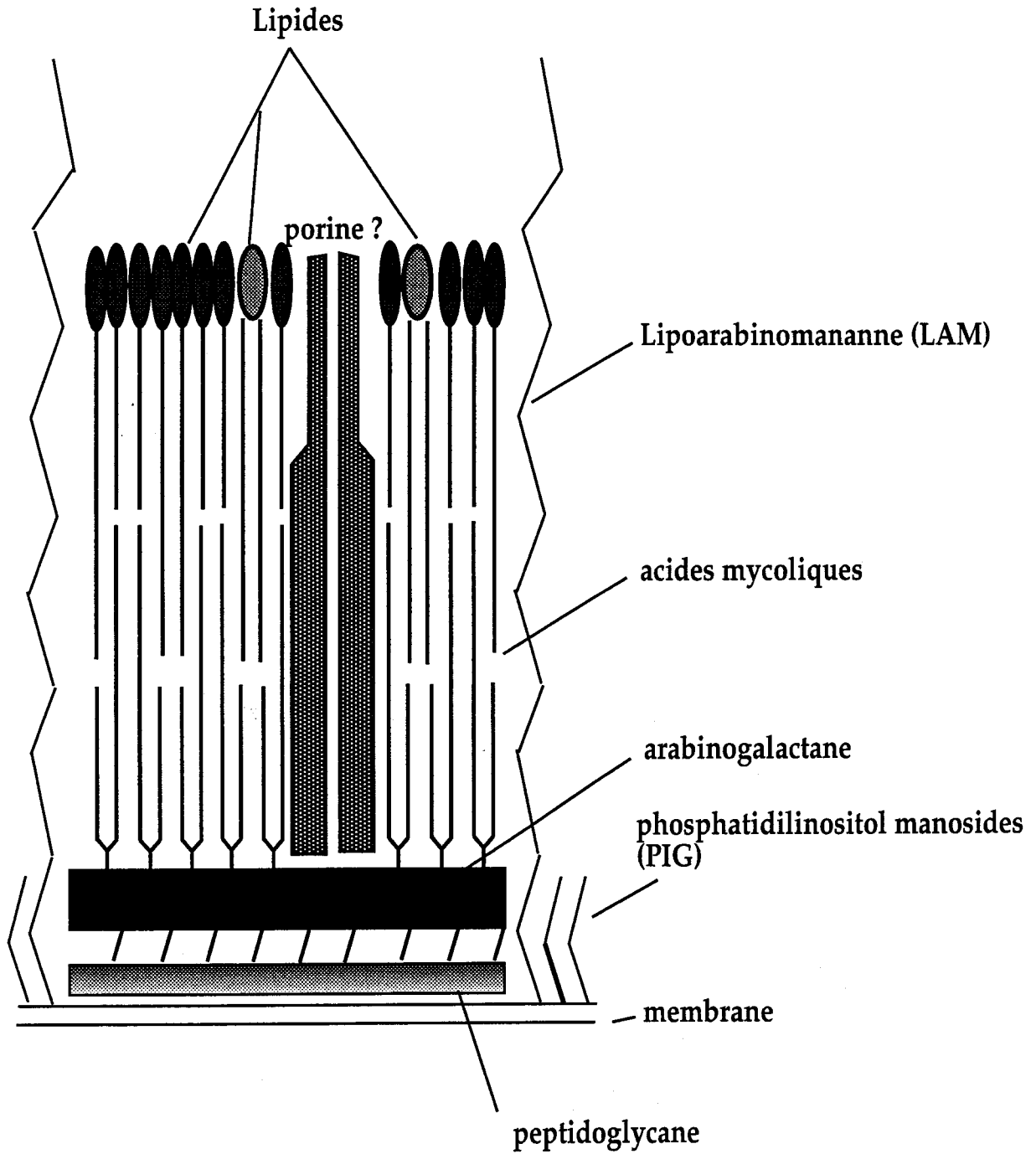
L'arabinogalactane est le constituant majeur de la paroi mycobactérienne, représentant environ 35% de son poids sec. Dans les années 1960, les travaux de Misaki *et al.* et ceux d'Azuma *et al.* ont montré que ce polymère est composé exclusivement d'unités D-arabinose et D-galactose (Misaki et Yukawa, 1966; Azuma *et al.*, 1968). Dans la structure détaillée proposée par Daffé *et al.*, les unités Ara et Gal se retrouvent exclusivement sous la forme furanose et définissent deux domaines, galactane et arabinane (Daffé *et al.*, 1990).

Il est connu depuis de nombreuses années, que les acides mycoliques estérifient les unités Araf (arabinofuranose), mais leur localisation précise sur l'arabinogalactane n'a été établie que récemment (McNeil *et al.*, 1991). Les acides mycoliques sont des acides gras  $\alpha$ -ramifiés  $\beta$ -hydroxylés spécifiques du genre *Mycobacterium*.

#### **2.1.2. Les lipopolysaccharides**

Le lipoarabinomannane (LAM) et le lipomannane (LM) sont les lipopolysaccharides majeurs de la paroi. Les travaux de Azuma *et al.* et de Misaki *et al.* ont établi que les arabinomannanes (LAMs) obtenus après extraction alcaline ont une structure commune, quelle que soit l'espèce mycobactérienne dont ils sont extraits (*M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv,...) (Azuma *et al.*, 1970; Misaki *et al.*, 1977). Ils sont composés d'un squelette d'unités liées (1-6)-D-Manp (mannopyranose) auxquelles s'attachent de courtes chaînes latérales de résidus liés (1 à 2)-D-Manp. Ils comprennent également des résidus liés (1-5)-D-Araf principalement présents dans les chaînes latérales. Ces chaînes latérales arabinanes constituent les déterminants antigéniques des LAM.

Figure 2. Modèle structural de la paroi mycobactérienne.



Plus récemment, des différences structurales entre le LAM d'une souche virulente de *M. tuberculosis* (Erdman) et celui de la souche avirulente (H37Ra) ont été détectées. La majorité des motifs arabinanes terminaux du LAM de la souche Erdman est substituée par un résidu mannosyle, un diamannoside ou un trimannoside chez H37Ra (Chatterjee *et al.*, 1992a). Une étude a révélé que le LAM de *M. bovis* BCG a les mêmes caractéristiques structurales que le LAM de la souche virulente de *M. tuberculosis*, notamment par la présence d'unités mannose à l'extrémité des chaînes latérales d'arabinanes (Venisse *et al.*, 1993). Par électrophorèse sur gel en milieu dénaturant, le LAM montre, quelle que soit son origine, un comportement électrophorétique identique, caractérisé par une bande diffuse entre 30 et 35 kDa. Le LAM de *M. tuberculosis* est un facteur important dans les relations hôte-pathogène. Il est impliqué dans l'immunopathologie de la tuberculose en tant qu'immunogène majeur des lymphocytes B (Gaylord *et al.*, 1987), immunosuppresseur de la prolifération antigène-dépendante (Ellner et Daniel, 1979), probablement par l'inhibition de la maturation des antigènes dans le macrophage (Moreno *et al.*, 1988), inhibiteur de l'activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$  (Barnes *et al.*, 1990) et stimulateur de la libération du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) par les macrophages (Sibley *et al.*, 1990).

Les travaux de Chatterjee *et al.* concernant la relation structure/fonction du LAM ont laissé supposer qu'il existe des différences structurales corrélées avec des différences fonctionnelles et que le LAM de la souche avirulente stimule fortement la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés qui acquièrent ainsi une activité bactériostatique accrue, alors que le LAM de la souche virulente élicite peu la libération de TNF- $\alpha$  (Chatterjee *et al.*, 1992b). Dans ce dernier cas, la croissance des organismes virulents est alors moins restreinte. Ces résultats sont actuellement mis en doute (Orme, communication personnelle).

## 2.2. Architecture moléculaire de la paroi: organisation des différents lipides

De nombreux modèles de l'organisation architecturale de ces différents glycolipides et lipopolysaccharides sont proposés dans la littérature. Les modèles reposent plus sur des spéculations que sur des résultats expérimentaux, mais la localisation des différentes familles de glycolipides et leur mode d'organisation posent des problèmes analytiques complexes. Le modèle de base relatif à l'organisation des constituants lipidiques le plus couramment utilisé est celui proposé par Minnikin (Minnikin, 1982). Le modèle a été repris et développé par Brennan (Brennan, 1989) et plus récemment, les travaux de Rastogi (Rastogi, 1991) l'ont confirmé ce modèle. Selon ce modèle, la paroi est structurée en trois couches (figure 2):

- la couche dite basale, dense aux électrons, de 3 à 13 nm, composée du peptidoglycane lié par un pont phosphodiester à l'arabinogalactane;
- la couche transparente aux électrons (ETL, pour *electron transparent layer*), majoritairement composée d'acides mycoliques estérifiant l'arabinogalactane;
- la couche externe (OL, pour *outer layer*), composée majoritairement de glycolipides spécifiques de l'espèce, de sulfolipides, du *cord factor*, de LAM, et de phospholipides.

La composition chimique de ces différentes couches et donc la localisation des différents glycolipides font l'objet de controverses. Par exemple, Brennan (Brennan, 1989) pense que le LAM est ancré dans la membrane plasmique via son unité phosphatidyl inositol, traverse la couche *ETL* et expose à la surface les unités arabinosyles, alors que dans le modèle de Rastogi (Rastogi, 1991), le LAM est localisé dans la couche extérieure. Il en est de même pour les phosphatidyl-inositol mannosides, situés dans la membrane cytoplasmique pour Brennan et dans la couche extérieure pour Rastogi.

Les mycobactéries virulentes sont des pathogènes intracellulaires qui ont la capacité de se multiplier dans les phagosomes des macrophages. La paroi bactérienne est impliquée dans la survie intramacrophagique des ces micro-organismes, ainsi que dans l'immunopathologie de la tuberculose. La formation dans la vacuole phagocytaire d'un halo entourant la mycobactérie permettrait sa survie. Ce halo est appelé *electron transparent zone (ETZ)* par Yamamoto (Yamamoto *et al.*, 1958), et capsule par Chapman (Chapman *et al.*, 1959). La souche virulente de *M. tuberculosis* H37Rv est capable d'inhiber la fusion phagosome/lysosome, un phénomène qui suit la phagocytose afin de détruire les bactéries. Les travaux d'Armstrong et d'Arcy-Hart suggèrent que les composés responsables de l'inhibition phagosome/lysosome sont présents à la surface de la mycobactérie (Armstrong et D'Arcy Hart, 1971; Armstrong et D'Arcy Hart, 1975).

Parmi les traits caractéristiques des mycobactéries figure leur résistance à de nombreux types d'antibiotiques. Les données de la littérature laissent supposer que la faible perméabilité de la paroi mycobactérienne, liée à la nature hydrophobe de ces constituants, joue un rôle important dans la résistance des mycobactéries aux antibiotiques, comme par exemple, la benzyl-penicilline, le chloramphénicol, l'érythromycine, tandis que les amino-glycosides, la rifampicine, l'isoniazide, la pyrazinamide, l'éthionamide et l'éthambutol présentent une activité clinique significative contre *M. tuberculosis*. La susceptibilité aux amino-glycosides et à la rifampicine est augmentée par des traitements de la paroi avec des détergents (Nikaido et Jarlier, 1991).

## 2.3. Structure antigénique de complexe 'tuberculosis'

Les antigènes mycobactériens jouent un rôle essentiel dans la relation avec l'hôte, surtout pour les espèces pathogènes. L'utilisation de nouvelles techniques en biologie moléculaire, biochimie, et immunologie a permis d'identifier les antigènes majeurs impliqués dans le métabolisme, dans la survie intracellulaire et dans la virulence d'espèces pathogènes. Une liste de plus de 50 antigènes mycobactériens est à présent disponible (Young *et al.*, 1992).

### 2.3.1. La tuberculine

La tuberculine est un mélange non défini obtenu à partir de filtrats de culture de *M. tuberculosis*, préparé pour la première fois 10 ans après la découverte de *M. tuberculosis* par Koch. Ce mélange est utilisé depuis sa découverte en 1897 jusqu'à nos jours comme un outil puissant pour le diagnostic d'infection. Le principe actif de la tuberculine, le PPD (*purified protein derivative*), se trouve essentiellement dans les fractions protéiques hétérogènes précipitantes. Cet outil diagnostique, adopté et standardisé à l'échelle mondiale par l'OMS, se base sur l'observation d'une réaction cutanée inflammatoire, appelée l'hypersensibilité de type retardé (DTH) 24 à 48h après une injection intradermique de la tuberculine chez un sujet préalablement infecté par une mycobactérie.

### 2.3.2. Les protéines cytoplasmiques

#### 2.3.2.1. Les enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés

Les protéines impliquées dans la synthèse protéique jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et certaines représentent des antigènes reconnus. Nous citerons trois exemples particulièrement intéressants. Le gène *aroA* de *M. tuberculosis* codant la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase, impliquée dans la synthèse d'acides aminés aromatiques, a été cloné par complémentation d'une souche mutante de *E. coli*. L'expression et l'immunogénicité de cette protéine ont été confirmées (Garbe *et al.*, 1990). Par la même stratégie de complémentation, le gène *lysA* de *M. tuberculosis* qui code l'acide diaminopimélique décarboxylase responsable de la conversion d'acide diaminopimélique en lysine, a été cloné et séquencé (Andersen et Hansen, 1993).

L'alanine deshydrogenase de *M. tuberculosis* a aussi été clonée. Cette protéine de 40 kDa, responsable de la conversion du pyruvate en L-alanine, a été identifiée chez *M. tuberculosis* et *M. marinum*, mais est absente chez le BCG (Andersen *et al.*, 1992). Cette enzyme pourrait être impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne. Les facteurs d'élongation sont un groupe de protéines participant à la synthèse protéique. Chez *M. tuberculosis* et *M. leprae* le gène codant pour un facteur d'élongation a été cloné (Carlin *et al.*, 1992; Honoré *et al.*, 1993).

### 2.3.2.2. Les protéines de stress

Ces protéines conservées au cours de l'évolution présentent une grande similarité chez toutes les espèces. Les fonctions de ces protéines, désignées protéines de choc (HSP) (*heat shock protein*), sont multiples. Elles jouent un rôle important dans l'adaptation des micro-organismes aux modifications de l'environnement (hausse de température, manque d'oxygène, choc osmotique,...). Une protéine de 71 kDa de *M. tuberculosis* homologue à DnaK d'*E. coli* a été identifiée par plusieurs laboratoires (Husson et Young, 1987; Shinnick, 1987; Andersen *et al.*, 1988). Cette protéine possède une activité ATPase et une activité d'autophosphorylation (Peake *et al.*, 1991). Une autre protéine de 65 kDa homologue à GroEL d'*E. coli*, a été mise en évidence chez *M. tuberculosis* (Shinnick, 1987; Young *et al.*, 1985a, 1985b et 1988), chez le BCG (Thole *et al.*, 1985 et 1987), et chez *M. leprae* (Mehra *et al.*, 1986). D'autres protéines de stress ont été détectées par homologie avec celles d'*E. coli*, comme par exemple GroES de *M. tuberculosis*. Ces protéines de choc ont été identifiées comme cibles potentielles du système immunitaire (Murray et Young, 1992; Polla, 1988). Des épitopes B et T ont été localisés sur la protéine de 65 kDa (Mehra *et al.*, 1986; Lamb *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1988; Kale *et al.*, 1990; Munk *et al.*, 1990). Le promoteur de gène de structure de *hsp60* nous a permis de produire plusieurs antigènes bactériens et parasitaires chez le BCG (Kremer *et al.*, 1996; Abomoelak *et al.*, soumis).

Ces protéines ont été testées pour développer un vaccin efficace contre la tuberculose, mais les résultats des essais de protection contre la tuberculose pulmonaire chez les animaux avec la 65 kDa recombinante ont été décevants. Récemment, une équipe anglaise a réussi à générer une protection chez les souris contre une épreuve par *M. tuberculosis*, proche de celle procurée par la vaccination par le BCG. Ils ont vacciné les souris avec des vecteurs qui produisent soit la protéine de 65 kDa, soit une protéine riche en proline de 36 kDa à partir d'un promoteur viral. L'injection des souris avec le vecteur exprimant la 65 kDa a induit une réponse humorale et des réponses cellulaires auxiliaire et cytotoxique contre la protéine (Tascon *et al.*, 1996).

### 2.3.3. Les protéines sécrétées

Les mycobactéries sécrètent des protéines dans le milieu extérieur et ces protéines représentent des cibles potentielles pour générer une immunité à médiation cellulaire (IMC) chez les souris infectées par *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1991). Ces protéines sécrétées sont responsables du recrutement des lymphocytes T (CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>) chargés d'activer ou d'éliminer les macrophages infectés (Rook *et al.*, 1986; Orme, 1988; Hubbard *et al.*, 1992; Orme *et al.*, 1992).



#### 2.3.3.1. Les protéines associées à la membrane ou à la paroi

Une lipoprotéine de 19 kDa a été isolée à partir de fractions membranaires de *M. tuberculosis* (Lee *et al.*, 1992). Cette protéine existe essentiellement chez les isolats virulents de *M. tuberculosis*. Une autre protéine de 38 kDa a été identifiée chez *M. tuberculosis* comme un homologue de la protéine périplasmique PstS d'*E. coli* impliquée dans le transport de phosphate. Le gène codant cette protéine a été cloné et séquencé. La séquence primaire prédit l'existence d'un peptide signal permettant le transport à travers la membrane cytoplasmique (Andersen *et al.*, 1990; Andersen et Hansen, 1989). Récemment, on a montré que l'expression de cette protéine est induite par la carence en phosphate (Andersen *et al.*, 1990). Cette protéine est capable de stimuler les lymphocytes T chez les souris immunisées, chez les cobayes et chez l'homme (Kadival *et al.*, 1987; Hasløv *et al.*, 1990).

Une protéine de 28 kDa a été purifiée dans notre laboratoire à partir de surnageants de culture de BCG, par chromatographie d'affinité sur une matrice d'héparine sépharose. Cette protéine, appelée HBHA, pour *heparin binding hemagglutinin*, présente une activité d'hémagglutination *in vitro* et peut induire l'agrégation des mycobactéries. Un anticorps monoclonal spécifique contre cette protéine inhibe l'adhérence du BCG aux cellules épithéliales. L'adhérence du BCG est aussi inhibée spécifiquement par les sucres sulfatés. Des études immunologiques ont montré la localisation de cette protéine à la surface du BCG. Les sérums de patients tuberculeux et non ceux de sujets sains, reconnaissent cette protéine, ce qui confirme son immunogénicité chez l'homme lors de l'infection mycobactérienne (Menozzi *et al.*, 1996). Le gène de structure qui code cette protéine a été récemment cloné. La séquence primaire déduite ne présente pas de peptide signal permettant la sécrétion de cette protéine et l'expression hétérologue de cette protéine chez *E. coli* a montré une différence de taille entre la protéine native et sa forme recombinante, ce qui laisse penser à une modification possible de cette protéine chez le BCG. La présence de cette protéine chez d'autres espèces mycobactériennes a été confirmée. La fonction de cette protéine est encore mal connue, mais les résultats actuels suggèrent qu'elle joue un rôle dans l'adhérence des mycobactéries aux cellules cibles et donc dans la colonisation des mycobactéries sur la surface des cellules épithéliales.

#### 2.3.3.2. Les protéines exportées

Un progrès considérable dans la recherche en mycobactériologie a été réalisé dans la caractérisation immunologique, génétique, biochimique des antigènes du complexe 85. Ce complexe est composé de trois protéines 85A, 85B, et 85C dont les gènes de structure sont dispersés sur le chromosome mycobactérien (Wiker *et al.*, 1990; Content *et al.*, 1991; Nagai *et al.*, 1991). Ces gènes ont été clonés et séquencés par plusieurs laboratoires (Matsuo *et al.*, 1988 et 1990; Borremans *et al.*, 1989; De Wit *et al.*, 1993; Abou-Zeid *et al.*,

1988a, 1988b et 1991; Thole *et al.*, 1992). Les phases ouvertes de lecture codées par ces trois gènes possèdent un peptide signal permettant la sécrétion des antigènes dans le surnageant de culture des mycobactéries, et une fraction des protéines reste attachée à la paroi permettant l'adhérence des mycobactéries aux cellules eucaryotes. Des homologues de ce complexe ont été identifiés chez d'autres espèces mycobactériennes, comme *M. leprae* (Pessolani et Brennan, 1992) et *M. kansasii* (Matsuo *et al.*, 1990).

Ratliff *et al.* ont attribué un rôle important au complexe 85 des mycobactéries, montrant que ces trois protéines possèdent une affinité pour la fibronectine (Ratliff *et al.*, 1987). Le BCG est capable d'adhérer spécifiquement aux cellules épithéliales. Cette adhérence semble dépendre de la fibronectine car elle est inhibée par des anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine. L'attachement du BCG aux cellules épithéliales est aussi inhibée si la bactérie est préalablement traitée par la fibronectine soluble (Kavoussi *et al.*, 1990). Cette propriété d'adhérence du BCG aux cellules épithéliales peut justifier l'efficacité de BCG contre le cancer de la vessie. Il a été montré que le BCG était capable d'être internalisé par les cellules tumorales de la vessie (Rous *et al.*, 1992). Le mécanisme précis de cet effet anti-cancer est loin d'être connu, mais plusieurs études ont confirmé que la réaction inflammatoire locale générée à la suite de l'adhérence du BCG aux cellules épithéliales endommagées est un élément essentiel dans cet effet (Ratliff *et al.*, 1987).

D'autre part, des études immunologiques ont révélé la capacité des composantes du complexe 85 à stimuler les lymphocytes T et à induire une hypersensibilité de type retardée chez le cobaye (Hasløv *et al.*, 1990). L'antigène 85A est ainsi capable de stimuler les lymphocytes T des souris produisant l'INF- $\gamma$  (Huygen *et al.*, 1988a et 1988b). Récemment, ces protéines ont été utilisées seules, ou en association avec d'autres protéines sécrétées de *M. tuberculosis*, afin de tester leur pouvoir protecteur contre la tuberculose pulmonaire. La vaccination par ces protéines a induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire forte chez le cobaye. Les essais de protection ont montré une efficacité considérable de ces protéines contre l'épreuve par *M. tuberculosis* chez le cobaye (Pal et Horwitz, 1992; Horwitz *et al.*, 1995).

Récemment, l'immunisation des souris par l'ADN codant le gène 85A sous une forme cytoplasmique ou sécrétée, a induit une réponse humorale et une réponse cellulaire qui étaient capable de protéger les souris contre une épreuve par *M. tuberculosis* (Huygen *et al.*, 1996). Ces protéines sécrétées sont immunogènes, elles représentent des cibles potentielles au système immunitaire et peuvent, dans certains cas être des candidats possibles pour un vaccin sous-unitaire contre la tuberculose.

Une autre protéine majeure sécrétée par *M. tuberculosis* a été isolée. Cette protéine de 24 kDa génère une réaction forte d'hypersensibilité de type retardé chez le cobaye infectés

préalablement avec des espèces mycobactériennes pathogènes (Harboe *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1991).

Une protéine capable d'inactiver les radicaux libres générés par les macrophages activés a été isolée chez *M. tuberculosis*, et son gène de structure a été cloné (Zhang *et al.*, 1991). Cette enzyme, la superoxyde dismutase (SOD) est un exemple de protéine exportée sans peptide signal N-terminal. Récemment la SOD de *M. avium* a été clonée et caractérisée (Escuyer *et al.*, 1996).

Une autre protéine sécrétée a été purifiée par sa capacité à créer une réaction d'hypersensibilité de type retardé seulement chez les animaux infectés avec des mycobactéries vivantes. Son gène de structure a été cloné et l'analogie avec certaines protéines des parois des cellules végétales fait envisager son rôle dans la structure de la paroi mycobactérienne. La composition en acides aminés est tout à fait inhabituelle car elle est caractérisée par l'absence d'acides aminés aromatiques, peu d'acides aminés basiques et par une très grande fréquence (40%) en proline (Romain *et al.*, 1993a et 1993b).

### **3. Relations mycobactérie/macrophage**

Les monocytes et essentiellement les macrophages représentent des éléments antimicrobiens majeurs dans le développement de l'immunité à médiation cellulaire, un facteur déterminant dans l'élimination des pathogènes intracellulaires. Afin de survivre, les micro-organismes intracellulaires, tel que les mycobactéries, doivent donc développer des stratégies leur permettant de lutter efficacement contre ces offensives.

#### **3.1. Attachement des mycobactéries à la cellule cible**

Les mécanismes d'attachement et de pénétration des mycobactéries dans les macrophages déterminent largement l'efficacité de l'élimination intracellulaire de la bactérie. *M. tuberculosis* et *M. leprae* se fixent sur les récepteurs des éléments du complément CR1 et CR3 ou intégrines (Schlesinger *et al.*, 1990) ou sur les récepteurs du mannose (Schlesinger, 1993). Ces voies de pénétration évitent l'utilisation des récepteurs des anticorps (Fc), se trouvant sur la membrane des macrophages et qui peuvent activer la voie antimicrobienne passant par les radicaux oxydés (ROI) (Wright et Silverstein, 1983).

Les mycobactéries peuvent aussi se fixer sur les macrophages par les protéines du complexe 85 qui possèdent une affinité pour la fibronectine, une composante majeure de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus.

### 3.2. la fusion phagosome-lysosome

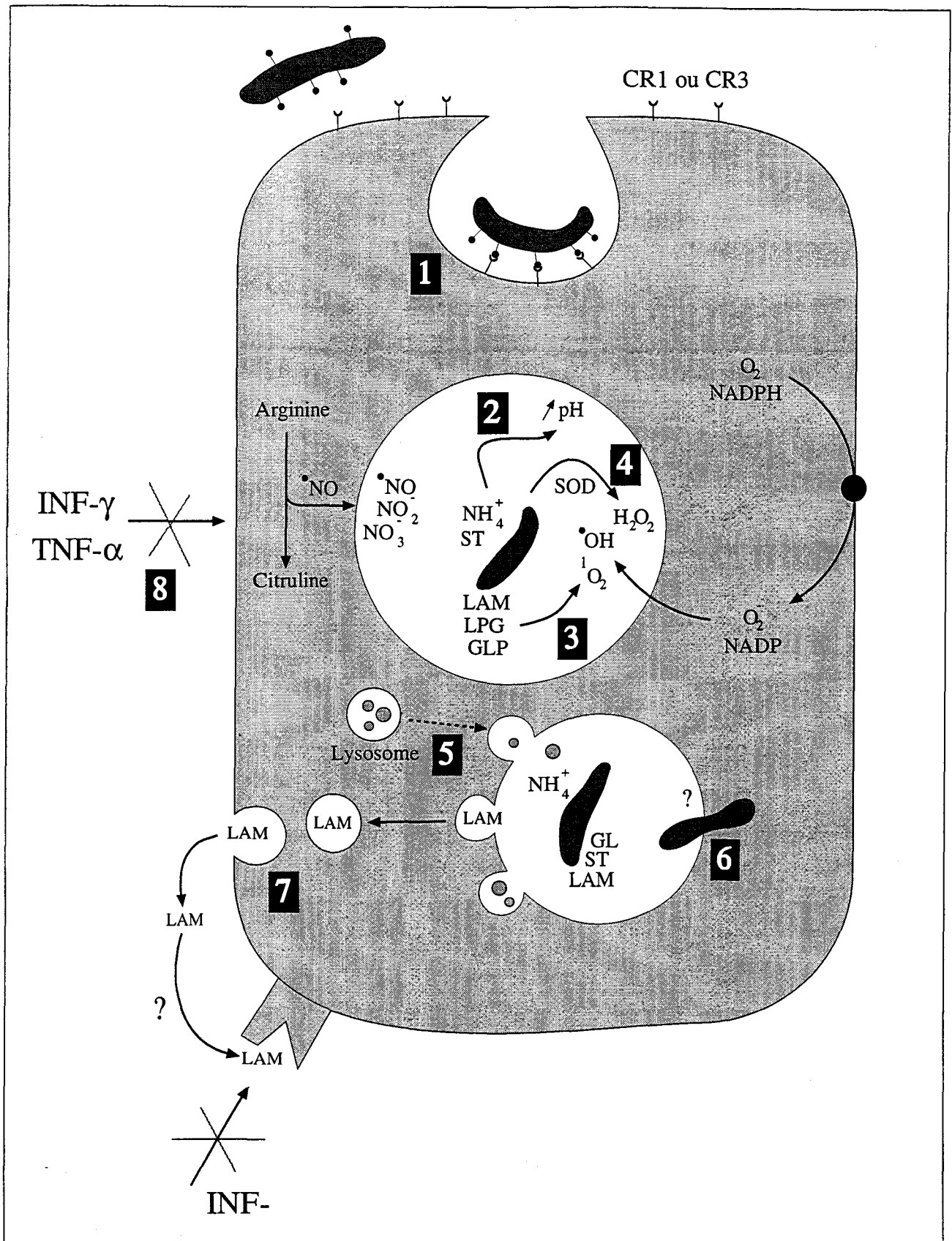
Les lysosomes sont des organelles contenant des enzymes capables de dégrader des micro-organismes et des macromolécules. L'activité de ces enzymes nécessite, dans le milieu intralysosomal, un pH d'environ 5. Généralement, les micro-organismes phagocytés par les macrophages, et séquestrés dans les phagosomes sont dégradés par les enzymes lysosomiales après une fusion des lysosomes avec les phagosomes (Cohn, 1963). Certaines bactéries sont dégradées au bout de 2h après être phagocytées, mais parfois 30 minutes sont suffisantes pour dégrader d'autres espèces bactériennes.

Une autre vue du phénomène a été proposée par Sturgill-Koszycki *et al.*, (1994) qui ont suggéré que la vacuole parasitophore contenant *M. tuberculosis* ou *M. avium* n'est qu'en partie fusionnée avec le compartiment lysosomal. En effet, certains marqueurs lysosomiaux comme le LAMP-1 (*lysosomal membrane protein*) sont retrouvés dans les vacuoles contenant les parasites, alors que d'autres marqueurs comme l'ATPase à proton, impliquée dans l'acidification du phagolysosome, sont absents. Au sein de la cellule hôte, ces mycobactéries semblent donc capables d'empêcher la fusion de certaines vésicules lysosomiales avec la vacuole parasitophore, ou d'en éliminer spécifiquement certains composants (Russel, 1995).

*M. tuberculosis*, est capable de sécréter l'ammoniaque en quantité significative dans les filtrats des cultures et cette substance basique pourrait inhiber la fusion phagosome/lysosome, en affectant l'acidité du milieu intralysosomal, ce qui peut perturber les enzymes de dégradation (D'Arcy Hart *et al.*, 1983 et 1987).

D'autres éléments qui pourraient jouer un rôle dans cette inhibition, sont les sulfatides produits par *M. tuberculosis*. Le mécanisme précis de cette inhibition est mal connu, mais cet effet pourrait être attribué à la formation des produits complexes qui bloquent physiquement les enzymes lysosomiales (Goren *et al.*, 1987).

Par ailleurs, *M. tuberculosis* est capable d'éviter les conséquences dramatiques de la fusion phagosomo-lysosomiale, en s'évadant de la vacuole phagocytaire vers le cytoplasme (Myrvik *et al.*, 1984; McDonough *et al.*, 1993). Ces mécanismes d'échappement ont été rapportés pour d'autres pathogènes intracellulaires comme *Listeria*, *Shigella* (Bielecki *et al.*, 1990; Sansonetti *et al.*, 1986). Une activité hémolytique a d'ailleurs été détectée chez *M. tuberculosis*, ce qui pourrait être l'explication moléculaire de la capacité de *M. tuberculosis* de s'évader de la vacuole phagocytaire vers le cytoplasme (King *et al.*, 1993).



**Figure 3.:** Stratégies potentielles de survie des mycobactéries dans le macrophage (voir détails dans le texte)

1. Phagocytose par une voie n'entraînant pas le relargage de dérivés oxygénés dans la vacuole.
2. Production d'ions ammonium et de sulfatides (ST) pour empêcher l'acidification de la vacuole d'endocytose.
3. Piégeage des radicaux oxygénés par le lipoarabinomannane (LAM), le lipophosphoglycane (LPG) ou des glycolipides phénolés (GLP) produits par la bactérie.
4. Sécrétion de superoxyde dismutases (SOD) (ou de chaperones, de transferrines...) par la bactérie.
5. Fusion partielle avec le compartiment lysosomal limitant l'acidification de la vacuole parasitophore.
6. Evasion de la bactérie vers le cytoplasme.
7. Bourgeonnement de vésicules chargées de LAM capable d'inhiber l'activation du macrophage par l' $\text{INF-}\gamma$ .
8. Incapacité du macrophage d'activer la voie cytotoxique arginine-dépendante.

### 3.3. Survie intracellulaire des mycobactéries dans les macrophages

Le comportement intracellulaire des mycobactéries pathogènes reste toujours un sujet très complexe et les données sont parfois contradictoires. Ces mécanismes de survie de *M. tuberculosis* et ceux de la défense antimycobactérienne élaborés par les macrophages sont schématisés dans la figure 3.

#### 3.3.1. Les radicaux oxydés (ROI)

Les radicaux oxydés jouent généralement un rôle important dans la défense de l'hôte vis-à-vis de l'agression microbienne. Ces radicaux ( $O_2^-$ , OH) sont générés à partir de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) sous l'action d'une oxydase ou du cytochrome b de la membrane des phagocytes. Des évidences expérimentales ont montré que ces radicaux oxydés ne peuvent pas inhiber ou tuer *M. tuberculosis* (Flesch et Kaufmann, 1987 et 1988; Chan *et al.*, 1992). Certains constituants de *M. tuberculosis* interviennent dans cet effet, comme le LAM et les glycolipides phénoliques (PG-1). Le LAM agit soit comme un capteur (*scavenger*) de ROI (Chan *et al.*, 1991), soit en inhibant la phospholipase C, une enzyme qui joue un rôle dans l'activation de ROI (Gennaro *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1986). Le LAM peut aussi inhiber la transcription des gènes inductibles par IFN- $\gamma$ , une cytokine majeure responsable de l'activation des macrophages (Chan *et al.*, 1991). Cette hypothèse a été soulevée en observant l'incapacité de IFN- $\gamma$  d'activer des macrophages pre-exposés au LAM ou pre-infecté par *M. leprae* (Sibley *et al.*, 1988).

Les PG-1 peuvent intervenir dans les mécanismes inhibiteurs de ROI soit en agissant comme un capteur de ROI, soit par une régulation négative d'un/des enzymes de ce système (Neill et Klebanoff, 1988; Chan *et al.*, 1989).

#### 3.3.2. Les radicaux à l'azote (RNI)

L'enzyme NO-synthase catalyse la production de monoxyde d'azote (NO) à partir de la L-arginine. Le NO et ses dérivés sont potentiellement toxiques pour les mycobactéries dans les macrophages murins activés par IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Denis, 1991; Flesch et Kaufman, 1991 et 1992; Chan *et al.*, 1992). La présence de ce système des radicaux toxiques chez les macrophages humains et son efficacité contre la survie microbienne restent toujours des sujets de controverses. Les RNI des macrophages murins sont inhibés par IL-4, IL-10 et TGF- $\beta$ 1 (Liew *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1991).

H37Rv, la souche virulente de *M. tuberculosis* produit une forme mannosylée de LAM (Man-LAM) incapable d'induire la production de TNF- $\alpha$  des macrophages, une cytokine responsable de l'activation des RNI (Chatterjee *et al.*, 1992b).

#### **4. La réponse immunitaire au cours de la tuberculose**

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

Seuls les bacilles isolés (un à trois au maximum) peuvent parvenir jusqu'aux alvéoles. Des macrophages alvéolaires présents dans le surfactant qui tapisse la paroi alvéolaire interviennent alors pour phagocyter les bacilles. Suivant la phagocytose, le macrophage actif est capable de détruire les bacilles intracellulaires ou au contraire ces bacilles se multiplient dans le macrophage alvéolaire. La multiplication intracellulaire du bacille «virulent» phagocyté conduira à la destruction locale du macrophage. Les bactéries libérées sont alors de nouveau phagocytées par d'autres macrophages alvéolaires et aussi par des cellules inflammatoires, polynucléaires et monocytes provenant de la circulation. Un petit foyer infectieux local se constitue progressivement. Les bactéries isolées et les bactéries ingérées par des macrophages alvéolaires sont transportées par ceux-ci vers le ganglion lymphatique drainant le site où se développe cette infection (Harmsen *et al.*, 1985). Ce transport actif par les macrophages alvéolaires constitue certainement un élément essentiel dans la naissance de la réponse immunitaire contre la tuberculose pulmonaire. Cette réponse immunitaire fait intervenir les deux composantes de l'immunité, la réponse humorale et cellulaire.

##### **4.1. La réponse humorale au cours de la tuberculose**

Il existe une réponse immunitaire humorale au cours de la tuberculose. Cette réponse est de faible intensité et au même temps elle ne joue pas un rôle notable dans la protection contre la maladie. Schlesinger *et al.*, (1990) ont mis en évidence une phagocytose plus rapide des mycobactéries par les macrophages lorsque les bactéries sont recouvertes d'anticorps et mises en présence de complément.

##### **4.2. La réponse cellulaire au cours de la tuberculose**

L'immunité à médiation cellulaire joue un rôle déterminant dans la protection contre la maladie. Cette conviction commença depuis 1960 avec les travaux de Suter et plus tard avec ceux de North qui ont confirmé le rôle important des lymphocytes T dans la résistance à l'infection mycobactérienne (Suter, 1961; North, 1973). Ces résultats ont été confirmés par les travaux remarquables de Collins et Orme (Orme et Collins, 1983 et 1984).

La composante cellulaire de l'immunité fait intervenir plusieurs cellules du système immunitaire comme les macrophages, les monocytes et les lymphocytes B et T. Après la

phagocytose des bactéries par les cellules présentatrice des antigènes, ces bactéries sont dégradées soit par le milieu acide suivant la fusion phagosome/lysosome soit par les cascades enzymatiques secondaires à la fusion de la membrane de deux compartiments (voir relation mycobactéries/macrophages). Deux grandes voies de présentation des antigènes aux lymphocytes T sont en effet actuellement décrites. Pour l'une de ces voies, des peptides associés aux CMH classe II sont présentés aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> après un trajet intracellulaire relativement simple. Pour l'autre voie, les peptides présents au niveau du cytoplasme sont transportés dans une vésicule du réticulum endoplasmique (RE) où ils se lient aux CMH classe I. Cette présentation par les CMH classe I sélectionne des lymphocytes CD8<sup>+</sup> spécifiques.

Les souris athymiques (nude), qui n'ont pas de lymphocytes T fonctionnels en périphérie, sont beaucoup plus sensibles à l'infection par *M. tuberculosis*. La démonstration du rôle des lymphocytes T en tant que supports de la protection spécifique a été apportée dans les expériences de transfert de cellules provenant d'animaux immunisés par le BCG à des animaux naïfs (Lefford, 1975). En utilisant ce modèle expérimental, il a pu être montré que des lymphocytes CD4<sup>+</sup> présents au tout début de l'immunisation (dans les premières semaines) ainsi que dans les phases tardives de celle-ci (troisième mois) sont des supports de l'immunité anti-infectieuse. Des résultats récents ont montré que les souris transgéniques n'exprimant pas les CMH classe I et par conséquent n'ayant pas de CD8<sup>+</sup> fonctionnels, mais uniquement de CD4<sup>+</sup>, sont particulièrement sensibles à la tuberculose (Flynn *et al.*, 1992). Le même groupe a par ailleurs réussi à montrer que l'IFN- $\gamma$  est important pour le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*, en utilisant des souris dont le gène codant l'IFN- $\gamma$  a été rendu inactif (Flynn *et al.*, 1993). Les cytokines sécrétés par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1, essentiellement IL-2 et IFN- $\gamma$ , sont responsables de l'induction d'une activité microbicide chez les macrophages. Les lymphocytes prélevés de souris résistantes à l'infection par le BCG produisent une quantité considérable de IFN- $\gamma$  et IL-2, mais ils produisent également une faible dose de IL-4, tandis que ceux qui sont prélevés de souris susceptibles à l'infection par le BCG produisent une grande quantité de IL-4, mais une faible quantité de IFN- $\gamma$  et IL-2 (Huygen *et al.*, 1992). Ces résultats ne permettent pas de trancher entre le rôle des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'ensemble de ces expériences montrent la nécessité de la composante cellulaire (auxiliaire et cytotoxique) de l'immunité au cours de la tuberculose.

Chez l'homme, la démonstration d'un rôle fondamental joué par les cellules T dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* est apportée, malheureusement, par l'infection par le VIH. Les sujets infectés par le VIH présentent une sensibilité accrue à la tuberculose. Ces malades développent une tuberculose «classique» lorsque le nombre de leurs CD4<sup>+</sup> est au-dessus de 200/mm<sup>3</sup>, et une tuberculose extensive généralisée lorsque le nombre des CD4<sup>+</sup> est inférieur à 50 (Barnes *et al.*, 1991).



### 4.3. La vaccination contre la tuberculose

Depuis le début du siècle, il est acquis que la vaccination contre la tuberculose, pour être efficace, doit obligatoirement être effectuée avec des bactéries vivantes (Calmette et Guérin, 1911). Le BCG est jusqu'à présent le seul vaccin efficace administré à très grande échelle sans provoquer des effets secondaires graves. Il a été montré qu'il est nécessaire que les bactéries soient vivantes et aussi capables de se multiplier dans les tissus de l'animal pour conduire à une protection anti-infectieuse efficace. Cette observation montre que les antigènes produits par le BCG vivant jouent un rôle primordial dans la protection procurée de la vaccination. Des approches génétiques et biochimiques ont permis d'identifier et caractériser plusieurs protéines mycobactériennes. Ces protéines ont été utilisées dans le but de développer des vaccins sous-unitaires efficaces contre la tuberculose (voir introduction, les protéines cytoplasmiques et les protéines sécrétées). Ces travaux visent à comprendre les mécanismes de la pathogénèse et de la protection, le développement de souches virales ou bactériennes recombinantes exprimant des antigènes mycobactériens, le développement de souches atténuées de *M. tuberculosis* et aussi le changement de la dose et de la voie d'administration du BCG chez l'homme.

## 5. L'infection mycobactérienne

La primo-infection tuberculeuse est consécutive à l'inhalation du bacille tuberculeux et à son implantation dans l'alvéole pulmonaire. Chez les personnes immunocompétentes, dans 90% des cas, cette primo-infection reste latente, mais dans 10% des cas, elle évolue vers une maladie. Des facteurs particuliers, dont le jeune âge et surtout l'immunosuppression, augmentent ce risque d'évolution vers une la maladie. La tuberculose n'est contagieuse que dans sa forme pulmonaire.

Les données disponibles proviennent des systèmes de déclaration obligatoire dont la qualité est loin d'être parfaite. Ces systèmes souffrent en effet d'un manque d'exhaustivité, estimé à 63% à Washington et entre 50% et 70% en France (Cantwell *et al.*, 1994). Néanmoins, l'ensemble des pays considèrent généralement que ces défauts sont stables dans le temps et ne sont pas un obstacle à l'interprétation de l'évolution de l'incidence.

Aux Etats-Unis, la tendance régulière à la diminution de la tuberculose a brusquement cessé en 1985. De 1985 à 1992, le nombre de cas déclarés a augmenté de 20% dans plusieurs villes comme New York, ou au Texas et en Californie (Rieder *et al.*, 1989). Cette hausse a été attribuée à de nombreux facteurs, dont l'épidémie d'infection au VIH, l'immigration, la pauvreté, l'absence de domicile et la toxicomanie. Cette augmentation est malheureusement accompagnée d'une apparition des souches multirésistantes de *M. tuberculosis*. Ces souches résistantes à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine, signalées aux Etats-Unis dans plusieurs études statistiques touchent principalement les malades du SIDA (Frieden *et al.*, 1993).

La situation est un peu moins dramatique en Europe. Même si une étude réalisée par l'OMS a montré la stabilité des cas de la maladie dans certains pays, la diminution des incidences dans d'autres pays, et la hausse des cas dans d'autres pays, les incidences des souches multirésistantes en Europe et en France semblent être moins préoccupantes. En effet, la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine mesurée sur les souches de 1982 à 1991 au Royaume-Uni est de 0,6%, sans augmentation entre 1982 et 1991. En France, une enquête nationale, portant sur 8521 malades ayant une tuberculose indique une prévalence de la multirésistance de 0,5% (Schowebel *et al.*, 1993).

## II. CADRE ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

La vaccination constitue à l'heure actuelle une des méthodes les plus rentables pour prévenir les maladies infectieuses. Malgré l'effort mené par l'OMS pour étendre son programme de vaccination, plus de 20 millions de personnes meurent chaque année de maladies infectieuses. A présent, les maladies virales, bactériennes et parasitaires continuent à causer des millions de décès, surtout dans les pays en développement (OMS, 1995). Les problèmes sanitaires souvent liés aux difficultés économiques dans ces pays, font que le développement des nouveaux vaccins demeure une obligation absolue.

Dans ce contexte de la nécessité d'améliorer les vaccins actuels, nous avons entamé notre travail afin de développer une souche recombinante de BCG capable d'exprimer des antigènes hétérologues d'intérêt vaccinal. Le BCG est le vaccin bactérien vivant le plus administré à l'échelle mondiale. Il présente un intérêt tout particulier car il répond à de multiples critères importants pour constituer un vaccin idéal adapté notamment aux pays en voie de développement (Bloom, 1989). Le BCG est largement utilisé depuis 1948 et a été administré à plus de 3 milliards de personnes pour lutter contre la tuberculose (Colditz *et al.*, 1994), avec une faible fréquence d'effets secondaires graves. D'autre part, la paroi mycobactérienne agit comme adjuvant puissant car elle augmente la réponse immunitaire dirigée contre divers antigènes. L'administration du BCG dès la naissance et le pouvoir du BCG de survivre dans l'individu vacciné pour longtemps suffisent souvent pour générer une réponse immunitaire cellulaire durable pendant plusieurs années (Bloom, 1989). Enfin, il est relativement thermostable, il ne nécessite pas de chaîne de froid et est peu coûteux à produire.

Afin de développer des souches de BCG capables de produire des antigènes hétérologues, plusieurs outils moléculaires ont été développés au cours des dernières années. Des vecteurs navettes d'expression ont été construits permettant au BCG d'exprimer les antigènes hétérologues. Plusieurs souches recombinantes de BCG ont été développées dans plusieurs laboratoires. Les immunisations avec ces souches chez des modèles animaux ont induit des réponses humorale et/ou cellulaire et dans quelques cas ces souches recombinantes ont induit une protection. C'est notamment le cas pour l'antigène OspA de *B. burgdorferi* dont

la souche recombinante a induit une réponse immunitaire protectrice chez la souris. Actuellement, cette souche est en phase expérimentale chez l'homme (Stover *et al.*, 1993).

Le premier but de notre travail fut le développement d'une souche recombinante de BCG capable d'exprimer et de sécréter les antigènes hétérologues à la surface de la bactérie ou dans le surnageant de culture ce qui permettrait une meilleure présentation des antigènes exprimés au système immunitaire. Donc, nous avons entamé notre travail par l'utilisation des signaux d'expression du gène 85A de *M. tuberculosis*, un membre du complexe 85, afin de produire les antigènes hétérologues sous une forme sécrétée. Ces signaux d'expression mycobactériens ont permis d'exprimer plusieurs antigènes bactériens et parasitaires chez le BCG: S1, la sous-unité enzymatique de la toxine pertussique, la protéine S1-TTC, une fusion protéique entre S1 et TetC le fragment C de la toxine tétanique, la Sm28GST de *S. mansoni* et Gra1 de *T. gondii*. Les immunisations avec ces souches exprimant S1 et la protéine S1-TTC n'ont pas induit de réponse immune humorale ou cellulaire chez les souris, tandis que une réponse cellulaire faible mais spécifique a été détectée avec les souches exprimant les deux antigènes parasitaires (Kremer *et al.*, 1995; Supply *et al.* soumis).

Afin d'augmenter l'immunogénicité du BCG recombinant, un autre système d'expression hétérologue faisant appel au promoteur de *hsp60* de BCG, un promoteur constitutif largement utilisé afin de produire des antigènes hétérologues chez le BCG, fut développé pour exprimer les antigènes sous une forme cytoplasmique. Les antigènes exprimés sont les fragments des toxines bactériennes ou des antigènes parasitaires dont les effets protecteurs ont été bien confirmés dans différents modèles animaux. Dans un deuxième temps, une chimère constituée de trois fragments de toxines bactériennes (PTX, TTX, DTX) a été produite chez le BCG sous une forme cytoplasmique.

Finalement, les signaux d'expression et de sécrétion (les promoteurs et les peptides signaux) des trois composantes du complexe 85 (85A, 85B et 85C), trois protéines majeures sécrétées dans le surnageant des mycobactéries et ayant une affinité pour la fibronectine, ont été analysés à l'aide de fusion avec la phosphatase alcaline d'*E. coli* afin de déterminer la force relative de ces signaux chez *M. smegmatis* et chez le BCG. L'analyse des peptides signaux de 85A et 85B a permis de mesurer la force des signaux d'exportation fusionnés à la phosphatase alcaline sous le contrôle du promoteur *hsp60*.

### III. RESULTATS

#### Article I. Humoral and cellular immune responses elicited in mice immunised with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein

Le vingtième siècle a vu naître une quantité impressionnante de vaccins, capables de protéger contre beaucoup de maladies infectieuses qui, au siècle dernier, constituaient les premières causes de mortalité dans nos pays. Le succès de ce développement pose un nouveau problème d'administration de ces vaccins, surtout chez l'enfant. En effet, la couverture vaccinale optimale nécessitera a priori autant d'injections qu'il y a de vaccins différents avec leurs rappels. Une nouvelle priorité dans la recherche en vaccinologie est donc le développement de vaccins combinés, capables de protéger contre plusieurs maladies simultanément, si possible avec un nombre d'immunisations réduit.

Un des premiers vaccins combinés et un des plus utilisés est celui qui protège contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (DTP). L'utilisation de ce vaccin pendant les 40 dernières années a considérablement diminué la mortalité infantile dans nos pays. Cependant, dans certains pays les effets secondaires du composant coqueluche a conduit à un arrêt de vaccination contre cette maladie, suivi d'une recrudescence quasi immédiate de la coqueluche. De nouveaux vaccins, moins réactogènes ont donc été développés. Cependant, les coûts de production de ces vaccins sont plus élevés que ceux des vaccins traditionnels, ce qui rend l'immunisation à l'échelle mondiale plus difficile, surtout dans les pays en voie de développement où les maladies d'enfance sont les plus dévastatrices.

Afin de simplifier le vaccin DTP, notre stratégie vise à produire une protéine hybride comportant les différentes parties protectrices des antigènes majeurs diphtérique, tétanique et coquelucheux et à l'exprimer chez le BCG. Une première protéine hybride, appelée S1-TTC et composée de la sous-unité S1 de la toxine de *B. pertussis* fusionnée au fragment C de la toxine tétanique avait déjà été construite et produite chez *Escherichia coli* (Boucher *et al.*, 1994). Cette protéine chimérique s'est avérée capable d'induire la production d'anticorps neutralisants l'activité de la toxine de *B. pertussis* chez la souris et le cobaye, ainsi que celle d'anticorps protecteurs contre une épreuve par la toxine tétanique.

Cependant, bien que la toxine de *B. pertussis* soit l'antigène protecteur principal dans les nouveaux vaccins contre la coqueluche, il n'existe pas de corrélation entre la protection chez l'enfant et la production d'anticorps neutralisants. Il semblerait que ce soit plutôt une réponse cellulaire qui protégerait contre la coqueluche.

Lors de cette première partie de la thèse nous avons donc exprimé le gène codant la S1-TTC chez le BCG. En effet, le BCG est connu pour sa capacité à induire une réponse cellulaire. Par ailleurs, des souches de BCG produisant le fragment C de la toxine tétanique sont capables d'induire une réponse humorale contre cette toxine. Cette mycobactérie nous paraît donc être un vecteur de choix pour l'induction d'une réponse cellulaire contre la toxine de *B. pertussis* et une réponse humorale contre la toxine tétanique.

Le gène codant la protéine hybride a été exprimé chez le BCG en utilisant deux systèmes d'expression différents. Le premier système fait appel aux signaux d'expression et d'exportation de l'antigène 85A. Si nous avons pu mettre en évidence l'expression du transgène dans ce système, aucune réponse immunitaire spécifique n'a pu être décelée chez les souris immunisées avec cette construction. En revanche, le deuxième système dans lequel l'expression du transgène était sous le contrôle du promoteur *hsp60* a conduit à une souche de BCG recombinant capable d'induire une bonne réponse humorale contre S1-TTC. Cette réponse était probablement dirigée contre la partie tétanique de la protéine, car aucune réponse humorale anti-toxine de *B. pertussis* n'a pu être détectée. Les isotypes des anticorps anti-S1-TTC étaient de la classe des IgG1, IgG2a et IgG2b suggérant une réponse mixte. Cette réponse humorale restait élevée pendant au moins six mois. L'immunisation par la souche recombinante induisait également une réponse cellulaire, détectée par la production d'IL-2 en réponse spécifique à la stimulation par S1-TTC. Par opposition à l'absence d'induction d'anticorps anti-toxine de pertussis, la souche de BCG recombinant était capable d'induire une production d'IL-2 spécifique pour la toxine de *B. pertussis*.

Ces résultats montrent donc qu'il est possible de construire un vecteur vivant à base de BCG produisant une protéine hybride, capable d'induire une réponse humorale contre la toxine tétanique et une réponse cellulaire contre la toxine de *B. pertussis*, deux paramètres qui sont probablement les plus critiques pour la protection chez l'enfant.

Humoral and cellular immune responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein

Bassam Abomoelak<sup>1</sup>, Kris Huygen<sup>2</sup>, Laurent Kremer<sup>1</sup> and Camille Locht<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex; and <sup>2</sup>Institut Pasteur de Bruxelles, 642, Rue d'Engeland, B-1180 Brussels, Belgium.

\*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 20.87.11.51  
Fax : (+33) 3 20.87.79.06  
e-mail : camille.locht@pasteur-lille.fr



The development of combined vaccines constitutes one of the priorities in modern vaccine research. One of the most successful combined vaccines in use is the diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) vaccine. However, concerns about the safety of the pertussis arm have led to decreased acceptance of the vaccine, but also to the development of new, safer and effective acellular vaccines against pertussis. Unfortunately, the production cost of these new vaccines is significantly higher than that of previous vaccines. Here, we explore the potential of live recombinant BCG producing the hybrid protein S1-TTC, that contains the S1 subunit of pertussis toxin fused to fragment C of tetanus toxin, as an alternative to the acellular vaccines. S1-TTC was produced in two different expression systems. In the first system its production was under the control of the 85A antigen promoter and signal peptide and in the second system it was under the control of the *hsp60* promoter. Although expression of the hybrid antigen was obtained in both cases, only the second expression system yielded a recombinant BCG strain able to induce both a specific humoral immune response and a specific cellular immune response. The antibodies generated were directed against the TTC part, whereas IL-2 production was specific for both parts of the molecule. Since protection against tetanus is antibody mediated, and protection against pertussis may be cell mediated, this constitutes a first promising step towards the development of a cost-effective, protective and safe combined vaccine against pertussis, tetanus and tuberculosis.

Diphtheria, pertussis and tetanus (DPT) vaccines have contributed tremendously to the decrease of childhood mortality over the past decades (29). However, despite this success, these three diseases still remain among the most significant infectious childhood diseases, especially in the developing world. In addition, the safety of DPT vaccines has been questioned in several countries in recent years, especially with regard to the pertussis arm, a whole-cell vaccine component (9). As a consequence, these vaccines have suffered a decrease in acceptance, resulting in the reappearance of pertussis epidemics. Side effects ascribed to pertussis vaccines include local oedema and erythema, as well as rare but serious neurological reactions, including acute encephalopathy and even death.

A significant improvement has recently been accomplished through the development of new, acellular pertussis vaccines. In large phase III trials, these vaccines have been shown to be highly efficacious and of negligible reactogenicity (1, 12, 13, 35). While the acellular vaccines tested varied substantially in their antigen composition, all contained at least pertussis toxin, considered to be the main protective antigen against pertussis. However, no serological correlation has so far been found between protection in children and antibodies to any of the antigens included in these vaccines. These observations suggest that cellular immunity may play an important role in protection against pertussis, although pertussis toxin-neutralizing antibodies toxin are capable of passively protecting mice against *Bordetella pertussis* challenge (33).

The role of cellular immunity against pertussis has been demonstrated in mouse models (26), and spleen cells isolated from convalescent mice produce high levels of IFN $\gamma$  and IL-2, indicative of a Th1-type response. In addition, CD4<sup>+</sup> clones of infected human subjects secrete also mainly IFN $\gamma$  and IL-2, but little IL-4 (28). Considering that natural infection usually induces a longer lasting protection against subsequent infection by *B. pertussis* than does vaccination (3, 17, 23), it is therefore possible that a Th1-type cellular immune response rather than a Th2-type antibody response mediates long-lasting protection.

*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is known to induce essentially a Th1-type response, and infection of life recombinant BCG producing foreign antigens has been shown to elicit cell-mediated immunity directed toward the heterologous antigens (2, 37). In addition to inducing a cellular immune response, recombinant BCG can also induce significant levels of antibodies against foreign antigens (21). Furthermore, BCG has been widely used as a vaccine

against tuberculosis, is generally considered safe, can be administered at, or any time after birth and is substantially less expensive than most other vaccine formulations (6).

With the long-term goal to develop a combined pertussis-tetanus-tuberculosis vaccine, we therefore wished to evaluate the immune responses elicited by a recombinant BCG strain that produces a hybrid protein composed of the protective part of pertussis toxin fused to the protective part of tetanus toxin. This protein, named S1-TTC, contains at its N-terminal moiety the S1 subunit of pertussis toxin and at its C-terminal moiety fragment C of tetanus toxin (TTC). We have previously shown that it can be produced at high levels in *Escherichia coli* and that, in its purified form, it retains TTC-specific receptor-binding activity to the ganglioside GT<sub>1b</sub> and antigenicity to neutralizing anti-S1 antibodies which specifically recognize conformational epitopes (7). In this study, we demonstrate that S1-TTC can be produced in BCG and that the recombinant BCG is able to induce a specific T-cell response as well as an antibody response against S1-TTC.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Eight-weeks-old BALB/c (H-2d) female mice (Iffa Credo, l'Arbresle, France) were used for immunization with the recombinant BCG. The mice were immunized intraperitoneally (i. p.) or intravenously (i. v.) with  $5 \times 10^6$  non-transformed BCG or BCG producing S1-TTC.

**Bacterial strains and growth conditions.** All cloning steps were performed in *E. coli* XL1-blue (Stratagene, La Jolla, Calif). S1-TTC production was carried out in *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2) and in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (36). Mycobacterial transformation and culture were done as described by Kremer et al. (19).

**Plasmids and DNA manipulation.** pUC18 and pUC19 were purchased from New England Biolabs (Beverly, Mass). pUC4K (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) was used to isolate the kanamycin-resistance gene (Kan<sup>R</sup>). pEC001, and the shuttle vector pRR3ΔKan were described by Kremer et al. (19), pS1-tC encoding the S1-TTC hybrid protein was described by Boucher et al. (7), and pUC::hsp60 was described by Kremer et al. (20). Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, Klenow fragment and other DNA modifying enzymes were purchased from Boehringer Mannheim Corp. (Mannheim, Germany). All DNA manipulations were performed using standard protocols as described by Sambrook et al. (32).

**Purification of S1-TTC.** The procedure used for the purification of S1-TTC was described by Boucher et al. (7). Briefly, two liters of culture containing *E. coli* JM109(pS1-tC) were grown to an optical density at 600 nm of 0.4. Expression of the S1-TTC-encoding gene was then induced by the addition of isopropylthio-β-D-galactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM. After an additional incubation at 37°C for 5 hours, the cells were harvested by centrifugation, washed and resuspended in 40 ml of lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The cells were then disrupted by sonication and the lysate clarified by centrifugation. The supernatant was applied onto a DEAE-cellulose column (Whatman DE-52; 2.5 x 30 cm), and, after washing, bound material was eluted with lysis buffer containing 50 mM NaCl. The fractions containing S1-TTC were pooled, adjusted to 1 M NaCl and loaded onto a Phenyl-Sepharose (Pharmacia) column. After washing, the protein was eluted with 10 mM Tris-HCl (pH 9.5), 10 % glycerol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The fractions

containing S1-TTC were pooled, immediately adjusted to pH 7.5 by the addition of 1 M Tris-HCl (pH 7.0), dialysed overnight against several changes of phosphate-buffered saline (PBS; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 0.15 M NaCl), concentrated with a Millipore CX-10 concentrator to 1 mg/ml, and then stored at -80C° until further use.

**Construction of expression vectors.** pEN004 was constructed as follows. The promoter and signal-peptide coding sequence of the antigen 85A gene were isolated from pEC001 by digesting this plasmid with *Hind*III, blunt-ending with Klenow fragment, and then re-digesting with *Bam*HI. This fragment was ligated into *Sma*I/*Bam*HI-digested pS1-tC generating pEC007. The 1.3-kb *Hind*III fragment corresponding to the kanamycin-resistance gene (Kan<sup>R</sup>) was isolated from pUC4K and ligated into pEC007 previously digested with *Hind*III and blunt-ended with Klenow fragment. This yielded pEC012, which was further digested with *Pvu*II, and the resulting 4.2-kb fragment was ligated into the blunt-ended *Sca*I site of pRR3ΔKan, generating the final shuttle vector pEN004 (Fig. 1A).

pBMX was constructed as follows. First, the 1.3-kb *Pst*I fragment corresponding to the Kan<sup>R</sup> gene was isolated from pUC4K, blunt-ended with T4 DNA polymerase and cloned into pUC::*hsp60*, previously digested with *Bam*HI and blunt-ended with Klenow fragment. The resulting plasmid, named pUCHspK, was then digested with *Nco*I and *Xba*I and blunt-ended with Klenow fragment. The 1.7-kb fragment containing the Kan<sup>R</sup> gene and the *hsp60* promoter was cloned into the unique *Sma*I site of pS1-tC giving rise to pBM02, which was in turn digested with *Pvu*II. The resulting 3.4-kb fragment was finally inserted into the *Sca*I site of pRR3ΔKan, yielding the shuttle vector pBMX (Fig. 1B).

**Immunoblotting of recombinant proteins.** Ten-milliliters of each mycobacterial culture were harvested at mid-log phase by centrifugation. The cells were then resuspended in 1.5 ml of PBS and disrupted for 10 minutes with a Branson Sonifier 450 at half-maximal constant output. The resulting *M. bovis* BCG or *M. smegmatis* crude extracts were then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of SDS and using a 12% polyacrylamide gel as described by Laemmli (22). After electrophoresis, the proteins were transferred onto a Hybond-C Extra membrane (Amersham France). The membrane was then saturated with 5% dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS/Tw). The antibodies used for the detection of recombinant proteins

were a monoclonal antibody (1B7) directed against the S1 subunit of pertussis toxin (34) and rabbit polyclonal antibodies directed against tetanus toxoid (7), both kindly provided by H. Sato and Y. Sato (National Institute of Health, Tokyo, Japan). The immunoblots were developed using goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibodies or goat anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated antibodies, purchased from Promega (Madison, Wis).

**Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).** The wells of polystyrene microdilution plates (4-39454; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight with 100  $\mu$ l of the ganglioside GT<sub>1b</sub> at a concentration of 1  $\mu$ g/ml in PBS. The plates were washed 3 times with PBS, and 50  $\mu$ l of purified S1-TTC was then added at a concentration of 2  $\mu$ g/ml in PBS in each well. After incubation for 2 hours at room temperature, the plates were washed 3 times by PBS, and the sera were then added in PBS/Tw containing 0.5 % bovine serum albumin (PBS/Tw/BSA) in two-fold serial dilutions. The plates were incubated for 2 hours, washed with PBS/Tw/BSA, and horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG1 (1/10,000), anti-IgG2a (1/10,000), anti-IgG2b (1/12,000) or anti-IgG3 (1/10,000) was added. Alternatively, biotinylated anti-mouse IgG (RPN.1001; Amersham) was added at a 1/500 dilution, incubated for 1 hour in PBS/Tw, washed 3 times with PBS/Tw and then incubated with the streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (RPN. 1051. Amersham) at a dilution of 1/1,000 for 30 minutes in PBS/Tw. The plates were finally washed 3 times with PBS/Tw and then developed with 0.4 mg/ml of O-phenylenediamine dihydrochloride (P-4664; Sigma) and 1  $\mu$ l/ml hydrogen peroxide in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) at 37C° in the dark. The plates were read using a Nunc immunoreader NJ 2000 at 490 nm.

**Spleen-cell cytokine production.** Two months after i. p. immunization of mice with recombinant BCG producing S1-TTC, the mice were sacrificed by cervical dislocation, and the spleens were removed aseptically. Spleen cells were isolated by using a loosely fitting Dounce homogenizer, washed, adjusted to a concentration of  $4 \times 10^6$  cells per ml and grown in flat-bottomed microwell plates (Nunc) in RPMI 1640 medium supplemented with HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), glutamine,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, antibiotics, and 10% heat-inactivated fetal calf serum. The purified S1-TTC or pertussis toxin (PTX), purchased from List Biologicals (Campbell, Calif.), was added to the cultures at 10  $\mu$ g/ml or

1 µg/ml, respectively. The cells were incubated at 37°C in a humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h the supernatants were harvested for the determination of IL-2 production as described previously (15). Each experiment was repeated at least three times, and the results of one representative experiment are shown.

## RESULTS

**Production of S1-TTC under the control of the antigen 85-A promoter and signal peptide.** We have previously shown that the antigen 85A promoter and signal peptide can be used for heterologous expression and protein secretion in mycobacteria (19). In a first attempt we therefore used these expression and secretion signals for the production of S1-TTC in BCG by constructing pEN004, as described in Materials and Methods. In addition to the S1-TTC expression cassette, this vector contains a mycobacterial origin of replication and a gene providing resistance to kanamycin of the recombinant mycobacteria (Fig. 1A).

*M. smegmatis* and BCG were transformed with pEN004, and the recombinant mycobacteria were selected on solid Middlebrook medium containing 25 µg/ml of kanamycin. Kanamycin-resistant colonies were tested for their plasmid content using the electroproduction method described by Baulard et al. (4). Recombinant mycobacteria containing the expected plasmid were then grown in liquid medium containing 25 µg/ml of kanamycin for approximately 5 days in the case of *M. smegmatis* and for two weeks in the case of BCG. Mycobacterial cell extracts were then prepared and analyzed by immunoblotting using anti-S1 monoclonal antibody 1B7 and an anti-TTC polyclonal antibody. As shown in Fig. 2, only the recombinant BCG containing pEN004 produced an immunoreactive band corresponding to an approximately 75-kDa protein. The size of the protein was as expected, and it was recognized by both anti-S1 and anti-TTC antibodies, indicating that it contained both antigenic determinants. In addition to the 75-kDa protein, a smaller, approximately 37-kDa protein was also detected by the anti-TTC antibodies. This protein was not recognized by 1B7, suggesting that it is a proteolytic breakdown product containing essentially the C-terminal portion of the hybrid protein. Similar results were obtained with *M. smegmatis* (not shown).

**Production of S1-TTC under the control of the *hsp60* promoter.** A second expression system used in this study was driven by the *M. bovis* BCG *hsp60* promoter to produce intracellular S1-TTC via the construction of pBMX. This plasmid had similar characteristics as pEN004, except that the antigen 85 A promoter and signal-peptide coding sequence were replaced by the BCG *hsp60* promoter.



After transformation and selection of recombinant *M. smegmatis* and BCG, cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using the monoclonal antibody 1B7 and the polyclonal anti-TTC antibodies. Using either reagent, an approximately 75-kDa protein was again readily detectable in extracts of BCG containing pBMX (Fig. 2). Similar results were obtained for *M. smegmatis* (not shown). This protein was not present in the BCG control extracts, indicating that the pBMX expression system also yielded an immunoreactive hybrid protein containing both the pertussis toxin and the tetanus toxin antigenic determinants. Expression levels appeared to be significantly higher than in BCG(pEN004) extracts, and several smaller peptides were detected with anti-TTC antibodies in BCG(pBMX) extracts, whereas a single major breakdown product was found in BCG(pEN004) lysates. When compared on a quantitative basis by densitometric scanning of the immunoblots, BCG(pBMX) was found to produce approximately ten-fold more S1-TTC than BCG(pEN004) (approximately 5 ng of S1-TTC/ $\mu$ g total protein versus approximately 0.4 ng S1-TTC/ $\mu$ g total protein). As expected, no extracellular S1-TTC was detected in culture supernatants of BCG(pBMX).

#### **Antibody responses after immunization with BCG(pEN004) or BCG(pBMX).**

Groups of five BALB/c mice were immunized with  $5 \times 10^6$  BCG(pEN004), BCG(pBMX) or non-recombinant control BCG either i. v. or i. p. Two months later, the mice were boosted  $5 \times 10^6$  with of the same BCG strains. At different time intervals after the boost, sera were collected, pooled per group of mice and then tested for the presence of anti-BCG and anti-S1-TTC antibodies by immunoblotting and ELISA. Each group of mice produced anti-BCG antibodies at similar levels (data not shown). However, only those mice that had been immunized i. p. with BCG(pBMX) produced antibodies directed against S1-TTC (Fig. 3). These antibodies did not react with purified S1, suggesting that they were directed against the TTC part of the protein. No such antibodies were found in the sera of mice that were immunized i. p. with BCG(pEN004) or with the control BCG, or those that were immunized i. v. with any strain.

As shown in Fig. 4, the anti-S1-TTC antibody titers of the mice that had received BCG(pBMX) stayed high for at least 26 weeks after the boost. The analysis of the isotype profile indicated that specific anti-S1-TTC IgG1, IgG2a and IgG2b were produced, suggestive of a mixed

antibody response. The antibodies were exclusively directed against the TTC part of the hybrid protein, since no anti-pertussis toxin antibodies were detected by ELISA (not shown).

**IL-2 production after immunization with BCG(pBMX).** The spleens of BALB/c mice immunized and boosted with either BCG(pEN004), BCG(pBMX) or non-recombinant BCG were tested for the secretion of IL-2 using purified S1-TTC for stimulation of the spleen cells. As shown in Fig. 6A, high levels of S1-TTC-specific IL-2 secretion was detected only for spleen cells isolated from mice that were immunized with BCG(pBMX), whereas BCG-specific IL-2 secretion was also detected for cells isolated from non-recombinant BCG-infected mice.

When pertussis toxin was used to stimulate the spleen cells, IL-2 secretion was also detected only when the spleen cells were isolated from mice immunized with BCG(pBMX) (Fig. 6B).

## DISCUSSION

BCG is one of the most widely used vaccines available today and is the only live bacterial vaccine recommended for use in children by the World Health Organisation. Although its efficacy against tuberculosis still remains a matter of considerable debate (10), BCG has a remarkable low incidence of severe side-effects. This makes it one of the most promising bacterial live vectors for the production of heterologous antigens to develop cost-effective vaccines able to protect against several diseases simultaneously. Consequently, several mycobacterial expression systems have been developed over the last few years (2, 21, 27, 37). In some instances protection against challenge has been achieved against the heterologous pathogen when recombinant BCG was given as a vaccine (11, 14, 24, 25). Different laboratories have used different expression systems based on several promoters. The most widely used promoter is that of the *hsp60* gene. However, other promoters have also been used, such as the pAN promoter from *Mycobacterium paratuberculosis* (27) or the promoters of the genes encoding the antigen 85 complex (18, 19). The antigen 85 complex contains several major mycobacterial secreted proteins, named 85A, 85B and 85C. The use of the promoter of the 85B gene controlling the production of the hybrid protein antigen 85B fused to the V3 epitope of the human immunodeficiency virus has led to a recombinant BCG strain that was able to induce protective immune responses in small animals (14). In a comparative study using the same reporter gene, we have recently shown that the 85A promoter is stronger than the 85B promoter (Abomoelak et al., in preparation). The 85A promoter has been used successfully for the expression of several heterologous antigens (5, 19).

In this study, we compared the immunogenicity of recombinant BCG strains producing a PTX-TTX hybrid protein (S1-TTC) under the control of either the *hsp60* promoter or the 85A promoter and signal peptide. The recombinant protein was readily detected in both expression systems. When the chimeric gene was expressed under the control of the *hsp60* promoter, the expression level was approximately ten-fold higher than when the 85A promoter and signal peptide was used. The comparison of the anti-S1-TTC immune responses indicated that only the BCG strain producing the antigen under the control of the *hsp60* promoter induced anti-S1-TTC antibodies. No immune response was detected with the 85A expression system, even after three immunizations.

This finding was somewhat surprising, since, although the *hsp60* promoter induced stronger expression of the foreign gene, the difference with the 85A expression system was only about ten-fold in vitro. However, it may be conceivable that the expression levels are much more divergent in vivo. In *Salmonella* the *hsp* gene is induced in vivo (8). When chromosome borne, the BCG *hsp60* promoter is also induced by stress, however, this regulation is apparently lost when the *hsp60* promoter is plasmid borne (37). Although there is no evidence yet that the antigen 85 complex genes are regulated in vivo, mice or humans infected by *M. tuberculosis* show a strong immune response against the antigen 85 complex (16), indicating that these proteins are produced in vivo.

Another difference between the two expression systems described here is the presence of the signal peptide in the 85A system. Although this system has been shown to allow for secretion of recombinant proteins (5, 19) no S1-TTC was found in the culture supernatant of the recombinant BCG strains. It is most likely that this is due to the relatively large size (75 kDa) of the antigen compared to successfully antigens secreted in the previous studies. Indeed, progressive shortening of the S1-TTC hybrid protein by the 3' truncation of its gene gradually increased its secretion efficiency (A. Baulard, L. K., & C. L., unpublished). Nevertheless it can be assumed that in the 85A expression system S1-TTC is located at the external site of the membrane, since the estimated size is consistent with that of the mature protein after removal of the signal peptide. Because of its relatively large size, the antigen is probably trapped in the cell wall. Despite, no anti-S1-TTC antibodies were elicited with this recombinant strain, although others have shown that secretion of the foreign antigen by recombinant BCG may increase its immune response. We are currently constructing new vectors combining the *hsp60* promoter with the 85A signal peptide coding region in an effort to distinguish between the role of secretion or *hsp60*-dependent expression in the induction of antibody responses against S1-TTC.

Anti-S1-TTC antibody titers remained high for at least six months after immunization with the recombinant BCG producing the antigen under the control of the *hsp60* promoter. Isotyping indicated that the mice produced IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies, suggestive of a mixed response. These antibodies, however, were mostly directed against the TTC part of the molecule, since no antibodies reactive against PTX were detected in the mouse sera. Instead, the mice immunized with this recombinant BCG strain mounted a weak but significant cellular immune response against PTX,

as evidenced by the secretion of antigen-specific IL-2. This finding is particularly interesting with respect to the development of a combined vaccine against tetanus and pertussis, since, although a good correlation exists between anti-TTX antibody levels and protection against tetanus in humans, such correlation has not been found in the case of pertussis. Instead, recent evidence strongly suggests that the mechanism of protective immunity against pertussis in mice involves mainly IL-2 secreting T cells (26). In addition, Th1 CD4<sup>+</sup> cells probably also play a major role in protective immunity in humans, since convalescent whooping cough patients produce *B. pertussis*-specific T cells that secrete high levels of IFN $\gamma$  and IL-2, but very little IL-5 or IL-4 (30, 31), and it is well known that infection with *B. pertussis* provides better and longer lasting protection against whooping cough than vaccination. Since immunization with recombinant BCG producing S1-TTC induces anti-TTX antibodies and anti-PTX-specific T cells of the Th1 subpopulation, this may constitute a promising approach for the development of a novel, effective and safe combined vaccine against tetanus and whooping cough, affordable even for the developing world.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. and Y. Sato for antibodies and A. Baulard for helpful discussion at the initial state of the project. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

1. **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* **i**: 955-960. (Erratum, *Lancet* **i**: 1238).
2. **Aldovini, A., and R. A. Young.** 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* **351**: 479-482.
3. **Bass, J. W., and S. R. Stephenson.** 1987. The return of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**: 141-144.
4. **Baulard, A., C. Jourdan, A. Mercenier, and C. Locht.** 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electrotransformation between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4105.
5. **Baulard, A., L. Kremer, P. Supply, D. Vidaud, J.-M. Bidart, D. Bellet, and C. Locht.** 1996. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. *Gene* **176**: 149-154.
6. **Bloom, B. R., S. B. Snapper, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr.** 1990. Development of recombinant BCG vaccines. *Semin. Virol.* **1**: 21-.
7. **Boucher, P., H. Sato, Y. Sato, and C. Locht.** 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.
8. **Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**: 730-732.

9. **Cody, C. L., L. J. Baraff, J. D. Cherry, S. M. Marcy, and C. R. Manclark.** 1981. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. *Pediatrics* **68**: 650-660.
10. **Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Durdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller.** 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *J. Am. Med. Assoc.* **271**: 698-702.
11. **Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. McMaster, B. R. Bloom, and D. G. Russell.** 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11473-11477.
12. **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.
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. **Honda, M., K. Matsuo, T. Nakasone, Y. Okamoto, H. Yoshizaki, K. Kitamura, W. Sugiura, K. Watanabe, Y. Fukushima, S. Haga, Y. Katsura, H. Tasaka, K. Komuro, T. Yamada, T. Asano, A. Yamazaki, and S. Yamazaki.** 1995. Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble protein from a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10693-10697.

15. Huygen, K., E. Lozes, B. Gilles, A. Drowart, K. Palfliet, F. Jurion, I. Roland, M. Art, M. Dufaux, J. Nyabenda, J. De Bruyn, J.-P. van Vooren, and R. De Leys. 1994. Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* **62**: 363-370.
16. Huygen, K., J. P. van Vooren, M. Turneer, R. Bosmans, P. Diercks, and J. De Bruyn. 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* **27**: 187-194.
17. Jenkinson, D. 1988. Duration of effectiveness of pertussis vaccine : evidence from a 10 year community study. *Br. Med. J.* **296**: 612-614.
18. Kazuhiro, M., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, M. Totsuka, K. Kobayashi, H. Yukitake, and T. Yamada. 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**: 4049-4054.
19. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht. 1995a. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* **177**: 642-653.
20. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Locht. 1995b. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 913-922.
21. Kremer L., G. Riveau, A. Baulard, A. Capron, and C. Locht. 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* producing the *Schistosoma mansoni* Glutathione S-transferase. *J. Immunol.* **156**: 4309-4317.



22. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
23. **Lambert, H. J.** 1965. Epidemiology of a small pertussis outbreak in Kent County, Michigan. *Public Health Rep.* **80**: 365.
24. **Langermann, S., S. R. Palaszynski, J. E. Burlein, S. Koenig, M. S. Hanson, D. E. Briles, and C. K. Stover.** 1994. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* **180**: 2277-2286.
25. **Langermann, S. S. R. Palaszynski, A. Sadziene, C. K. Stover, and S. Koenig.** 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing an outer-surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **372**: 552-555.
26. **Mills, K. H. G., A. Barnard, J. Watkins, and K. Redhead.** 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.
27. **Murray, A., N. Winter, M. Lagranderie, D. F. Hill, J. Rauzier, J. Timm, C. Leclerc, K. M. Moriarty, M. Gheorghiu, and B. Gicquel.** 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.* **6**: 3331-3342.
28. **Peppoloni, S., L. Nencioni, A. Di Tommaso, A. Tagliabue, P. Parronchi, S. Romagnani, R. Rappuoli, and T. De Magistris.** 1991. Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **59**: 3768-3773.

29. Plotkin, S. A., and E. A. Mortimer Jr. (eds.). 1994. Vaccines. Philadelphia : WB Saunders 1-996.
30. Ryan, M., L. Gothefors, J. Storsaeter, and K. H. G. Mills. 1996. *B. pertussis*-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. Dev. Biol. Stand. **89**: 251-259.
31. Ryan, M., G. Murphy, L. Gothefors, L. Nilsson, J. Storsaeter, and K. H. G. Mills. 1997. *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 Th cells. J. Infect. Dis. in press.
32. Sambroock, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
33. Sato, H., and Y. Sato. 1990. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. Infect. Immun. **58**: 3369-3374.
34. Sato, H., A. Ito, J. Chiba, and Y. Sato. 1984. Monoclonal antibody against pertussis toxin : effect on toxin activity and pertussis infections. Infect. Immun. **46**: 422-428.
35. Sato, Y., M. Kimura, and H. Fukumi. 1984. Development of a pertussis component in Japan. Lancet **i**: 122-126.
36. Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. **4**: 1911-1919.

37. Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)* **351**: 456-460.

## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Schematic representation of pEN004 and pBMX. The relevant features of pEN004 (A) and pBMX (B) shown are the following. The mycobacterial and *E. coli* origins of replication are indicated by the black boxes ori myco and ColE1, respectively. The kanamycin-resistance gene is indicated by the stippled arrow labelled Km<sup>R</sup>. The black boxes *hsp60* and 85A denote the *hsp60* promoter and the antigen 85A promoter and signal peptide coding sequence, respectively. The grey boxes correspond to the S1-TTC-coding sequence.

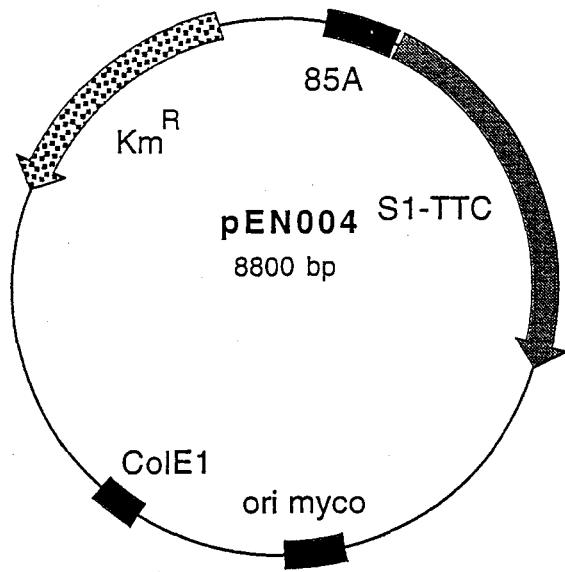
FIG. 2. Immunoblot analysis of recombinant BCG(pEN004) and BCG(pBMX). Recombinant BCG(pEN004) (panel A, lanes 3-5) and BCG(pBMX) (panel B, lanes 2 and 3) were analyzed using anti-S1 monoclonal antibody 1B7 (panel A, lanes 1-4; and panel B, lane 3) and anti-TTC polyclonal antibodies (panel A, lane 5; and panel B, lane 2). Both whole cell extracts (panel A, lanes 4 and 5; and panel B, lanes 1-3) and culture supernatant (panel A, lane 3) were analyzed. Lanes 1 contain whole cell extracts and panel A, lane 2 contains culture supernatant of non-recombinant BCG as a control. The sizes of the molecular weight markers are given in the right margins.

FIG. 3. Immunoblot analysis of serum of mice immunized with BCG(pBMX). Ten weeks after the first immunization the serum of mice immunized with BCG(pBMX) (lanes 2 and 3) or with non-recombinant BCG (lane 1) was analyzed by immunoblotting using purified S1-TTC (lanes 1 and 3) or rS1d (lane 2) as antigens. Lane 4 contains the molecular weight markers, the sizes of which are given in the right margin.

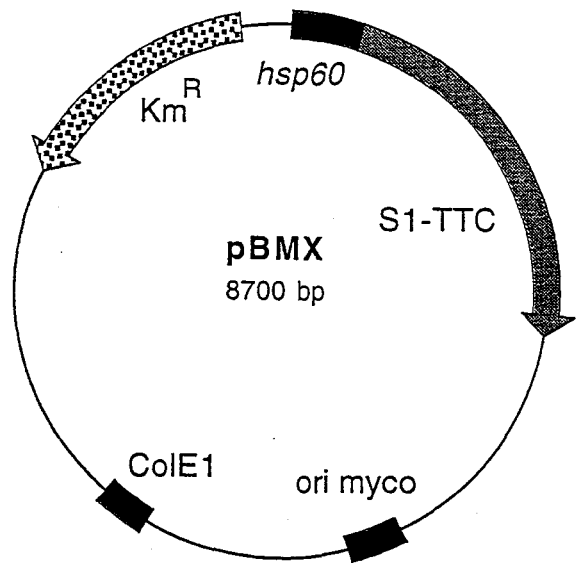
FIG. 4. Kinetics of anti-S1-TTC antibody titers of mice immunized with BCG(pBMX). The total anti-S1-TTC IgG titers of mice immunized with BCG(pBMX) were determined at 0, 10, 14, 18 and 26 weeks after the first immunization, as indicated. The titers correspond to the reciprocal of the highest serum dilution giving optical density values that are at least three fold over background levels.

FIG. 5. Isotype profile of anti-S1-TTC antibodies of mice immunized with BCG(pBMX). Pooled sera of mice immunized with BCG(pBMX) were analyzed for their anti-S1-TTC IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 titers. The titers were estimated 18 weeks after the first immunization and correspond to the reciprocal of the highest serum dilution giving optical density values that are at least three fold over background levels.

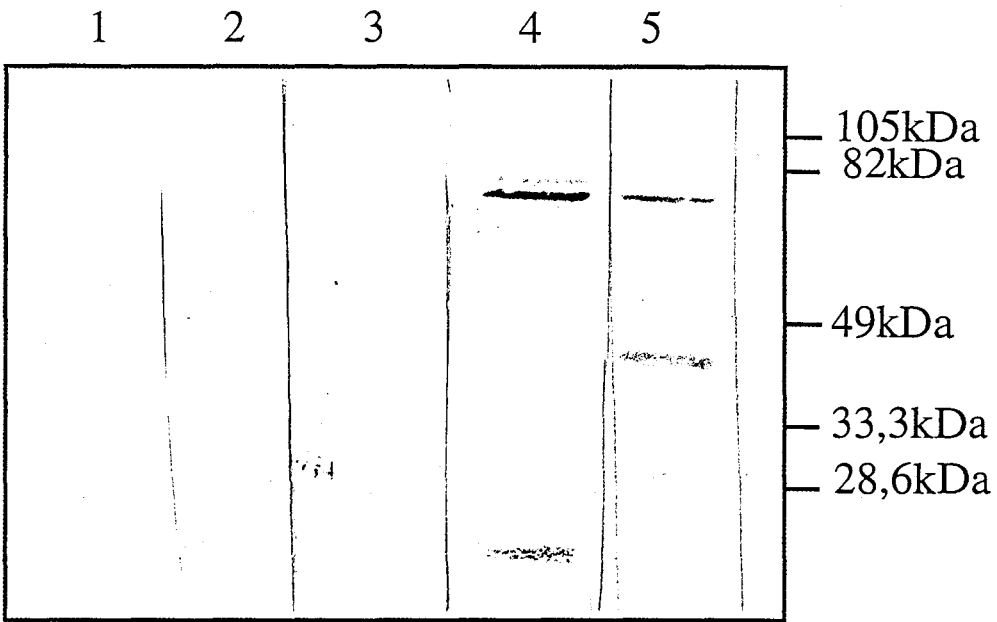
FIG. 6. Antigen-specific IL-2 production in mice immunized with BCG(pBMX). The IL-2 content in culture supernatants of splenocytes isolated from mice immunized with non-recombinant BCG (left) or BCG(pBMX) (right) was estimated as described in Materials and Methods either after stimulation with purified S1-TTC (panel A) or with PTX (panel B).



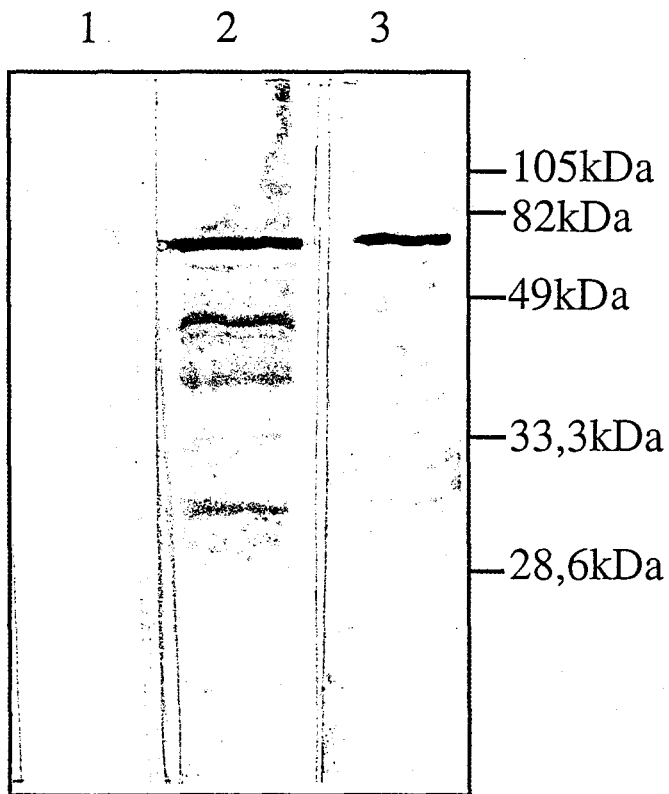
(A)



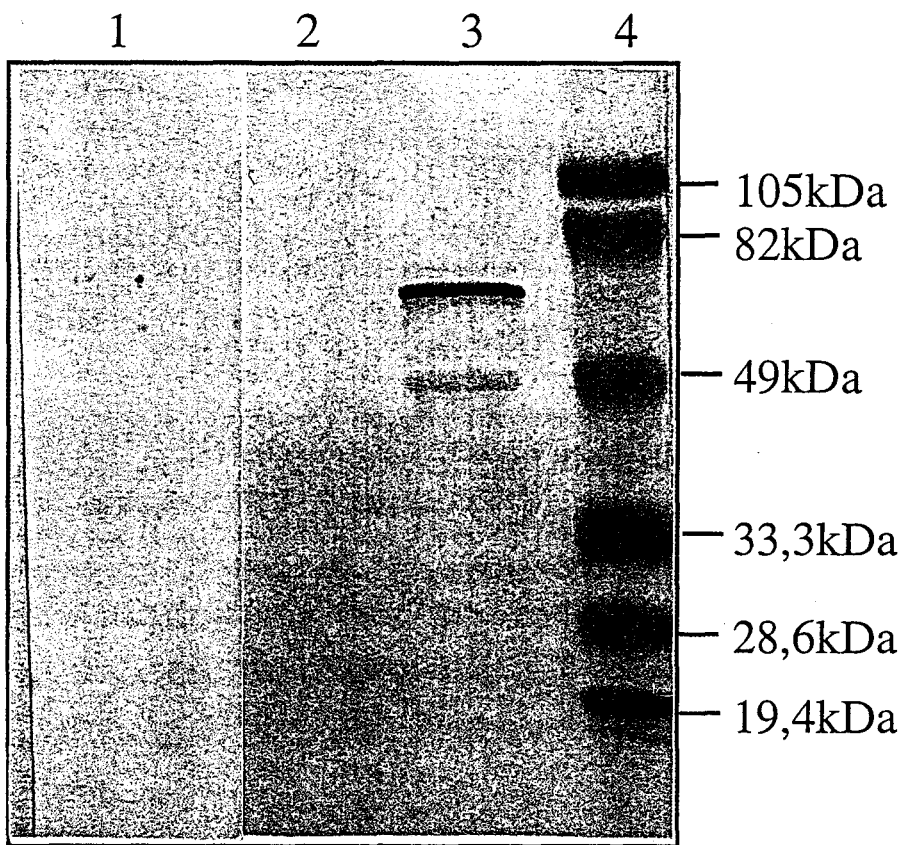
(B)



(A)

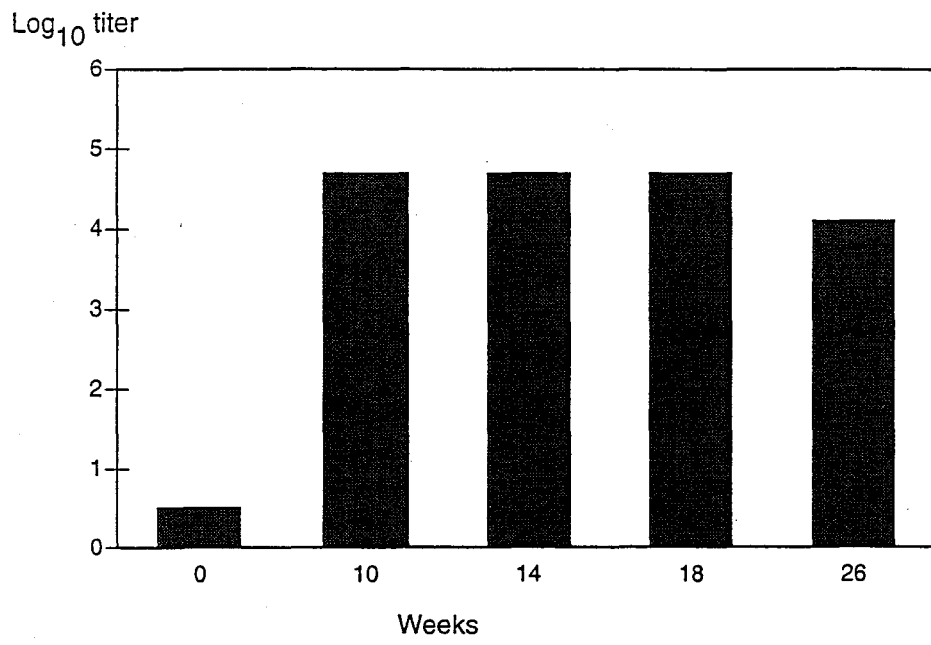


(B)



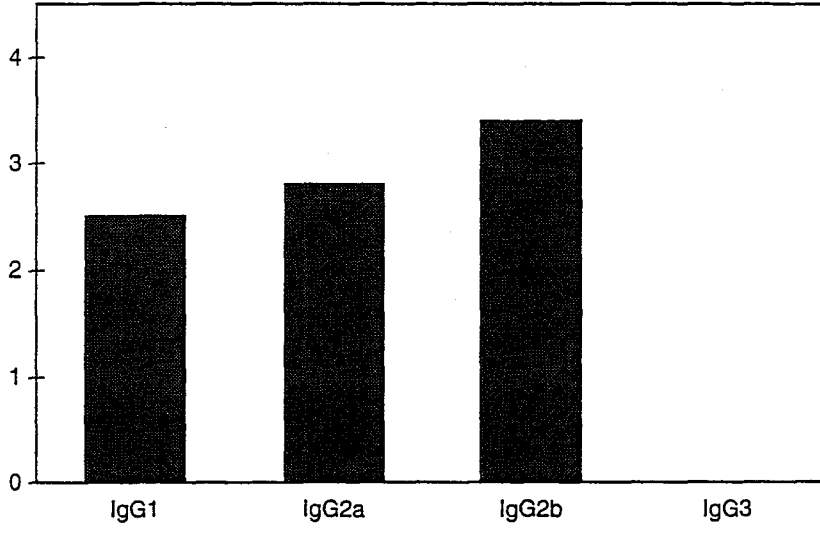


(A)



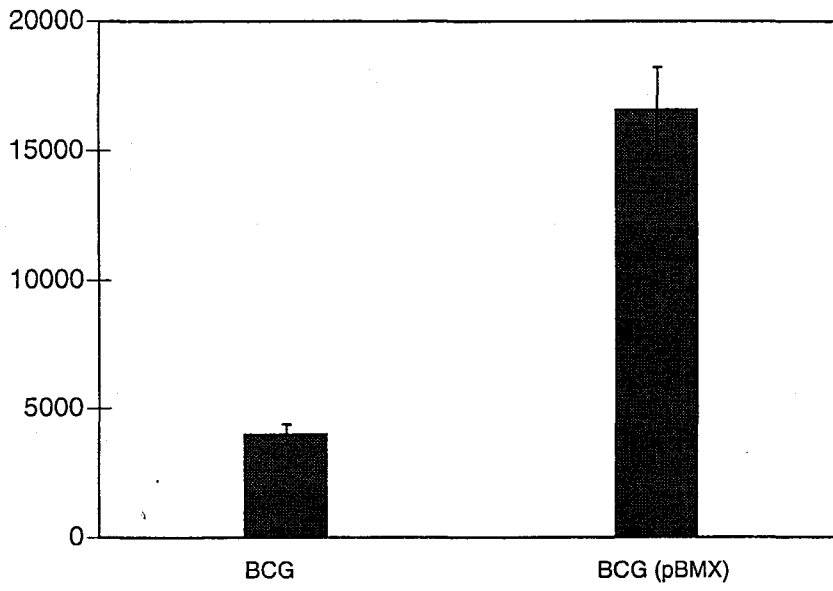
(B)

Log<sub>10</sub> titer



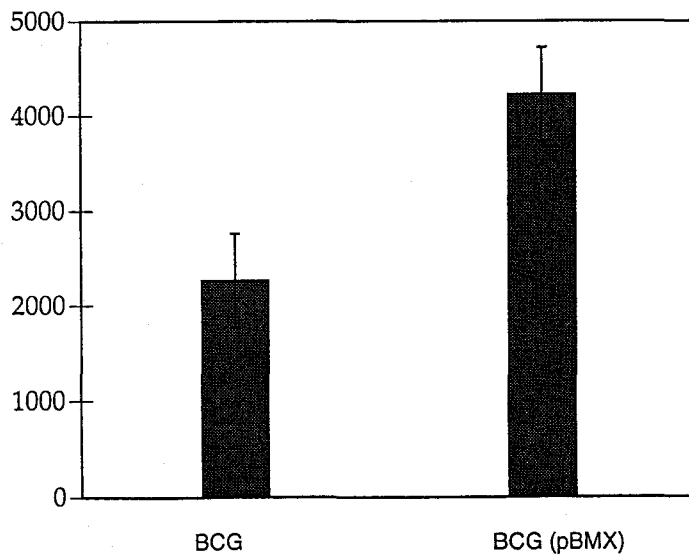
(A)

IL-2 cpm



(B)

IL-2 cpm



## Article II. Construction of a chimeric protein containing pertussis, tetanus and diphtheria protective epitopes and expression in *Mycobacterium bovis* BCG

Comme décrit dans le premier chapitre de cette thèse, il a été possible de construire une protéine hybride contenant la sous-unité S1 de la toxine de pertussis fusionnée au fragment C de la toxine tétanique et il a été possible d'exprimer cet antigène chez le BCG. Dans la continuation de notre effort de combiner les antigènes protecteurs des trois maladies coqueluche, tétanos et diphtérie, nous avons entrepris la construction d'une protéine chimérique à trois domaines antigéniques. Bien que certains anticorps dirigés contre la sous-unité A de la toxine diphtérique peuvent avoir une activité neutralisante, la plupart des anticorps neutralisants et protecteurs sont dirigés contre la sous-unité B de la toxine. Cette sous-unité comporte deux domaines, un domaine de translocation et un domaine de liaison au récepteur (Choe *et al.*, 1992). A l'instar de beaucoup d'autres toxines de structure semblable, ce dernier domaine semble être le plus intéressant pour induire une immunoprotection.

Au départ de la construction permettant d'obtenir S1-TTC, nous avons donc fusionné le gène codant la partie C-terminale de la sous-unité B de la toxine diphtérique en région 3' du gène codant S1-TTC. Le codon stop de la première construction a été remplacé par un site de restriction permettant d'insérer en phase l'ADN codant le fragment de la toxine diphtérique. Ce gène chimérique, placé sous le contrôle du promoteur inductible P<sub>lac</sub> a été introduit chez *E. coli*. Après induction, la souche recombinante produisait une nouvelle protéine d'environ 115 kDa. Cette protéine était reconnue par des anticorps monoclonaux anti-toxine de pertussis, ainsi que par des anticorps polyclonaux anti-toxine tétanique et anti-toxine diphtérique. Ces résultats montrent que cette souche d'*E. coli* est capable de produire un antigène chimérique contenant des epitopes des trois toxines. Un fractionnement cellulaire par centrifugation a montré que la protéine chimérique était soluble. En plus de la protéine de 115 kDa, plusieurs polypeptides de plus petite taille ont été observés. Il s'agit sans doute de produits de dégradation. Ces peptides étaient présents malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans le tampon de lyse, suggérant que la dégradation a lieu au sein de la bactérie. Cependant, l'utilisation de souches déficientes en protéases n'a pas permis d'augmenter la stabilité de la protéine.

Le gène codant cette protéine chimérique a ensuite été cloné en aval du promoteur *hsp60* mycobactérien. Le choix de ce promoteur était basé sur l'étude décrite dans le chapitre précédant et montrant qu'une souche de BCG produisant S1-TTC sous le contrôle de ce promoteur était capable d'induire une réponse cellulaire et humorale contre l'antigène, alors qu'une souche de BCG produisant le même antigène sous le contrôle du promoteur de l'antigène 85A n'induisait pas de réponse immune spécifique détectable. Les analyses par immunoempreinte ont montré que la souche de BCG ainsi construite produisait également une protéine d'environ 115 kDa, reconnue par les anticorps anti-toxine de *B. pertussis*, anti-toxine tétanique et anti-toxine diphtérique. Il était intéressant de remarquer que le nombre de produits de dégradation était plus faible chez le BCG que chez *E. coli*. Un produit de dégradation majeur d'environ 80 kDa était reconnu par les anticorps anti-toxine tétanique et anti-toxine de *B. pertussis*, suggérant une région sensible aux protéases entre le domaine S1-TTC et le domaine de la sous-unité B de la toxine diphtérique.

Ce travail constitue un premier pas vers la construction d'une souche de BCG recombinant capable de protéger à la fois contre le tétanos, la coqueluche et la diphtérie.

Construction of a chimeric protein containing pertussis, tetanus and diphtheria protective epitopes and expression in *Mycobacterium bovis* BCG

Bassam Abomoelak, Laurent Kremer, and Camille Locht\*.

Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France.

\* Corresponding author :   Tel. (+33) 3 20.87.11.51  
  Fax (+33) 3 20.87.79.06  
  e-mail : camille.locht@pasteur-lille.fr

The development of cost-effective combined vaccines able to protect against different diseases simultaneously is one of the most important goals in modern vaccine research. The definition of protective antigens against tetanus, pertussis and diphtheria has prompted us to construct a chimeric protein composed of the protective moieties of each of the toxins responsible for these diseases. This protein therefore contains a genetically inactivated form of the pertussis toxin S1 subunit, fused to the eukaryotic cell-binding domains of tetanus toxin and diphtheria toxin. The hybrid antigen was produced in *Escherichia coli* and found to be reactive with protective antibodies directed against all three toxins. Cell fractionation experiments indicated that the protein was at large soluble at neutral pH. The same protein was also produced in *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strain with the long term goal of developing a recombinant live vaccine able to protect against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis simultaneously.

The development of combined vaccines is one of the high priorities in modern vaccine research<sup>1</sup>. Some of the most successful combined vaccines in use today are those protecting simultaneously against diphtheria, pertussis and tetanus (DPT). However, especially in the developing world, these diseases remain a major problem with unacceptable morbidity and mortality rates<sup>2</sup>. Furthermore, in recent years concern over the reactogenicity of DPT vaccines has risen, and in several industrialised countries general vaccination was discontinued. Most of the adverse reactions were attributed to the pertussis components in the DPT vaccines<sup>3</sup>.

Most currently available DPT vaccines consist of partially purified and toxoïded tetanus toxin (TTX) and diphtheria toxin (DTX), and a whole-cell pertussis component. Whereas considerable scientific and clinical evidence has since long established that toxoïded TTX and DTX are protective against tetanus and diphtheria, the protective antigens in the pertussis component have only recently been identified. This has permitted to develop new efficacious and safer acellular pertussis vaccines<sup>4-7</sup>. Several different acellular pertussis vaccines have been developed over the past ten years, differing essentially in their antigen composition. Among the different antigens toxoïded pertussis toxin (PTX) is the only common antigen present in all acellular vaccine versions. So far, PTX is the only single antigen that has been shown to be immunoprotective in children as well as in mice<sup>4, 7, 8</sup>. However, the production cost of these new generation DPT vaccines is significantly higher than that of the previous vaccines, which might hamper global childhood vaccination programs in third world countries. In addition, the new vaccines still require repeated doses for optimal protection.

In an effort to simplify DTP vaccines, we describe here the construction of a chimeric protein containing the protective epitopes of PTX, TTX and DTX, and the production of this hybrid antigen in *Mycobacterium bovis* BCG. BCG has been used over several decades as a live vaccine for the prevention of tuberculosis. Although its efficacy against tuberculosis is questioned<sup>9</sup>, its use has a remarkable low incidence of severe side-effects. Among the various advantages of BCG are its inherent adjuvant properties, its low production cost, and the possibility of administration as a single dose at birth. This has prompted several laboratories to develop heterologous expression systems for the construction of BCG strains that produce foreign protective antigens<sup>10-13</sup>. The expression in BCG of a gene encoding the TTX-PTX-DTX hybrid protein may thus constitute a first step



towards the development of a combined live attenuated vaccine against pertussis, tetanus, diphtheria and tuberculosis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and growth conditions**

All cloning steps were performed in *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene, La Jolla, CA.). The production of the hybrid protein was carried out in *E. coli* TG1 (Amersham, Les Ulis, France) and in *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2). *E. coli* was grown in LB broth<sup>14</sup> and BCG was grown in Sauton medium<sup>15</sup>. Electrocompetent BCG were prepared by growing the mycobacteria in 150 ml Sauton medium to mid-log phase. After centrifugation at 4,500 x g for 15 minutes, the pellet was suspended in 150 ml of 10% glycerol. The cells were washed three times with 10% glycerol in decreasing volumes, ranging from 150 ml, over 50 ml to 10 ml, and finally resuspended in 3 ml of 10% glycerol. The cells were then aliquoted and frozen at -80°C until further use. For electroporation of the electro-competent BCG the DNA was mixed with 50 µl of cell suspension, and pulsed with a Cellject electroporator (Eurogenetec, Liège, Belgium) at 2,500 V, 412 Ohm and 40 µF. After electroporation, the cells were suspended in 1 ml of Sauton medium, incubated for 1 hour at 37°C and then plated onto Middlebrook 7H10 medium supplemented with ADC enrichment (Difco, Detroit, MI) and containing 0,01% cyclohexamide and 20 µl/ml kanamycin. The plates were then incubated at 37°C for 15 to 20 days.

### **Plasmids and DNA manipulation**

The cloning vectors pUC18 and pUC19 were purchased from New England Biolabs (Beverly, Mass.). pKKB6, harbouring the gene encoding the B fragment of DTX<sup>16</sup>, was a kind gift from V. Cabiaux (Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium). Vector pS1-tC was described previously<sup>17</sup>. pUChspK was described elsewhere (Abomoelak et al., in preparation), and pRR3ΔKan was developed by Kremer et al.<sup>18</sup>. Restriction enzymes, Taq DNA polymerase and calf intestinal alkaline phosphatase were purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Klenow fragment and other modifying enzymes were from BRL (Gaithersburg, MD).

All DNA manipulations were carried out using standard protocols as described by Sambrook et al.<sup>14</sup>. The synthetic oligonucleotides PI and PII had the following sequence : 5'-CTTCTGGGGAAACCCTTTACGATATG-3' and 5'-CTTGGCTGCAGTCATGAACATATCAATCTGCCATGGCATTGTCCATCC-3', containing a *Nco*I site (underlined), respectively.

### Immunoblot analyses

To prepare *E. coli* cell extracts, the recombinant strain was grown in 50 ml LB broth containing 100 µg/ml ampicillin. At a density of 0.5 OD<sub>550</sub>, and expression was induced by the addition of isopropylthio-β-D-galactopyranoside at 2 mM final concentration. After 4h30 incubation at 37°C, the cells were harvested by centrifugation, resuspended in 4 ml of lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5); 25 mM NaCl; 1 mM EDTA) containing 2 µg/ml of aprotinin and leupeptin (Sigma, St. Louis, Mo), and lysed by sonication for three times two min. The lysate was then centrifuged at 25,000 x g for 45 min. at 4°C. The supernatant containing the soluble proteins was recovered, and the total protein content was estimated using the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Europe, the Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

Cell extracts of the BCG strain were prepared as follows. Ten-milliliters of each BCG culture was grown in Sauton medium containing 25 µg/ml kanamycin and harvested at mid-log phase. The cells were centrifuged and resuspended in 1.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 0.15 NaCl), and disrupted for 10 min. with a Branson Sonifier 450 at half-maximal constant output.

The crude BCG extract or the *E. coli* extracts were separated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate using a 10% polyacrylamide gel as described by Laemmli<sup>19</sup>. After electrophoresis, proteins were transferred onto a Hybond-C Extra membrane (Amersham, Les Ulis, France). The membrane was then saturated with 5% dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20. The antibodies, kindly provided by H. Sato (JNIH, Tokyo, Japan) and used for the detection of the recombinant protein were a monoclonal antibody 1B7 directed against S1 subunit<sup>20</sup>, rabbit polyclonal antibodies against TTX fragment C (TTC) at 1/10,000, and mouse polyclonal antibodies against DTX at 1/10,000. Goat anti-mouse alkaline phosphatase-

conjugated antibodies and goat anti-rabbit alkaline-phosphatase-conjugated antibodies were purchased from Promega (Madison, Wis), and used to detect the anti-PTX (monoclonal antibody 1B7) and anti-DTX antibodies, and the anti-TTC antibodies, respectively.

## RESULTS

### Rationale for the construction of the chimeric protein

TTX is a ca. 150-kDa protein composed of a light chain (ca. 50 kDa) and a heavy chain (ca. 100 kDa), that remain linked by a disulfide bond. Treatment of TTX by papain results in the cleavage of the heavy chain into the free C-terminal fragment, named fragment C (TTC), and the N-terminal fragment bound to the light chain (fragment A-B)<sup>21</sup>. Previous work by Fairweather et al.<sup>22</sup> has indicated that recombinant TTC is immunoprotective against tetanus in mice. This fragment may therefore be a good candidate for the development of a simplified tetanus vaccine. PTX is an even more complex molecule composed of five different subunits, named S1 through S5, according to their decreasing molecular weight<sup>23, 24</sup>. Monoclonal antibodies against S1, the enzymatically active subunit, have been shown provide protection in mice against *Bordetella pertussis* challenge<sup>20</sup>. In addition, we have previously found that immunisation with a hybrid protein composed of a truncated, soluble S1 peptide genetically fused to TTC induces protection against tetanus, as well as neutralising and protective antibodies against pertussis<sup>17</sup>. DTX is composed of two subunits. Subunit A expresses enzymatic activity and subunit B (DTB) contains the receptor-binding and translocation domains<sup>25</sup>. There is evidence that DTB is the protective moiety of this toxin<sup>26</sup>.

We therefore constructed a hybrid molecule that contains at its amino-terminal end the truncated, soluble form of S1, named rS1d, followed by TTC and ending with DTB at its carboxyl-terminal end. However, in order to avoid the construction of a potential new toxin through the combination of the enzymatic subunit of PTX with the receptor-binding subunits of the other toxins, an enzymatically inactive mutant S1 subunit gene was used. This gene contains therefore an alteration of the codon Glu-129, an important catalytic residue of PTX<sup>27</sup>.

### **Construction and expression of the chimeric protein in *E. coli***

To construct the chimeric protein a 600-bp DNA fragment was first amplified by PCR using primers PI and PII and pS1-tC as template. The amplified fragment was then digested with *NcoI* and *NsiI*, resulting in a 160-bp fragment. pKKB6 was digested with *NcoI* and *HindIII*, and a 2.5-kb fragment was purified after agarose-gel electrophoresis. pS1-tC was then digested with *NsiI* and *HindIII* giving rise to a 4.4-kb fragment. The three fragments of 160 bp, 2.5 kb and 4.4 kb, respectively, were ligated together in a three-way ligation to give rise to pPTD (Fig. 1).

*E. coli* TG1(pPTD) were grown in LB broth, and the production of the chimeric protein was induced by the addition of isopropylthio- $\beta$ -D-galactopyranoside. The cells were lysed by sonication, and the lysate was centrifuged to separate the soluble proteins from the cellular debris. The soluble proteins were then analysed by immunoblotting using the various anti-toxin antibodies described in Materials and Methods. As shown in Fig. 2, *E. coli*(pPTD) produced a specific protein of approximately 115 kDa that was recognised by the anti-PTX monoclonal antibody 1B7 and by the anti-DTX and anti-TTC polyclonal antibodies. This protein was not found in the *E. coli* control strain. Since the size of this protein corresponds to the calculated molecular weight, these results indicate that *E. coli*(pPTD) produces the expected hybrid protein containing PTX, TTX and DTX epitopes, and that the protein was soluble. In addition to the 115-kDa protein, several smaller polypeptides reactive with the different anti-toxin antibodies were also present in the *E. coli*(pPTD) lysate, suggesting that the protein had undergone proteolytic degradation. Since this degradation was detected even in the presence of protease inhibitors in the cell lysates, it is likely that it occurred within the *E. coli* cells. We therefore attempted to express the hybrid gene in various protease-deficient strains. However, no improvement of protein stability was evident when these strains were used (not shown).

### **Construction and expression of chimeric protein in BCG**

A 1.7-kb fragment corresponding to the kanamycin resistance gene ( $Km^R$ ) and *hsp60* promoter of BCG was obtained by digesting pUChspK with *NcoI* and *SalI*. This fragment was then treated with Klenow enzyme and ligated into the unique *SmaI* site of pPTD. The resulting vector,

named pBM03, was digested with *Xba*I, blunt-ended with Klenow and then ligated into the unique *Sca*I site of pRR3ΔKan, yielding pBM001 (Fig. 3). This plasmid was used to transform BCG.

BCG(pBM001) was grown in Sauton medium containing 25 µg/ml kanamycin for two weeks. The cells were then harvested by centrifugation and lysed by sonication. The BCG sonicates were analysed by immunoblotting using the three anti-toxin antibodies described above. As shown in Fig. 4, the approximately 115-kDa protein reactive with all three antibodies was again readily detectable in extracts of BCG(pBM001), whereas it was not present in the control BCG extracts, indicating that BCG(pBM001) produced the hybrid protein containing the PTX, TTX and DTX epitopes. Again, several smaller polypeptides were also detected, suggesting proteolytic breakdown. Interestingly, the major breakdown product of approximately 80 kDa recognised by the anti-S1 1B7 monoclonal antibody was also recognised by the anti-TTX antibodies, whereas it was not recognised by the anti-DTX antibodies, suggesting the presence of a major cleavage site at the junction of the TTC and DTB domains.

## DISCUSSION

The definition and formulation of protective antigens are among the most challenging tasks in vaccine research. As more and more vaccines are being developed, the combination of different vaccines in a single formulation becomes increasingly important for a global strategy of childhood vaccination<sup>1</sup>. In many bacterial diseases toxins play a central role in pathogenesis, as well as in immunoprotection. TTX and DTX have long been known to be the protective antigens against tetanus and diphtheria, respectively. More recently, it has become clear that PTX also is the major protective antigen against pertussis<sup>4, 7</sup>. Originally based on the concept of pertussis as a toxin-mediated disease<sup>28</sup>, PTX has been tested and shown to provide protection both in the mouse model<sup>20</sup> and in children<sup>4, 7</sup>. Current DPT vaccines consist of partially purified DTX, partially purified TTX and whole cell preparations of *B. pertussis*. In the new generation vaccines, the whole cell preparations are replaced by highly purified protective antigens, the most important of which being PTX. With the definition of the protective antigens, and the protective domains within these

antigens, it becomes now possible to combine them into a single molecule, using recombinant DNA technology.

Several hybrid proteins consisting of pair-wise combinations of toxin fragments have previously been constructed. Barbieri et al.<sup>29</sup> have fused the soluble portion of the S1 subunit of PTX to the A subunit of DTX. These two subunits are the enzymatic ADP-ribosyltransferase moieties of the respective toxins, and the hybrid protein was found to retain ADP-ribosyltransferase activity, although it expressed no cytotoxicity. Immunization with this protein resulted in the production of toxin-neutralising antibodies. Although this protein was reported to provide also some protection against challenge with DTX in guinea pigs, more recent studies suggest that most of the protective epitopes of DTX are in the B subunit<sup>26</sup>. A hybrid protein containing the B subunit of DTX fused to TTC has been constructed by Gomez-Duarte et al.<sup>30</sup> and produced in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. We have previously fused the soluble portion of S1 to TTC and found this protein to provide protection against TTX and *B. pertussis* challenge<sup>17</sup>. In addition, it was able to elicit toxin-neutralising antibodies in both guinea pigs and mice. Similar results were obtained by Barry et al.<sup>31</sup> after intranasal or parenteral immunization with the *S. typhi* CVD 908 vaccine strain producing a different version of the S1-TTC hybrid protein.

Altogether these studies have shown that protective and toxin-neutralising antibodies can be elicited with hybrid proteins containing S1, TTC, and/or DTB. In this study we constructed for the first time a chimeric molecule that contains the protective domains of all three toxins. This composite antigen was first produced in *E. coli*. Since the protein was for a substantial fraction found to be soluble, this recombinant *E. coli* strain may be a valuable single source of the antigen containing protective epitopes of three different toxins, the obtaining of which previously required three different bacterial cultures and purification schemes.

As a first step towards the ultimate goal to develop a live DPT vaccine, we also expressed the hybrid gene in a BCG vaccine strain. BCG was chosen because it has been very widely used for the prevention of tuberculosis. Even though its protective efficacy against tuberculosis has been questioned<sup>9</sup>, BCG has several advantages as a live vehicle for foreign antigen delivery. They include built-in adjuvanticity, low production cost, very good safety records and the possibility of administration at birth. In addition to these advantages, BCG can be administered by mucosal routes

as well as by parenteral routes. Several recent studies have indicated that mucosal administration of recombinant BCG is able to elicit strong immune responses against heterologous antigens (L.K., in preparation)<sup>32, 33</sup>. Future studies will show which administration route of the recombinant BCG strain developed in this study is best to elicit optimal immune responses against the three toxins, with the long term goal of a multivalent vaccine to protect simultaneously against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis, preferentially by a mucosal route.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. H. Sato for antibodies and Dr. V. Cabiliaux for pKK.B6. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

- 1 Rappuoli, R., Locht, C., Poolman, J., André, F. and Dougan, G. New Vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine* 1996, **14**, 691-700
- 2 Plotkin, S. A. and Mortimer E. A. Jr. (eds.) *Vaccines*. Philadelphia : WB Saunders, 1994, 1 - 996
- 3 Cherry, J. D. Pertussis : the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine* 1992, **10**, 1033-1038
- 4 Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden - protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **i**, 955-960 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)

- 5 Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A. E., Anemona, A., Ciofi degli Atti, M. L., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W. C., Klein, D. L., Wassilak, S. G. F. and the Progetto Pertosse Working Group. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N. Engl. J. Med.* 1996, **334**, 341-348
- 6 Gustafsson, L., Hallander, H. O., Olin, P., Reizenstein, E. and Storsaeter, J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* 1996, **334**, 349-355
- 7 Sato, Y., Kimura, M. and Fukumi, H. Development of a pertussis component in Japan. *Lancet* 1984, **i**, 122-126
- 8 Sato, H. and Sato, Y. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* 1990, **58**, 3369-3374
- 9 Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Durdick, E., Fineberg, H. V. and Mosteller, F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis : meta-analysis of the published literature. *J. Am. Med. Assoc.* 1994, **271**, 698-702
- 10 Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R. Jr. and Bloom, B. R. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991, **351**, 456-460
- 11 N. Winter, Lagranderie, M., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Guy, B., Kieny, M. P., Gheorghiu, M. and Gicquel, B. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG : induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* 1991, **109**, 47-54



- 12 Kameoka, M., Nishino, Y., Matsuo, K., Ohara, N., Kimura, T., Yamazaki, A., Yamada, T. and Ikuta, K. Cytotoxic T lymphocyte response in mice induced by recombinant BCG vaccination which produces an extracellular alpha antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. *Vaccine* 1994, **12**, 153-158
- 13 Kremer L., Riveau, G., Baulard, A., Capron, A. and Loch, C. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* Glutathione S-transferase. *J. Immunol.* 1996, **156**, 4309-4317
- 14 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- 15 Sauton, B. Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *Comptes Rend. Hebdo. Séances Acad. Sci. Paris* 1912, **155**, 860
- 16 Cabiaux, V., Phalipon, A., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M. and Kaczorek, M. Expression of a biologically active diphtheria toxin fragment B in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 1988, **3**, 339-346
- 17 Boucher, P., Sato, H., Sato, Y. and Loch, C. Neutralization antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect. Immun.* 1994, **62**, 449-456.
- 18 Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. and Loch, C. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* 1995, **177**, 642-653
- 19 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**, 680-685

- 20 Sato, H., Ito, A., Chiba, J. and Sato, Y. 1984. Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* 1984, **46**, 422-428
- 21 Habermann, E. and Dryer, F. Clostridial neurotoxins : handling and action at the cellular and molecular level. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1986, **129**, 93-179
- 22 Fairweather, N. F., Lyness, V. A. and Maskell, D. J. Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherchia coli*. *Infect. Immun.* 1987, **55**, 2541-2545
- 23 Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. and Ishii, S. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 1982, **21**, 5516-5522
- 24 Locht, C. and Keith, J. M. Pertussis toxin gene : nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 1986, **232**, 1258-1264
- 25 Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M. G., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. and Eisenberg, D. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 1992, **357**, 216-222
- 26 Sesardic, D., Hoy, C. S., McKenna, A., Corran, P. H. and Feavers, I. Characterization of the immunogenicity of diphtheria toxin. *Zbl. Bakt. Suppl.* 1994, **24**, 508-509
- 27 Antoine, R., Tallett, A., van Heyningen, S. and Locht, C. Evidence for catalytic role of Glu 129 in the nad-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 24149-24155
- 28 Pittman, M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1984, **3**, 467-486

- 29 Barbieri, J. T., Armellini, D., Molkenin, J. and Rappuoli, R. Construction of a diphtheria toxin A fragment-C180 peptide fusion protein which elicits a neutralizing antibody response against diphtheria toxin and pertussis toxin. *Infect. Immun.* 1992, **60**, 5071-5077
- 30 Gomez-Duarte, O. G., Galen, J., Chatfield, S. N., Rappuoli, R., Eidels, L. and Levine, M. M. Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 1995, **13**, 1596-1602
- 31 Barry, E. M., Gomez-Duarte, O., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J. and Levine, M. M. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect. Immun.* 1996, **64**, 4172-4181
- 32 Lagranderie, M., Murray, A., Gicquel, B., Leclerc, C. and Gheorghiu, M. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine* 1993, **11**, 1283-1290
- 33 Langermann, S., Palaszynski, S., Sadziene, A., Stover, C. K. and Koenig, S. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1994, **372**, 552-555

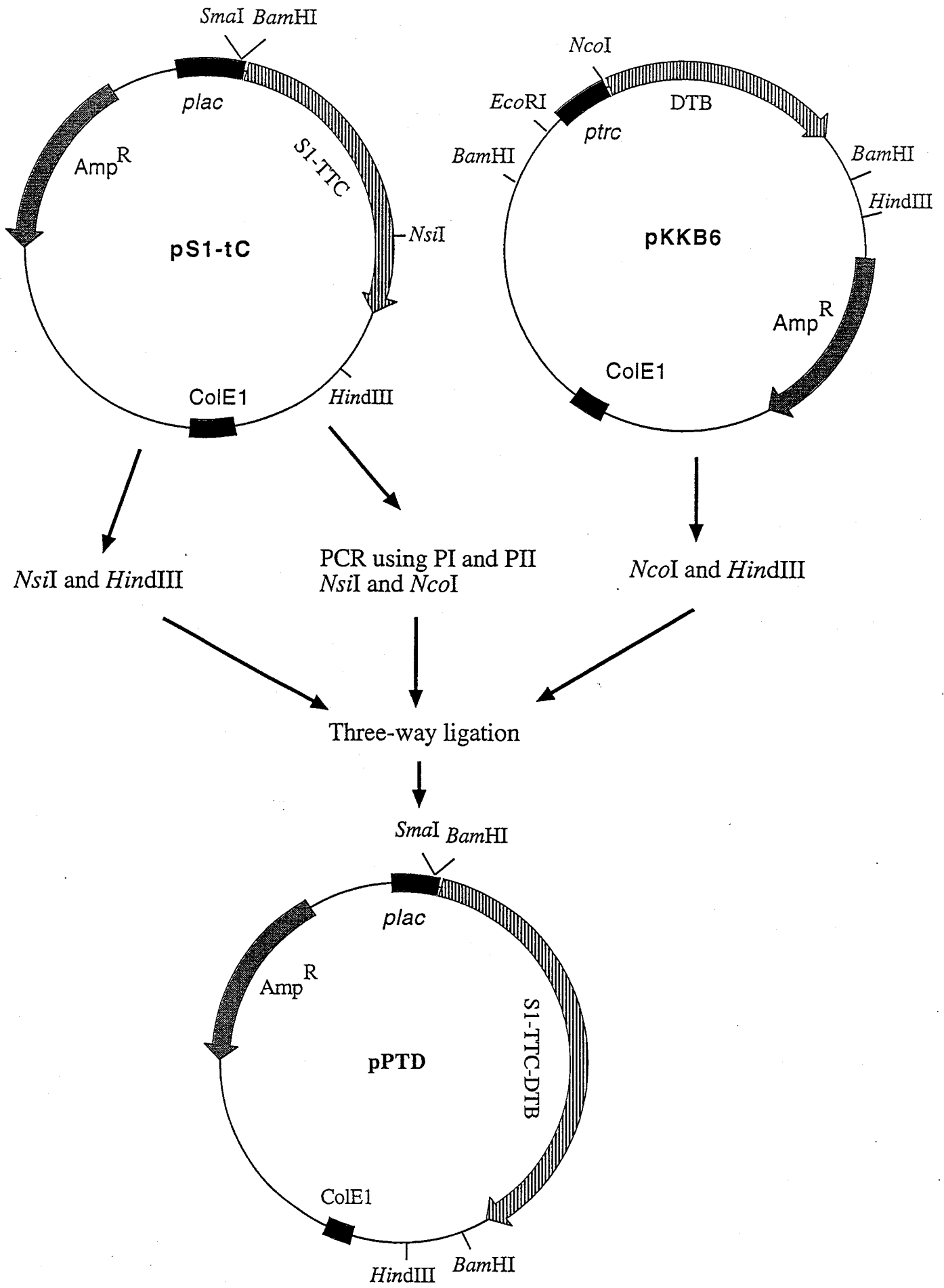
## FIGURE LEGENDS

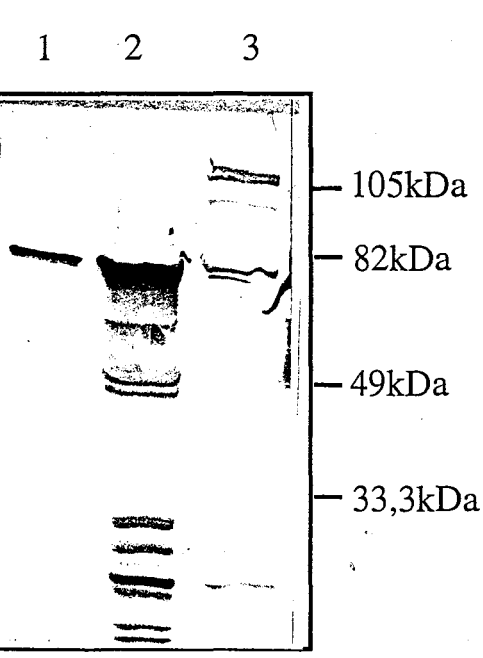
**Figure 1** Construction of pPTD. The ampicillin-resistance gene is indicated by the grey arrow Amp<sup>R</sup>. The origin of replication is shown by the black box ColE1. The promoters plac and ptrc are depicted by the respective black boxes, and the open reading frames encoding S1-TTC (in pS1-tC), DTB (in pKKB6) or S1-TTC-DTB (in pPTD) are indicated by the hatched arrows. Only restriction sites relevant for the plasmid construction are shown.

**Figure 2** Immunoblot analysis of *E. coli* TG1(pPTD). Various *E. coli* cell extracts were analysed by immunoblotting using anti-S1 monoclonal antibody 1B7 (panel A), anti-TTC polyclonal antibodies (panel B) and anti-DTB polyclonal antibodies (panel C). Cell extracts were either prepared from *E. coli*(pPTD) (panels A and B, lanes 3; panel C, lane 2), from *E. coli*(pS1-tC) (panel A, lane 2), or from non-recombinant *E. coli* (panel B, lane 2; panel C, lane 1). Lanes 1 in panel A and B contain 100 ng of purified S1-TTC. The sizes of the molecular weight markers are given in the right margins.

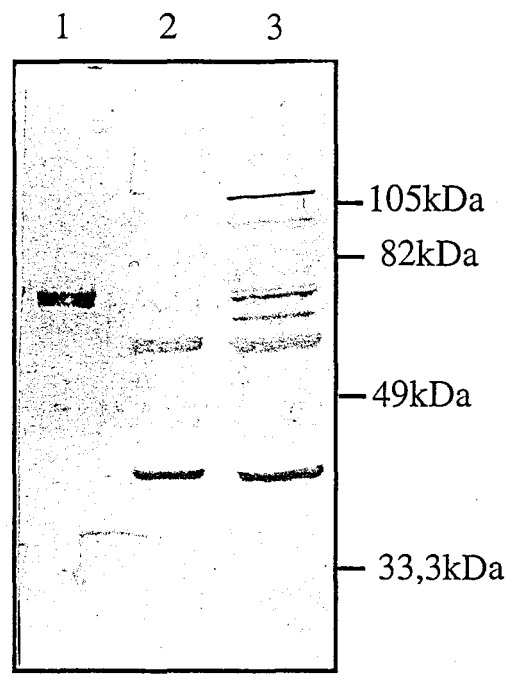
**Figure 3** Construction of pBM001. The symbols are the same as for Fig. 1, with the addition of the stippled arrow depicting the kanamycin-resistance gene and the additional black box Ori myco indicating the mycobacterial origin of replication.

**Figure 4** Immunoblot analysis of BCG(pBM001). BCG cell extracts were analysed by immunoblotting using anti-S1 monoclonal antibody 1B7 (panel A), anti-TTC polyclonal antibodies (panel B) and anti-DTX polyclonal antibodies (panel C). The extracts were either prepared from non-recombinant BCG (lanes 1) or from BCG(pBM001) (lanes 2). The sizes of the molecular weight markers are given in the right margins.

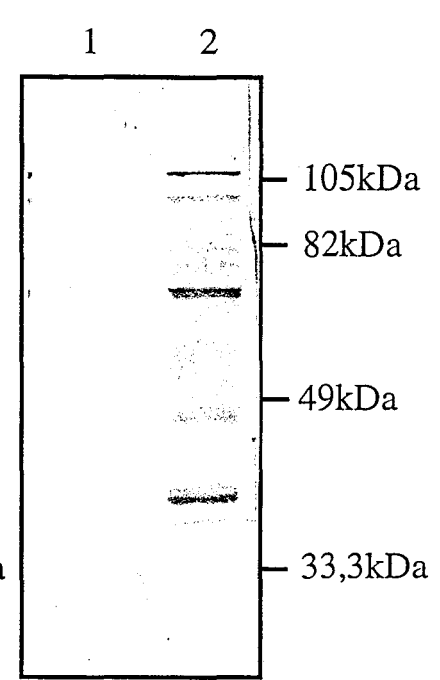




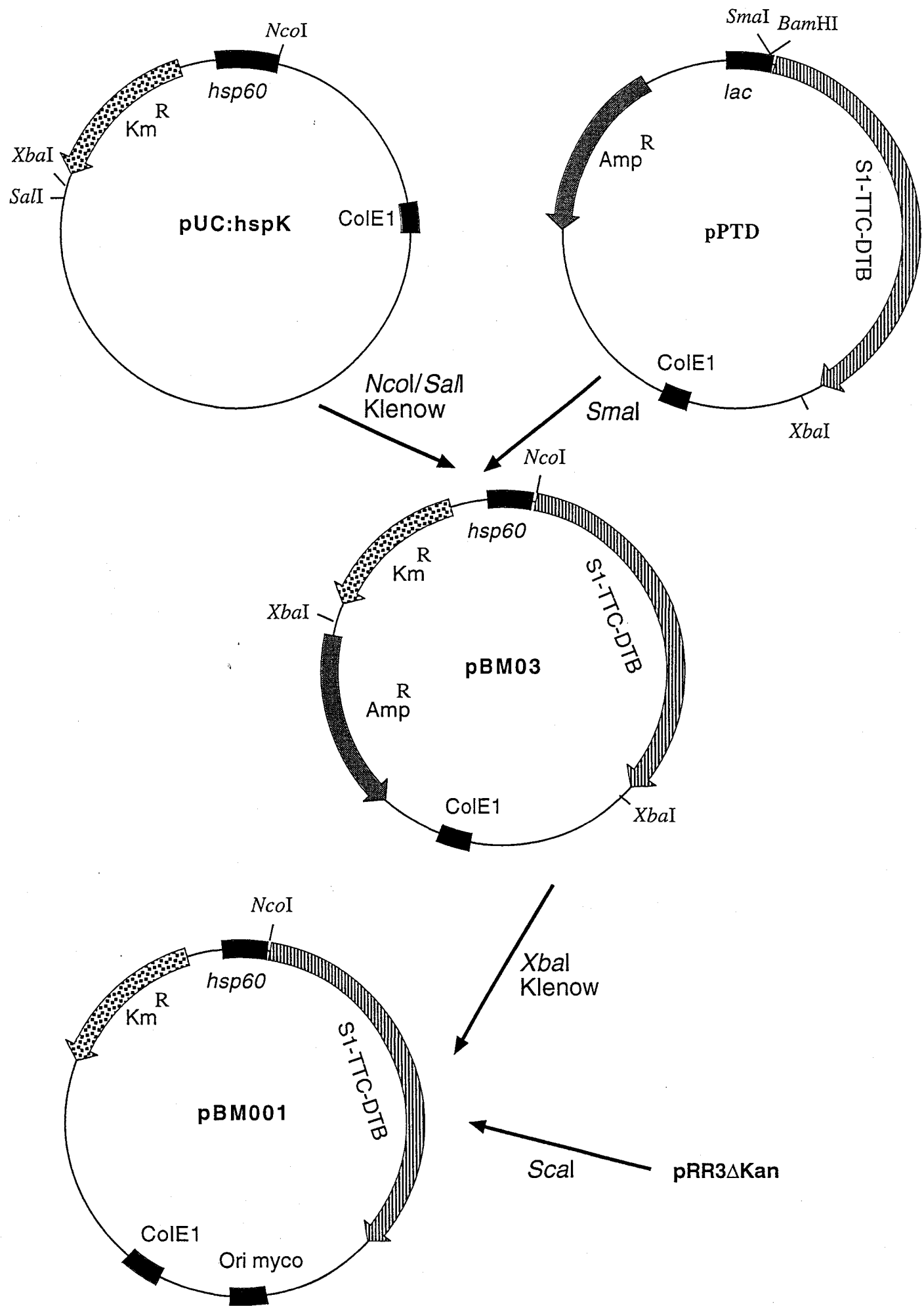
(A)

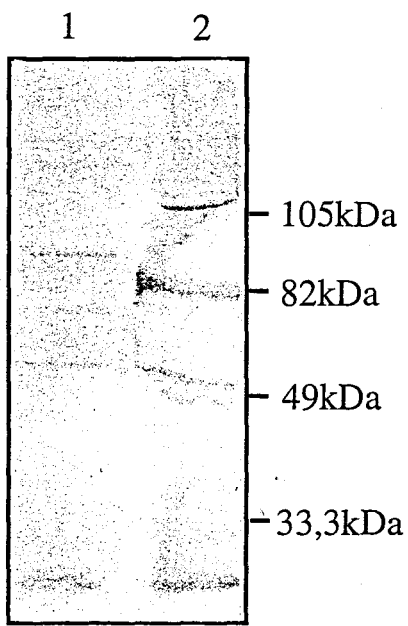


(B)

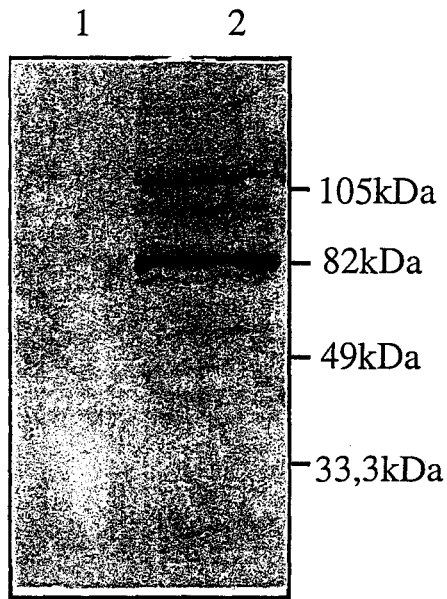


(C)

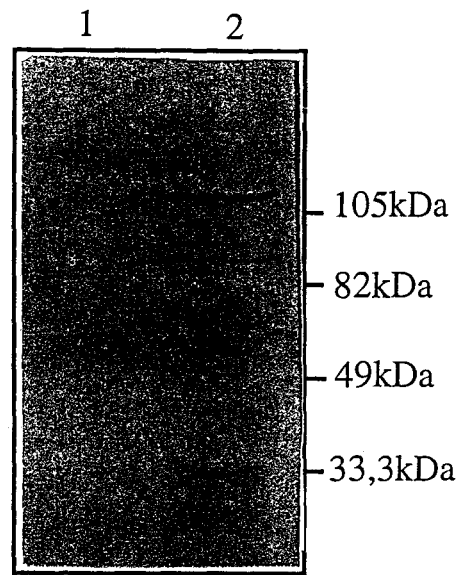




(A)



(B)



(C)



### **Article III. Analysis of the secretion signals of the mycobacterial antigen 85 complex**

Comme nous l'avons vu dans les deux chapitres précédents, il est possible de construire une souche de BCG produisant une protéine hybride qui contient les epitopes importants de trois toxines tétanique, diphtérique et coquelucheuse, trois antigènes protecteurs de maladies infectieuses majeures. D'autres études ont montré que l'immunogénicité d'antigènes hétérologues chez le BCG pouvait être augmentée si l'antigène était sécrété (Stover *et al.*, 1993).

Les antigènes majeurs de sécrétion chez le BCG sont les antigènes du complexe 85 (Wiker et Harboe, 1992). Ce complexe est composé majoritairement des antigènes 85A, 85B et 85C dont les poids moléculaires se situent entre 30 et 32 kDa. Ces protéines sont homologues entre elles et montrent une similitude de séquence d'environ 75 %. Bien que leur rôle ne soit pas clairement établi, elles pourraient être impliquées dans l'interaction avec la fibronectine et dans la synthèse des acides mycoliques de la paroi mycobactérienne.

Chacune de ces trois protéines est synthétisée à partir d'un précurseur contenant un peptide signal, nécessaire à la sécrétion. Les promoteurs et peptides signals de l'antigène 85A et 85B ont été utilisés pour la production et la sécrétion d'antigènes hétérologues chez le BCG (Baulard *et al.*, 1996; Kazuhiro *et al.*, 1990). Cependant, nous avons vu dans le premier chapitre qu'une réponse immunitaire contre S1-TTC n'était pas obtenue quand cet antigène était exprimé sous le contrôle du promoteur et peptide signal de l'antigène 85A.

Afin de développer un nouveau système d'expression optimisé pour la production et la sécrétion à haut niveau de l'antigène hétérologue, nous avons d'abord comparé la force des signaux d'expression et de sécrétion des antigènes du complexe 85. Dans ce but, le gène *phoA* d'*E. coli* a été fusionné à chacune des séquences correspondant aux promoteurs et peptides signals des trois antigènes. L'expression de ces constructions génétiques chez le BCG et le dosage de l'activité phosphatase alcaline qui en résulte ont montré que les signaux de l'antigène 85A étaient les plus forts et que ceux de l'antigène 85C les plus faibles.

A l'aide du gène rapporteur *phoA*, nous avons ensuite comparé les forces des peptides signals des antigènes 85A et 85B dans un même contexte transcriptionnel et traductionnel en utilisant le promoteur et le site d'initiation à la traduction du gène *hsp60*. Cependant, comme les

codons d'initiation des antigènes 85A et 85B n'étaient pas connus, nous avons construit des vecteurs correspondant à chacun des codons d'initiation possibles. L'analyse de l'activité phosphatase alcaline correspondant aux différentes constructions a montré que la force du peptide signal de l'antigène 85A était supérieure à celle du peptide signal de l'antigène 85B. Cette différence pourrait être due à une extension plus longue de la région amino-terminale chargée positivement chez le peptide signal de l'antigène 85A.

Il était intéressant de constater que le niveau d'activité phosphatase alcaline était environ huit fois supérieur chez la souche contenant le promoteur *hsp60* en amont du peptide signal de l'antigène 85A par rapport à la souche exprimant la fusion peptide signal - phosphatase alcaline sous contrôle du promoteur de l'antigène 85A. Cette différence était du même ordre de grandeur que celle observée dans le premier chapitre de la thèse où nous avons comparé le niveau de production de S1-TTC sous le contrôle du promoteur *hsp60* par rapport à celle observée sous contrôle du promoteur de l'antigène 85A.

L'identification d'un peptide signal fort et sa fusion à un promoteur fort devrait permettre maintenant d'optimiser la production et la sécrétion d'antigènes hétérologues chez le BCG.

## Analysis of the secretion signals of the mycobacterial antigen 85 complex

Bassam Abomoelak and Camille Locht\*

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) 20.87.11.51; Fax (+33) 20.87.79.06; e-mail [camille.locht@pasteur-lille.fr](mailto:camille.locht@pasteur-lille.fr)

The antigen 85 complex is composed of the three major proteins, named 85A, 85B and 85C, secreted by the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Although they are likely to fulfil important functions in mycobacterial adherence and cell wall synthesis, little is known about their expression/secretion signals. In this study we used the *Escherichia coli phoA* gene translationally fused to the 85A, 85B and 85C expression and secretion signals to compare the relative strength of these signals in *Mycobacterium bovis* BCG and in *Mycobacterium smegmatis*. The 85A signals were found to be significantly stronger than the 85B signals. Only negligible amounts of alkaline phosphatase activity were detected when the 85C signals were used. The translational *phoA* gene fusions were then used to compare the 85A and 85B signal peptides in the same transcriptional context. When expressed under the control of the *hsp60* promoter and ribosomal binding site, the 85A signal peptide was found to be significantly stronger than the 85B signal peptide. This difference may be attributed to a longer positively charged amino-terminal segment of the 85A signal peptide, suggesting the importance of the positive charges in signal peptide function in mycobacteria.

Mycobacterial diseases, such as tuberculosis and leprosy, remain among the major life threatening diseases, affecting more than 40 million people world-wide (31). In addition, multi-drug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* strains have recently emerged, increasing the seriousness of this threat to the general population. Although one of the most widely used vaccines, *Mycobacterium bovis* bacille de Calmette et Guérin (BCG), the only currently available anti-tuberculosis vaccine, has debatable efficacy (8). Clearly, new chemotherapeutic agents and improved vaccines are urgently needed. However, rational drug design and vaccine development against mycobacterial diseases have been hampered by the poor knowledge of the molecular details of mycobacterial pathogenesis and physiology.

Among the antigens that have been considered as subunit vaccine candidates, the secreted proteins appear to be so far the most promising ones at least in animal models (3, 27). The major extracellular proteins of *M. tuberculosis* are the constituents of the antigen 85 complex (for review, see 39). This complex is composed of several 30-kDa to 32-kDa proteins, the most well characterized of which are the antigens 85A, 85B and 85C (12). The genes from *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium kansasii* encoding these proteins have been cloned and sequenced (7, 9 - 11, 23, 24, 28, 33) and were found to be highly related with respect to their coding sequences. The 85A, 85B and 85C genes diverge, however, in their 5' and 3' non-coding sequences.

The antigen 85 complex induces a strong T-cell response in individuals infected with *M. tuberculosis* or *M. leprae* (15). In addition, antigen 85B has been found to provide significant protection in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis (13). Very recently, a DNA vaccine approach using the gene encoding antigen 85A led to the induction of a strong Th1-type T-cell response in mice and to protection that reached levels similar to that provided by immunization with BCG (14). Although the function and role in pathogenesis of the antigen 85 complex are not clearly established, some of the proteins have been found to express fibronectin-binding activity (1) and hence could take part in mycobacterial colonization to the extracellular matrix. Furthermore, antigen 85B has been suggested to catalyze mycolyltransferase activity (6) and may therefore be involved in mycobacterial cell wall synthesis. This would also make antigen 85B an interesting target for the development of new anti-mycobacterial drugs.

In addition to their interesting biochemical and immunological properties, the high levels of production and secretion of the antigen 85 complex prompted several laboratories to utilize the expression and secretion signals of their genes for the production of heterologous antigens in recombinant BCG strains to be used as live vaccine vectors (5, 16, 17, 19). However, the genetic elements that drive expression and secretion of the antigen 85 complex are still poorly characterized. We have analyzed in some detail the promoter region of the antigen 85A gene (19), and the transcriptional start site of the antigen 85B gene has been determined by primer extension (12). The constituents of the antigen 85 complex are present in the mycobacterial culture supernatant in a constant ratio throughout the growth phase. Harth et al. (12) found that the relative amounts of the three antigens in the culture supernatant correlated well with the intensities of the hybridization signals in Northern blots and suggested that these genes may be coordinately regulated at the transcriptional level. In addition to differences at the transcriptional level the expression/secretion levels of the antigen 85 complex proteins may also depend on differences in signal peptide efficiency.

Since the initiation codons of the antigen 85 preproteins have not been determined yet, and since mycobacterial signal peptides have not been previously characterized, we used *phoA* reporter gene fusions in this study to compare the expression/secretion levels of the antigen 85 proteins and to analyze the signal peptides of antigen 85A and antigen 85B using direct alkaline phosphatase measurements on intact recombinant *M. smegmatis* and BCG.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** All cloning steps were performed in *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, Calif.). The mycobacterial strains used were *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (36), kindly provided by T. Kieser, Norwich, United Kingdom, and *M. bovis* BCG (vaccine strain 1173P2). The measurements of alkaline phosphatase activity were carried out in *E. coli* CC118 (phoA<sup>-</sup>), generously provided by C. Manoil (22), *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG. *E. coli* was grown in LB broth (34) containing the relevant antibiotics when appropriate. Recombinant *M. smegmatis* and BCG were grown in Sauton medium (35) containing 20 µg of kanamycin, 15 µg of streptomycin, or 12 µg of HgCl<sub>2</sub> per ml when appropriate. Mycobacterial transformation was performed as previously described (19).

**Plasmids and DNA manipulation.** pUC18 and pBluescript SK+/- were purchased from New England Biolabs (Beverly, Mass.) and Stratagene, respectively, and pUC4K was purchased from Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden). pRR3 (30) was kindly provided by B. Gicquel (Paris, France). pT7T3-19UphoA1-2-3 (18) containing the *phoA*-coding sequence was a gift from F. Rüker. Restriction enzymes, T4 DNA polymerase, and all other DNA-modifying enzymes were purchased from Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany). Clones BS-BY-5A, 5.1 and 11.2 were a kind gift of J. Content (Brussels, Belgium). pEL1, pEL2 and pEND1 were described previously (19), and pEN102 was described elsewhere (5), and pUC::*hsp60* elsewhere (20). All DNA manipulations were performed using standard protocols as described by Sambrook et al. (34). Nucleotide sequences were determined from double-stranded DNA by the dideoxyribonucleotide chain-reaction method, using [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dCTP (1,000 Ci/mmol; Amersham France, Les Ulis, France) and the DNA T7 sequencing kit (Pharmacia LKB), as recommended by the supplier.

**Alkaline phosphatase assay.** Mycobacteria were harvested by centrifugation and washed in phosphate-buffered saline (PBS; 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH 7.5], 0.15 M NaCl). The final cell pellet was resuspended in 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8). 100 µl of resuspended mycobacteria were mixed with 900 µl of 1 M Tris-HCl (pH 8) and 100 µl of 20 mM para-nitrophenylphosphate (Sigma, St. Louis, Mo). Enzymatic reactions were performed in triplicates in the dark at 37°C for four hours. Reactions were stopped by the addition of 100 µl of 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and the absorbency at 420 nm

was measured. The relative PhoA activities were normalized by cell number as determined by the absorbency of the cultures at 550 nm.

**Immunoblot analyses.** The preparation of mycobacterial cell extracts and immunoblotting onto Hybond-C Extra membranes (Amersham France) were performed as previously described (19). The monoclonal antibody (code number ME6200) reactive against the *E. coli* alkaline phosphatase was purchased from Caltag Laboratories (San Francisco, Calif.). The goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibodies used to develop the immunoblots were purchased from Promega (Madison, Wis).

**Vector construction.** To construct pM003, pEL2 was first digested with *SacI* and *XbaI*, and the fragment containing the 85A promoter region, the PhoA-coding sequence and streptomycin-resistance gene was introduced into pBluescript SK+, previously digested with *SacI* and *XbaI*. This resulted in two types of plasmids, one containing the 85A promoter in the opposite direction of the  $\beta$ -galactosidase promoter, and one containing the 85A promoter in the same direction as the  $\beta$ -galactosidase promoter. The latter plasmid was named pM03 and was digested with *KpnI*. The resulting fragment was sub-cloned into the shuttle vector pEN103, giving rise to pM003 (Fig. 1).

To construct pM005, the promoter region and signal peptide-coding region of the antigen 85B gene were first amplified from clone 5.1 by PCR using the reverse primer (Boehringer Mannheim) and a synthetic oligonucleotide with the following sequence 5' AATGGATCCGCGCCCGCTGTTGCCTCTCC 3' containing a *BamHI* site at the 5' end (underlined). After amplification the PCR product was subcloned into the *SmaI* site of pUC18 giving rise to pM001. pEL1 was digested with *SmaI*, and the resulting 4.4-kb fragment was cloned into pM001 previously digested with *BamHI* and filled in with Klenow fragment. This yielded pM002 which was digested with *XbaI* and *SacI*, and the resulting fragment containing the 85B promoter region and signal peptide-coding region, the PhoA-coding sequence and  $Sm^R$  gene was cloned into pBluescript SK+ previously digested with *XbaI* and *SacI*, yielding pM004. This plasmid was then digested with *KpnI* and the resulting fragment was cloned into pEN103 digested with *KpnI* giving rise to the shuttle vector pM005 (Fig. 1).

pM006 was constructed as follows. First the promoter region and signal peptide-coding sequence of the antigen 85C gene were amplified by PCR from clone 11.2 using the reverse primer



and a synthetic oligonucleotide with the sequence 5' AATGAATTCGCGCCTGCTGTGGCCGGCCCGCCGAAG 3' containing an *EcoRI* site at the 5' end (underlined). The PCR product was then digested with *HindIII* and *EcoRI* and subcloned into pUC18 previously digested with the same enzymes. This gave rise to pB001. The PhoA-coding sequence followed by the Sm<sup>R</sup> gene was then isolated from pEL1 by digestion with *SmaI* and cloned into pB001 digested with *EcoRI* and treated with Klenow fragment to yield pB002. This plasmid was then digested with *XbaI*, treated with Klenow fragment, and the resulting fragment was inserted into the *ScaI* site of pRR3 giving rise to the shuttle vector pM006 (Fig. 1).

To construct the pMB01 and pMB02 series (Fig. 2) the following approach was taken. First, pBMX1 was constructed by inserting the kanamycin-resistance gene, isolated from pUC4K by digestion with *PstI* and treatment with T4 polymerase, into pUC::hsp60, previously digested with *BamHI* and treated with Klenow fragment. This vector contains the kanamycin-resistance gene cloned in the opposite orientation of the *hsp60* promoter. The predicted 85A and 85B signal peptide-coding regions were then amplified by PCR using as templates clone BS-BY-5A and 5.1, respectively, a constant synthetic oligonucleotide with the sequence 5' GCCGGGGTGTGATGTCCCAGCCG 3' and specific oligonucleotides with the sequences shown in table 1. Each of these oligonucleotides contains a *NcoI* or *BspHI* site at its 5' end. After amplification, the different PCR products were first subcloned into the *HindII* site of pUC18. The resulting recombinant plasmid containing the longest 85A insert (A1) was then digested with *EcoRI* and *NcoI*, and the insert was cloned into pBMX1 previously digested with *EcoRI* and *NcoI*. This plasmid was named pBMA1 and served to exchange the A1 fragment for the other PCR fragments by digesting the different pUC18-derivatives containing the PCR fragments each with *BspHI* and *SacII*, and inserting these fragments into pBMA1 previously digested with *NcoI* and *SacII*. The resulting plasmids were then digested with *SacII* and *PstI*, and the restriction fragments containing the kanamycin-resistance gene, the *hsp60* promoter and ribosomal-binding site, and the different signal-peptide-coding regions were cloned into pEND1, previously digested with *SacII* and *PstI*. This gave rise to the final pMB01 and pMB02 series.

## RESULTS

**Comparison of the antigen 85B and antigen 85C expression and secretion signals with those of antigen 85A.** To quantitate the expression/secretion signals of the antigen 85 complex, we constructed translational fusions of the promoter and signal peptide-coding regions of antigens 85A, 85B and 85C with the part of the *E. coli phoA* gene that codes for the mature form of the alkaline phosphatase. Since PhoA hydrolyzes organic phosphate esters only when secreted at least through the cytoplasmic membrane (38), the level of measurable enzyme activity on intact mycobacterial cells should be a function of promoter strength and efficiency of the signal peptide activity. Among the three antigens 85, only the promoter of 85A has been characterized so far (19). We therefore constructed our fusions using the longest available DNA fragment of upstream sequences, with the hope that all sequences required for promoter activity would be present. The 85A, 85B and 85C 5' regions contained therefore respectively 0.6 kb, 1.0 kb, and 0.5 kb upstream of the putative initiation codon of their respective genes. Since the signal peptide-cleavage sites of each of the antigens 85 is known, the last residues of the signal peptides were directly fused to the first residue of mature PhoA in each of the translational fusions.

In all cases the constructions were done such that the hybrid gene would be expressed in the opposite direction from the upstream mercury-resistance genes or kanamycin-resistance genes in order to avoid a putative influence of potential transcriptional read-through from these gene on the hybrid gene expression.

Each of the three final constructs, named pM003, pM005 and pM006 for the 85A, 85B and 85C fusions, respectively, were introduced into *M. smegmatis* and BCG by electrotransformation. After transformation, the recombinant mycobacteria were selected on medium containing streptomycin. The streptomycin-resistant mycobacteria were then grown in liquid cultures and samples were taken at several time-intervals to measure alkaline phosphatase activity on intact cells and in culture supernatants. As shown in Fig. 3, enzyme activity above background levels can be detected with the 85A and 85B constructs in BCG. Similar results were obtained with *M. smegmatis* (data not shown). No activity was detected with the 85C construct in BCG (Fig. 3), and low but detectable activity was detected in *M. smegmatis* (not shown). The reasons for this are not clear, but

could be due to a much lower promoter/signal peptide activity of 85C compared to the two others. This is consistent with the finding that significantly less antigen 85C is present in mycobacterial culture supernatants than antigen 85A or 85B (12). Alternatively, 500 bp of 5' sequence of the 85C gene may not be enough to contain all expression/regulation signals of its promoter. Further studies of the 85C gene await cloning and analysis of the 85C upstream region. In this study we therefore continued our investigation on antigens 85A and 85B. For the latter two constructs, alkaline phosphatase activity was found both in the culture supernatants (not shown) and cell-associated, demonstrating the ability of the two antigen 85 signals to express and secrete PhoA in both mycobacterial species. Immunoblot analyses using an anti-PhoA monoclonal antibody indicated that the signal peptide was completely removed for both 85A and 85B, implying that most of the PhoA had crossed the cell membrane. Interestingly, production and secretion of PhoA is more efficient with the 85A signals than with the 85B signals.

**Analysis of the 85A and 85B signal peptides.** The finding that the 85A construct yielded more PhoA activity than the 85B construct is in apparent contrast with the higher levels of antigen 85B compared to antigen 85A found in *M. tuberculosis* culture supernatants and with the higher level of transcription of the 85B gene compared to that of the 85A gene found by Harth et al. (12). This discrepancy may perhaps be related to a more efficient secretion of antigen 85A due to a stronger signal peptide. We therefore compared the signal peptide strength of antigen 85A with that of antigen 85B.

We used the translational *phoA*-fusion approach and placed all constructs under the *hsp60* promoter to compare the signal peptide activities in the same transcriptional background. However, although the C-terminal limit of the 85A and the 85B signal peptides are known, their N-terminal limits have not been defined yet. The 85A open reading frame contains six possible in-frame ATG initiation codons before running into an in-frame stop codon in the 5' direction of the gene (Fig. 2). Translational initiation at these codons would lead to the synthesis of signal peptides containing 60, 56, 50, 48, 43, and 30 residues, respectively. We thus amplified six DNA fragments corresponding each to one of the possible signal peptide-coding sequences. For unknown reasons, no clonable fragment could be amplified for one of the six pairs of oligonucleotides. The five other fragments

were cloned in-frame between the *phoA* gene on the 3' end and the *hsp60* promoter, ribosomal-binding site and initiation ATG on the 5' end.

The same approach was taken for the analysis of the antigen 85B signal peptide. This open reading frame contains two possible ATG and one GTG initiation codons downstream of the transcriptional start site (Fig. 2). Initiation at these codons would yield signal peptides of 40, 37 and 25 residues, respectively. All three fragments were amplified by PCR and cloned between the *hsp60* signals and the *phoA* gene, as described above for the 85A constructions.

All constructs were introduced into *M. smegmatis* and BCG. The cultures were adjusted to an OD<sub>550</sub> of 0.2, and PhoA activity was measured in culture supernatants and on whole cells. High levels of PhoA activity were detected in culture supernatants and on whole cells of the strains containing the three longest 85A constructions, named A1, A2 and A3, with the highest level of activity found for A3. Significantly less, but still detectable activity was detected with the last two constructs, named A5 and A6 (Fig. 4). These results suggest that the optimal signal peptide is composed of 50 residues. The relative activities of the constructs were similar in BCG and *M. smegmatis*, as well as in culture supernatants, compared to whole cells.

Analysis of the 85B constructs indicated that the two longest sequences, named B1 and B2, yielded PhoA activity, whereas the shortest sequence, named B3, did not result in detectable activity. Again, similar activities were found in *M. smegmatis* and in BCG, regardless whether culture supernatants or whole cells were analyzed. Initiation at the GTG codon gave slightly but consistently higher activity than initiation at the first ATG codon, suggesting that the optimal antigen 85B signal peptide contains 37 amino acid residues.

**Comparison of the plasmid copy number of the various constructs in BCG.** To compare the plasmid numbers of the various constructs, we used the electroduction technique developed by Baulard et al. (4). After transformation and selection on streptomycin-containing medium, six similar sized colonies of each construction were harvested and subjected individually to electroduction to transfer the mycobacterial plasmids directly to *E. coli* XL1-Blue. After electroduction, the recombinant *E. coli* were selected on LB containing streptomycin and counted after one night of incubation at 37°C. As shown in table 2, for each BCG colony, a similar amount of streptomycin-resistant *E. coli* colonies were found, implying that the different BCG colonies

contained similar amounts of plasmids. Similar results were obtained with *M. smegmatis* (data not shown) indicating that the differences in PhoA activities measured for the various constructions were not due to variations in plasmid copy numbers, but rather to differences in signal peptide activities.

## DISCUSSION

The study of mycobacterial secreted antigens is important in many ways. Several studies have indicated that secreted antigens may be protective as vaccine candidates against tuberculosis. BCG has been used extensively over the past decades as the only available vaccine against tuberculosis. Although its efficacy is today still a matter of debate, it has early been recognized that metabolically active live BCG provided a higher degree of protective immunity in experimental animals than dead BCG or isolated antigenic components (25). In addition, it has also been established that protection is mediated by sensitized T lymphocytes (26) rather than anti-mycobacterial antibodies (32). These findings have led to the hypothesis that mycobacterial secreted antigens may play a role in protection. These antigens would be produced by live mycobacteria in the infected host and would also be able to induce a stronger cellular immune response than non-secreted antigens produced by intracellular mycobacteria. Several studies have indeed demonstrated the protective potential of secreted antigens (3, 13, 27).

In addition to its usefulness for the characterization of protective antigens, the study of mycobacterial secreted proteins may also lead to the use of their export signals for the secretion of heterologous proteins in BCG. Recombinant BCG strains expressing heterologous antigens have been developed for their use as live vaccine delivery vehicles (2, 37), and there may be an advantage for the induction of protective immunity to produce these antigens as secreted proteins (21).

However, mycobacterial secretion signals have not been extensively studied yet. We chose to compare the strength and the structure of the signal peptides of the antigen 85A and 85 proteins. The antigen 85 complex represent the major secreted proteins in BCG culture filtrates and have been shown to induce protective immunity as purified proteins or as DNA vaccine (13, 14). The expression/secretion signals of the antigen 85A and 85B have also been used for heterologous expression and secretion in BCG (5, 16, 17, 19).

In this work, we used the *phoA* gene of *E. coli* as a reporter gene to compare the relative forces of the expression/secretion signals of the three members of the antigen 85 complex by measuring alkaline phosphatase activity on the surface of intact cells in BCG and *M. smegmatis*. Although enzyme activity could be readily detected on the cells that contained the 85A or 85B

as well as by parenteral routes. Several recent studies have indicated that mucosal administration of recombinant BCG is able to elicit strong immune responses against heterologous antigens (L.K., in preparation)<sup>32, 33</sup>. Future studies will show which administration route of the recombinant BCG strain developed in this study is best to elicit optimal immune responses against the three toxins, with the long term goal of a multivalent vaccine to protect simultaneously against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis, preferentially by a mucosal route.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. H. Sato for antibodies and Dr. V. Cabiliaux for pKK.B6. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

- 1 Rappuoli, R., Locht, C., Poolman, J., André, F. and Dougan, G. New Vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine* 1996, **14**, 691-700
- 2 Plotkin, S. A. and Mortimer E. A. Jr. (eds.) *Vaccines*. Philadelphia : WB Saunders, 1994, 1 - 996
- 3 Cherry, J. D. Pertussis : the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine* 1992, **10**, 1033-1038
- 4 Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden - protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **i**, 955-960 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)

as well as by parenteral routes. Several recent studies have indicated that mucosal administration of recombinant BCG is able to elicit strong immune responses against heterologous antigens (L.K., in preparation)<sup>32, 33</sup>. Future studies will show which administration route of the recombinant BCG strain developed in this study is best to elicit optimal immune responses against the three toxins, with the long term goal of a multivalent vaccine to protect simultaneously against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis, preferentially by a mucosal route.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. H. Sato for antibodies and Dr. V. Cabiaux for pKK.B6. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

- 1 Rappuoli, R., Locht, C., Poolman, J., André, F. and Dougan, G. New Vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine* 1996, **14**, 691-700
- 2 Plotkin, S. A. and Mortimer E. A. Jr. (eds.) *Vaccines*. Philadelphia : WB Saunders, 1994, 1 - 996
- 3 Cherry, J. D. Pertussis : the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine* 1992, **10**, 1033-1038
- 4 Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden - protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **i**, 955-960 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)



as well as by parenteral routes. Several recent studies have indicated that mucosal administration of recombinant BCG is able to elicit strong immune responses against heterologous antigens (L.K., in preparation)<sup>32, 33</sup>. Future studies will show which administration route of the recombinant BCG strain developed in this study is best to elicit optimal immune responses against the three toxins, with the long term goal of a multivalent vaccine to protect simultaneously against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis, preferentially by a mucosal route.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. H. Sato for antibodies and Dr. V. Cabiaux for pKK.B6. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

- 1 Rappuoli, R., Locht, C., Poolman, J., André, F. and Dougan, G. New Vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine* 1996, **14**, 691-700
- 2 Plotkin, S. A. and Mortimer E. A. Jr. (eds.) *Vaccines*. Philadelphia : WB Saunders, 1994, 1 - 996
- 3 Cherry, J. D. Pertussis : the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine* 1992, **10**, 1033-1038
- 4 Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden - protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **i**, 955-960 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)

as well as by parenteral routes. Several recent studies have indicated that mucosal administration of recombinant BCG is able to elicit strong immune responses against heterologous antigens (L.K., in preparation)<sup>32, 33</sup>. Future studies will show which administration route of the recombinant BCG strain developed in this study is best to elicit optimal immune responses against the three toxins, with the long term goal of a multivalent vaccine to protect simultaneously against tetanus, pertussis, diphtheria and tuberculosis, preferentially by a mucosal route.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. H. Sato for antibodies and Dr. V. Cabiliaux for pKK.B6. The work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. B. A. holds a fellowship of CNOUS.

## REFERENCES

- 1 Rappuoli, R., Locht, C., Poolman, J., André, F. and Dougan, G. New Vaccines, especially new combined vaccines. *Vaccine* 1996, **14**, 691-700
- 2 Plotkin, S. A. and Mortimer E. A. Jr. (eds.) *Vaccines*. Philadelphia : WB Saunders, 1994, 1 - 996
- 3 Cherry, J. D. Pertussis : the trials and tribulations of old and new pertussis vaccines. *Vaccine* 1992, **10**, 1033-1038
- 4 Ad hoc group for the study of pertussis vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden - protective efficacy and adverse events. *Lancet* 1988, **i**, 955-960 (Erratum, *Lancet* **i**, 1238)

constructs, barely detectable or no alkaline phosphatase activity was found on the cells that contained the 85C construct. Since 85C is expressed at significant lower levels than 85A and 85B, this lack of measurable activity could be due to the low sensitivity of the *phoA* reporter system for weak promoters. Alternatively, the 85C construction may not contain the complete promoter and/or regulatory regions, although approximately 500 bp have been inserted upstream of the *phoA* gene. Since the transcriptional start site of 85C is not known, in contrast to that of 85A and 85B, it is also conceivable that, unlike the 85A and 85B genes, 85C gene may be part of a polycistronic operon with a promoter much further upstream. This, however, is unlikely, since Northern blot analyses have recently strongly suggested that each of the antigen 85 genes is arranged as a single transcription unit (12).

The 85A and 85B expression/secretion signals could be compared, however, and the results indicated substantially higher alkaline phosphatase activity for the 85A constructs than for the 85B constructs. This difference could be related to a difference in promoter strength and/or to a difference in signal peptide strength. To discriminate between these two possibilities, the signal peptides were placed in the same context, both downstream of the *hsp60* promoter. This allowed for direct comparison of the signal peptides, and showed that the 85A signal peptide was about twice as strong as the 85B signal peptide in BCG. Interestingly, similar results were obtained in *M. smegmatis*, indicating that the relative strength of the signal peptides is not a function of the mycobacterial receptor strain.

The *phoA* fusions also allowed us to tentatively determine the amino-terminus of the 85A and 85B signal peptides. Because the highest enzyme activities were measured with the A3 and B2 constructs, respectively, it is likely that the 85A signal peptide starts at the third in-frame ATG and that the 85B signal peptide starts at the first in-frame GTG. When initiation was started further downstream, in constructs A5, A6 or B3, significantly less to no alkaline phosphatase activity was measured. This would imply a 50 residues-long signal peptide for 85A and a 37 residues-long signal peptide for 85B.

Bacterial signal peptides are generally 20 to 40 residues long and are structured into three different functional regions. The generally short, but sometimes extended amino-terminal region (N-section) often contains positively charged amino acids and is followed by a long hydrophobic section

(H-section) rarely containing charged amino acids. The signal peptide usually ends with its carboxyl-terminal region (C-section), that is composed of less hydrophobic residues and is recognized by the signal peptidases (29). Both the 85A and 85B signal peptides fit this general scheme. The 85B signal peptide contains a 9 amino acids long N-section containing four positively charged residues followed by a 22 residue-long H-section and ends with a four residue-long C-section. The C-section of the 85A signal peptide has the same length and the same amino acid sequence as that of the 85B signal peptide. The two H-sections also have the same length, but different amino acid sequences. The most striking difference between the two signal peptides lies in the N-section. The N-section of the 85A signal peptide contains 24 residues, including 7 positively charged amino acids. However, it also contains two negatively charged residues, giving a net +5 charge. Interestingly, shortening the N-section by reducing the net charge to +3 or +2 in constructions A5 and A6, respectively, reduces signal peptide activity without abolishing it, whereas deleting all positive charges in construction B3 abolishes signal peptide activity.

Using the same reporter gene and signal peptide, we have also been able to compare the expression (transcription/translation) signals of the 85A gene with that of the *hsp60* gene. When the BCG strains contained the *hsp60* promoter/ribosomal binding site fused to the 85A signal peptide coding sequence and *phoA*, the alkaline phosphatase activities were consistently about eight-fold higher than when they contained the 85A promoter/signal peptide fused to *phoA*. This difference was even more pronounced for the 85B expression signals, suggesting that the 85A expression/secretion signals are stronger than those of 85B. This is somewhat in contrast to the findings of Harth et al. (12) who showed by Northern blot analysis approximately equal amounts of 85A and 85B mRNA, with perhaps an even slightly higher amount of 85B mRNA. This discrepancy could either be related to differential mRNA stability of 85A and 85B, to a differences in regulation between plasmid-borne and chromosome-borne 85A and 85B promoters, or to differences in the translational efficiency of the two genes. Nevertheless, for the construction of optimal expression/secretion cassettes in BCG, this study proposes the use of the *hsp60* promoter fused to the antigen 85A signal peptide coding sequence.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Content, B. Gicquel, T. Kieser, C. Manoil and F. Rüker for bacterial strains or plasmids, L. Kremer for helpful discussion, and F. Jacob-Dubuisson and P. Supply for carefully reading the manuscript. This work was supported by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord-Pas de Calais, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the EC Biotech program. B. A. holds a fellowship of CROUS.

## REFERENCES

1. **Abou-Zeid, C., T. L. Ratliff, H. G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, and G. A. W. Rook.** 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* **56**: 3046-3051.
2. **Aldovini, A., and R. A. Young.** 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature (London)* **351**: 479-482.
3. **Andersen, P.** 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* **62**: 2536-2544.
4. **Baulard, A., C. Jourdan, A. Mercenier, and C. Locht.** 1992. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electrofusion between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4105.
5. **Baulard, A., L. Kremer, P. Supply, D. Vidaud, J.-M. Bidart, D. Bellet, and C. Locht.** 1996. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. *Gene* **176**: 149-154.
6. **Belisle, J. T., T. Sievert, K. Takayama, and G. S. Besra.** 1995. Identification of a mycolyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* and the coincident definition of the physiological function of antigen 85B, p. 212-216. In Program of the 30th Joint Conference on Tuberculosis and Leprosy. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, NIAID, NIH, Ft. Collins, Colo. 19-21 July 1995. Department of Health and Human Services, Washington D.C.
7. **Borremans, M., L. DeWit, G. Volckaert, J. Ooms, J., De Bruyn, K. Huygen, J. P. Van Vooren, M. Stelandre, R. Verhofstadt, and J. Content.** 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **57**: 3123-3130.
8. **Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller.** 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis : meta-analysis of the Published Literature. *J. Am. Med. Ass.* **271**: 698-702.
9. **Content, J., A. de la Cuvelierie, L. De Wit, V. Vincent-Levy-Fr ebault, J. Ooms, and J. De Bruyn.** 1991. The genes coding for the antigen 85 complexes of

*Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family : cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85C of *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**: 3205-3212.

10. **De Mendonça-Lima, L., J. Content, H. van Heuverswyn, and W. Degrave.** 1991. Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5789.

11. **De Wit, L., A. De la Cuvellerie, J. Ooms, and J. Content.** 1990. Nucleotide sequence of the 32kDa-protein gene (antigen 85A) of *Mycobacterium bovis* BCG. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3995.

12. **Harth, G., B.-Y. Lee, J. Wang, D. L. Clemens, and M. A. Horwitz.** 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **64**: 3038-3047.

13. **Horwitz, M. A., B.-W. E. Lee, B. J. Dillon, and G. Harth.** 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1530-1534.

14. **Huygen, K., J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. De Witt, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Souza, A. Drowart, E. Lozes, P. Vandebussche, J.-P. Van Vooren, M. A. Liu, and J. B. Ulmer.** 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine* **2**: 893-898.

15. **Huygen, K., J. P. Van Vooren, M. Turneer, R. Bosmans, P. Dierckx, and J. De Bruyn.** 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32Kda mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand. J. Immun.* **27**: 187-194.

16. **Kameoka, M., Y. Nishino, K. Matsuo, N. Ohara, T. Kimura, A. Yamazaki, T. Yamada, and K. Ikuta.** 1994. Cytotoxic T lymphocytes response in mice induced by recombinant BCG vaccination which produces an extracellular alpha antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. *Vaccine* **12**: 153-158.

17. **Kazuhiro, M., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, M. Totsuka, K. Kobayashi, H. Yukitake, and T. Yamada.** 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**: 4049-4054.
18. **Kohl, J., F. Rüker, G. Himmler, D. Mattanovich, and H. Katinger.** 1990. Engineered gene for *Escherichia coli* alkaline phosphatase for the construction of translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1069.
19. **Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht.** 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* **177**: 642-653.
20. **Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Locht.** 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 913-922.
21. **Langermann, S., S. R. Palaszynski, J. E. Burlein, S. Koenig, M. S. Hanson, D. E. Briles, and C. K. Stover.** 1994. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant Bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* **180**: 2277-2286.
22. **Manoil, C., and J. Beckwith.** 1985. *TnphoA* : a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
23. **Matsuo, K., R. Yamagishi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, and T. Yamada.** 1990. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect. Immun.* **58**: 550-556.
24. **Nagai, S., H. G. Wiker, M. Harboe, and M. Kinomoto.** 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**: 372-382.
25. **Orme, I. M.** 1991. Processing and presentation of mycobacterial antigens : implications for the development of a new improved vaccine for tuberculosis control. *Tubercle* **72**: 250-252.
26. **Orme, I. M., and F. M. Collins.** 1983. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. *J. Exp. Med.* **158**: 74-83.



27. **Pal, P. G., and M. A. Horwitz.** 1992. Immunization with extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune response and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **60**: 4781-4792.
28. **Pessolani, M. C. V., and P. J. Brennan.** 1992. *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. *Infect. Immun.* **60**: 4452-4459.
29. **Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretion pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
30. **Ranes, M. G., J. Rauzier, M. Lagranderie, M. Gheorghiu, and B. Gicquel.** 1990. Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum* : construction of a "mini" *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**: 2793-2797.
31. **Raviglione, M.C., Snider, D.E., and Kochi, A.** 1995. Global epidemiology of tuberculosis: Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *J. Am. Med. Assoc.* **273**: 220-226.
32. **Reggiardo, Z., and G. Middlebrook.** 1974. Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**: 173-175.
33. **Rinke-De Wit, T. F., S. Bekelie, A. Osland, B. Wiele, A. A. M. Janson, and J. E. R. Thole.** 1993. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family : identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infect. Immun.* **61**: 3642-3647.
34. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
35. **Sauton, B.** 1912. Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C. R. Acad. Sci. Paris* **155**: 860.
36. **Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs. Jr.** 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1911-1919.
37. **Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B.**

**Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, Jr., and B. R. Bloom.** 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)* **351**: 456-460.

38. **Torriani, A.** 1967. Alkaline phosphatase from *Escherichia coli*, p. 224-235. In G. L. Cantoni and D. R. Davies (ed), *Procedures in nucleic acid research*. Harper & Row, Publishers, Inc., New York.

39. **Wiker, H. G., and M. Harboe.** 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**: 648-661.

TABLE 1. Synthetic oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>
A1	CTAATTCAG <u>CCATGGGGCCCAAAC</u>
A2	AGGATGCGCCCAAAC <u>TCATGAATGGA</u>
A3	TGCGTTGAG <u>TCATGAGGATGAGG</u>
A5	AGGGAAGCAAGAT <u>TCATGAAGCTT</u>
A6	GGCGCCGTCACGGG <u>TCATGACGCGT</u>
B1	GGCACAGG <u>TCATGACAGACGTG</u>
B2	ACAGGTATGACAGACT <u>TCATGAGCCGA</u>
B3	GGACGCCGATTG <u>TCATGATCGGC</u>

---

<sup>a</sup>The sequences read from 5' to 3', restriction sites *Nco*I (A1) and *Bsp*H1 (oligonucleotides A2, A3, A5, A6, B1, B2, B3) are underlined.

TABLE 2. Electrodeposition analysis of recombinant BCG

Plasmid	Sm <sup>R</sup> <i>E. coli</i> /ml					
	1 <sup>a</sup>	2	3	4	5	6
pM003	72	88	80	112	85	109
pM005	69	80	67	61	70	67
pM006	80	72	100	63	82	65
pMB01A1	90	96	67	92	81	N.D.

---

<sup>a</sup>For each mycobacterial culture containing the indicated plasmid six similar-size colonies were picked and subjected to electrodeposition to transfer the plasmid from BCG to *E. coli*. After electrodeposition, the *E. coli* suspension was plated onto LB agar containing streptomycin, and colonies were counted after overnight incubation at 37°C. N. D., not determined.

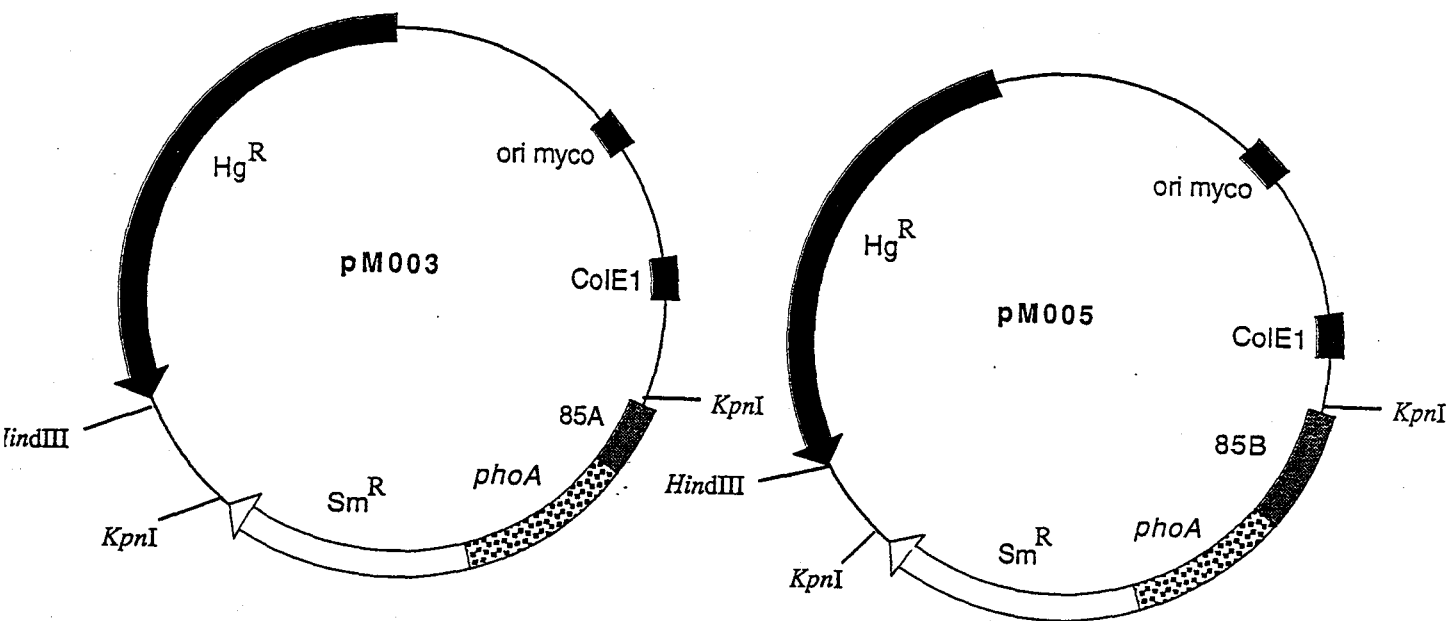
## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Structure of pM003, pM005 and pM006. All three plasmids contain a mycobacterial and an *E. coli* origin of replication, indicated by the black boxes labelled ori myco and ColE1, respectively, and contain the *phoA* gene and the streptomycin-resistance gene, indicated by the stippled boxes and the open arrows, respectively. pM003 (A) and pM005 (B) contain the mercury-resistance genes, and pM006 (C) contains the kanamycin-resistance gene, as indicated by the black arrows. The 85A, 85B and 85C promoter and signal peptide coding sequences are depicted in grey. Some of the relevant restriction sites are shown.

FIG. 2. Structure of the pMB01 and pMB02 series. The symbols are the same as in Fig. 1, with the exception that 85A and 85B only indicate the antigen 85A and 85B signal peptide coding sequences and with the addition of the grey boxes, depicting the *hsp60* promoter. The sequences shown were taken from (A) Kremer et al. (19) and (B) Content et al. (9). -35, -10 boxes and the +1 transcriptional initiation site are underlined. Possible in-frame initiation codons are indicated in bold. Asterisks show the in-frame stop codon upstream of the first possible initiation codon in A. The arrows designate the signal peptide cleavage sites.

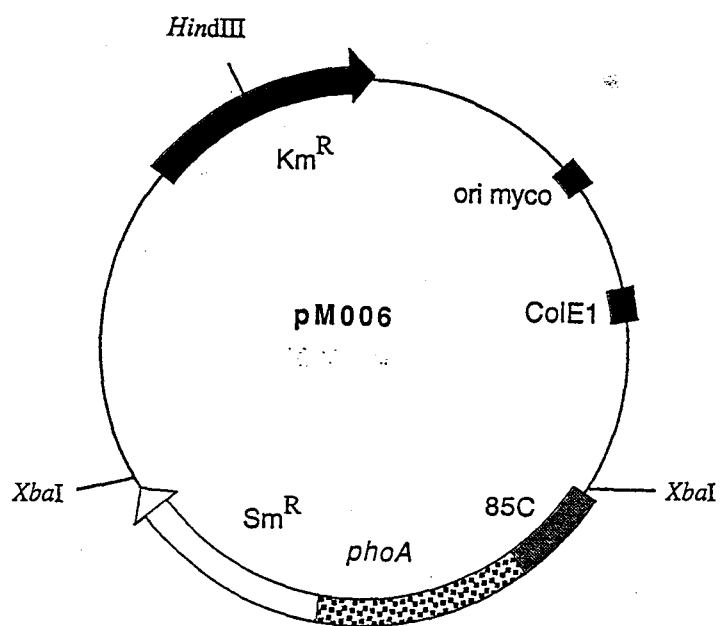
FIG. 3. Alkaline phosphatase activities of recombinant BCG strains. BCG was transformed with pM003 (85A), pM005 (85B) or pM006 (85C) and grown in liquid medium containing streptomycin. Alkaline phosphatase activities were measured directly on intact cells and are expressed as ratios of OD<sub>420</sub> to OD<sub>550</sub> to account for the amount of mycobacterial cells of each culture. As a negative control non-transformed BCG was used. Each experiment was carried out in triplicates.

FIG. 4. Alkaline phosphatase activities of the 85A and 85B signal peptide constructions. BCG was transformed with the different constructs containing the 85A (panel A) or 85B (panel B) signal peptide coding regions fused to the *hsp60* promoter/ribosomal binding site at their 5' end and the *phoA* gene at their 3' end. After transformation, the alkaline phosphatase activities of the recombinant BCG strains were measured as described for Fig. 3.



(A)

(B)



(C)

**A**

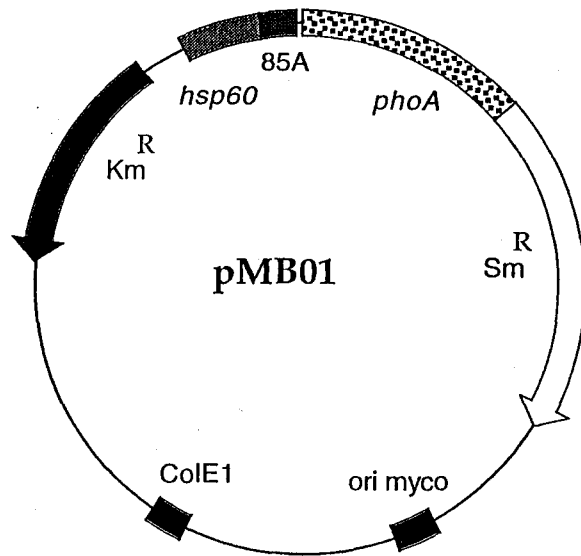
-35 -10  
CGCCTTGATGCGGGTGGACGCCCCGAAGTTGTGGTTGACTACACGAGCACTGCCGGGCCAGCGCCTGCAGT

+1  
CTGACCTAATTCAGG ATG CGC CCA AAC ATG CAT GGA TGC GTT GAG ATG AGG ATG AGG  
\*\*\* Met Arg Pro Asn Met His Gly Cys Val Glu Met Arg Met Arg

GAA GCA AGA ATG CAG CTT GTT GAC AGG GTT CGT GGC GCC GTC ACG GGT ATG TCG  
Glu Ala Arg Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser

CGT CGA CTC GTG GTC GGG GCC GTC GGC GCG GCC CTA GTG TCG GGT CTG GTC GGC  
Arg Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val Gly

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

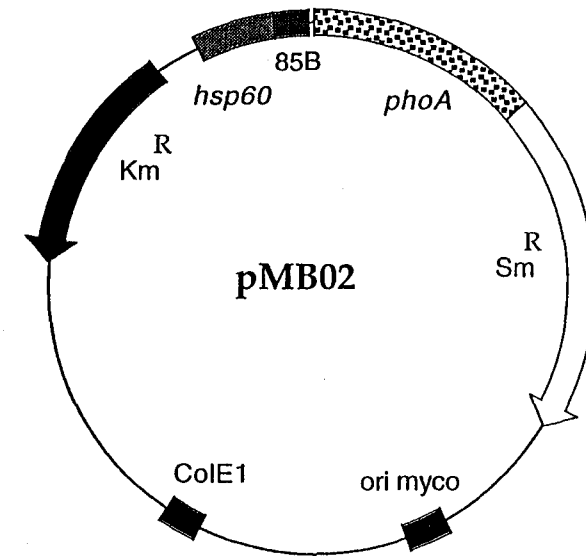
**B**

-10 +1  
ACGACTTTCGCCCGAATCGACATTTGGCCTCCACACCGGTATGTTCTGGCCCCGAGCACACGACGACATAC

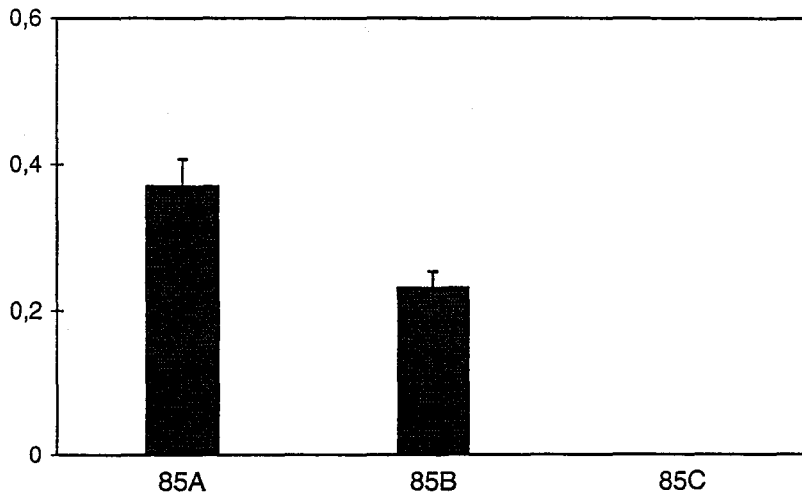
AGGACAAAGGGGCACAGGT ATG ACA GAC GTG AGC CGA AAG ATT CGA GCT TGG GGA CGC  
Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg

CGA TTG ATG ATC GGC ACG GCA GCG GCT GTA GTC CTT CCG GGC CTG GTG GGG CTT  
Arg Leu Met Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu

GCC GGC GGA GCG GCA ACC GCG GGC GCG TTC  
Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe



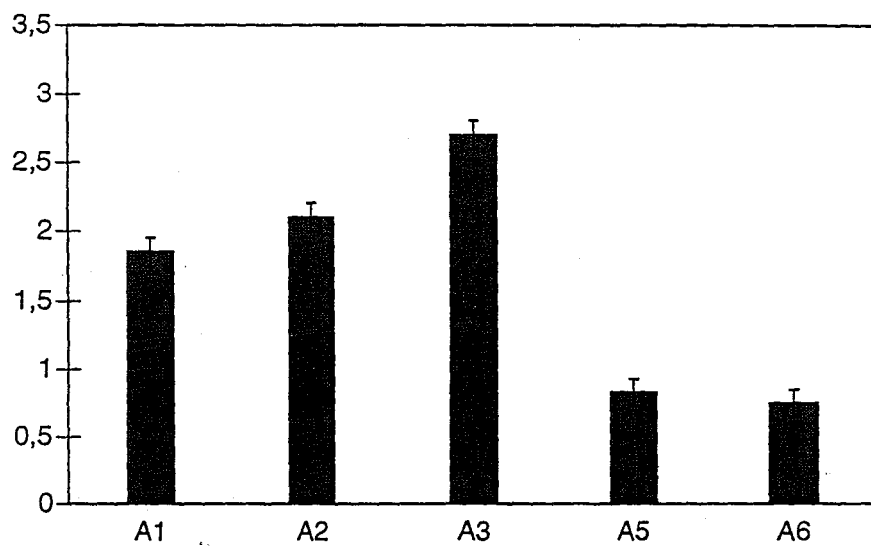
O.D.<sub>420</sub>/O.D.<sub>550</sub>





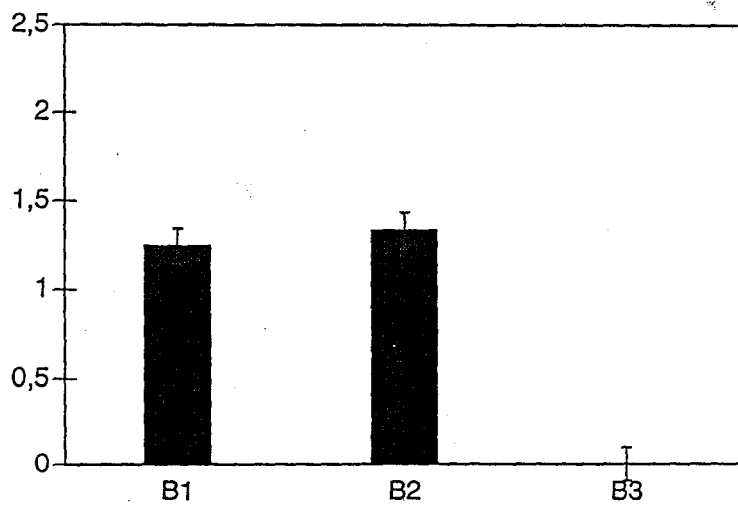
(A)

O.D<sub>420</sub>/O.D<sub>550</sub>



(B)

O.D<sub>420</sub>/O.D<sub>550</sub>



## IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Grâce aux nombreux avantages qu'il offre en tant que vaccin le plus administré à l'échelle mondiale, le BCG semble tout indiqué pour développer des vecteurs vaccinaux recombinants vivants capables d'exprimer des antigènes hétérologues de pathogènes viraux, bactériens ou parasitaires, permettant ainsi de construire des souches polyvalentes capables protéger contre plusieurs maladies à la fois. Resté longtemps réfractaires aux approches de la biologie moléculaire, plusieurs outils génétiques adaptés au genre *Mycobacterium* ont été développés au cours des dernières années.

Les premières souches recombinantes de BCG exprimant un antigène d'intérêt vaccinal étaient construites par Stover *et al.* (1991). Depuis, plusieurs laboratoires ont développé des souches de BCG recombinant produisant différentes protéines, telles que des protéines modèles comme la  $\beta$ -galactosidase (Murray *et al.*, 1992), des antigènes bactériens (Stover *et al.* 1993; Langermann *et al.*, 1994), viraux (Aldovini and Young, 1991; Winter *et al.*, 1991; Honda *et al.*, 1995), parasitaires (Connell *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 1996) et tumoraux (Baulard *et al.*, 1996). Dans certains cas, la réponse immunitaire induite par l'immunisation avec le BCG recombinant conférait une protection contre le pathogène correspondant (Connell *et al.*, 1993; Stover *et al.*, 1993; Langermann *et al.*, 1994).

Afin d'augmenter encore la polyvalence de souches de BCG recombinants, nous avons construit des protéines hybrides contenant des fragments antigéniques de plusieurs protéines bactériennes différentes. Dans une première série de constructions, nous avons produit des souches recombinantes de BCG capables d'exprimer une protéine hybride, appelée S1-TTC, et comprenant la sous-unité S1 de la toxine pertussique et le fragment C de la toxine tétanique. Ensuite, nous avons construit une protéine hybride comprenant en outre le fragment B de la toxine diphtérique. Ces trois fragments antigéniques comportent les épitopes protecteurs majeurs contre la coqueluche, le tétanos et la diphtérie, les trois maladies de l'enfance combattues actuellement partiellement par les vaccins DPT.

Afin de déterminer si la localisation de l'antigène hétérologue au sein du BCG pouvait jouer un rôle dans son immunogénicité, Stover *et al.* (1993) ont construit trois souches recombinantes de

BCG produisant OspA, une lipoprotéine de *Borellia burgdorferi*. Cet antigène était produit soit sous une forme cytoplasmique, soit sous une forme sécrétée, soit sous une forme fusionnée avec un lipopeptide correspondant à la lipoprotéine mycobactérienne de 19 kDa. La souche produisant la protéine sous une forme fusionnée avec le lipopeptide mycobactérien générait une réponse humorale 100 à 1000 fois plus importante comparée à la réponse humorale induite par les deux autres souches recombinantes (Stover *et al.*, 1993), suggérant l'importance de la localisation cellulaire des antigènes hétérologues dans l'induction de la réponse humorale. Cependant, puisque OspA produite chez *B. burgdorferi* est une lipoprotéine, il est possible que l'induction optimale d'une réponse humorale pour un antigène donné dépende de sa présentation sous une forme aussi proche que possible de la forme naturelle.

Comme beaucoup d'antigènes protecteurs, et notamment les toxines bactériennes, sont des protéines sécrétées, le travail réalisé dans cette thèse visait également à comparer différents signaux d'expression et de sécrétion chez le BCG afin d'exprimer des antigènes hétérologues bactériens. Nous avons étudié les forces relatives des signaux d'expression et sécrétion du complexe antigénique 85 (85A, 85B et 85C) en utilisant le gène de la phosphatase alcaline (*phoA*) d'*E. coli* comme gène rapporteur. L'analyse des peptides signaux des protéines 85A et 85B devrait nous permettre maintenant de développer un système de sécrétion optimisé chez le BCG. Ce système serait basé sur l'utilisation du promoteur du gène *hsp60* de *M. tuberculosis* fusionné à l'ADN codant le peptide signal de l'antigène 85A.

## **Expression et immunogénicité d'une protéine hybride S1-TTC chez le BCG**

### **Expression de S1-TTC sous le contrôle des signaux de l'antigène 85A**

Le gène codant l'antigène 85A est membre d'une famille des gènes homologues qui sont dispersés sur le génome mycobactérien. Le produit de chacun de ces gènes est exporté et, ensemble, ces antigènes forment un complexe majeur, appelé complexe 85 (Wiker et Harboe, 1992). Les patients atteints de tuberculose ou de lèpre, ainsi que les souris infectées expérimentalement avec *M. tuberculosis* développent une réponse cellulaire et humorale dirigée contre les protéines du complexe 85. Une analyse par électrophorèse en deux dimensions a indiqué que certains membres de la famille du complexe 85 étaient produits en grande quantité quand *M. tuberculosis* était internalisé dans le macrophage. Ces observations montrent que les signaux d'expression de ces antigènes sont fonctionnels *in vivo*, ce qui suggère qu'ils pourraient être utilisés pour l'expression *in vivo* d'antigènes hétérologues. En effet, il a été montré récemment que GRA1, un antigène de *Toxoplasma gondii*, produit chez une souche recombinante de BCG sous le contrôle des signaux d'expression et de sécrétion de l'antigène 85A était capable d'induire une bonne réponse immunitaire chez le mouton (Supply *et al.*, soumis).

Dans un premier temps, nous avons donc construit un vecteur navette permettant d'exprimer la protéine S1-TTC chez les mycobactéries sous le contrôle des signaux d'expression et de sécrétion de l'antigène 85A de *M. tuberculosis*. L'expression de l'antigène a été vérifiée par immunoempreinte, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la partie S1 et des anticorps polyclonaux dirigés contre le fragment C. La présence de la protéine a pu être détectée dans les extraits cellulaires totaux du BCG recombinant, mais pas dans le surnageant de culture de cette souche. La comparaison de la taille de la protéine recombinante produite chez le BCG à celle de S1-TTC produite et purifiée à partir d'*E. coli*, suggère cependant fortement que le peptide signal a été correctement excisé. Puisque le clivage du peptide signal a lieu à la face externe de la membrane plasmique, cette observation suggère que la protéine hybride ait traversé la membrane du BCG et est probablement localisée dans la paroi mycobactérienne. L'épaisseur et la nature de la paroi mycobactérienne (voir l'introduction) sont probablement responsables de l'absence de S1-TTC dans le surnageant de culture, la taille de la protéine étant probablement trop importante pour qu'elle puisse être relâchée par la bactérie. En effet, d'autres expériences menées au laboratoire ont montré une augmentation progressive de l'efficacité de sécrétion dans le milieu de culture au fur et à mesure que S1-TTC est progressivement tronquée du côté C-terminal tout en gardant la région N-terminale constante (A. Baulard, L. Kremer, C. Loch, observations non publiées).

#### **Analyse de la réponse humorale et cellulaire chez les souris après immunisation avec BCG produisant S1-TTC sous contrôle des signaux de l'antigène 85A**

Des souris Balb/C ont été immunisées par voies i. p. et i. v. avec la souche recombinante de BCG produisant S1-TTC sous contrôle des signaux de l'antigène 85A. L'immunisation de chaque souris par  $5 \times 10^6$  cfu, suivie d'un rappel après deux mois avec  $5 \times 10^6$  cfu de la même souche n'a pas induit une réponse humorale spécifique contre les deux parties de la protéine. L'incapacité de cette souche de BCG à générer une réponse humorale a été testée par immunoempreinte et par ELISA.

La réponse cellulaire contre la protéine purifiée a également été testée chez les souris immunisées par cette souche en cherchant la présence de cytokines spécifiquement induites par S1-TTC dans des cultures de splénocytes prélevés des souris immunisées deux fois par le BCG recombinant. Aucune réponse cellulaire spécifique contre S1-TTC n'a pu être détectée dans les surnageants de cultures de splénocytes.

Deux raisons majeures peuvent éventuellement expliquer cette absence des réponses humorale et cellulaire. La première possibilité est celle d'une expression et sécrétion de la protéine par le BCG trop faibles *in vivo*. La seconde pourrait être liée à l'absence d'éléments de régulation dans le fragment d'ADN cloné en amont du gène codant S1-TTC et qui seraient éventuellement nécessaires à une expression optimale *in vivo*.

L'absence de réponses humorale et cellulaire est également à mettre en parallèle avec l'observation faite précédemment dans notre laboratoire lors de l'immunisation de souris par une souche recombinante de BCG produisant la glutathione *S*-transferase de *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) sous le contrôle des signaux d'expression et d'exportation de l'antigène 85A. Dans ce cas, aucune réponse humorale n'a été détectée dans le sérum des souris immunisées et la réponse cellulaire générée chez ces souris était très faible (Kremer *et al.*, 1995). D'autre part, une souche de BCG produisant GRA1 de *T. gondii* sous contrôle des signaux de l'antigène 85A induisait une bonne réponse cellulaire chez le mouton tout en n'induisant pas de réponse immunitaire significative chez la souris (Supply *et al.*, soumis). Ces observations suggèrent que la réponse immunitaire contre un antigène hétérologue produit sous le contrôle des signaux de l'antigène 85A dépend peut-être de l'espèce animale. Il serait alors intéressant de déterminer si la régulation *in vivo* de ce promoteur est différente chez diverses espèces animales.

### **Expression de S1-TTC sous le contrôle des signaux du promoteur *hsp60***

Afin d'augmenter la production de S1-TTC chez le BCG dans le but d'accroître son immunogénicité, nous avons développé un deuxième système d'expression. Dans une seconde construction, le gène codant S1-TTC a été cloné sous le contrôle du promoteur *hsp60*. Le niveau de la production de la protéine, étudié par immunoempreinte, est significativement élevé dans ce système comparé au niveau d'expression sous dépendance des signaux de l'antigène 85. Une quantification par densitométrie montre une différence d'un facteur 10 environ dans l'efficacité d'expression. Le promoteur *hsp60* a été utilisé auparavant pour exprimer d'autres antigènes bactériens, viraux et parasitaires et la réponse immunitaire générée chez l'hôte était souvent de bon niveau et stable au cours de temps (Kremer *et al.*, 1995a). L'activité *in vivo* du promoteur *hsp60* a été mise en évidence par l'utilisation du marqueur fluorescent GFP (*Green Fluorescent Protein*) cloné en amont du promoteur *hsp60*. L'expression de la fluorescence a pu être visualisée aussi bien chez le BCG sur milieu solide qu'*in vivo* dans des macrophages infectés par le BCG recombinant (Kremer *et al.*, 1995b).

### **Analyse de la réponse humorale et cellulaire chez les souris après immunisation avec BCG produisant S1-TTC sous contrôle du promoteur *hsp60***

En nous basant sur les résultats obtenus dans notre laboratoire avec une souche recombinante de BCG exprimant la Sm28GST sous le contrôle du promoteur *hsp60*, une seule voie d'immunisation et de rappel a été suivie. En effet, Kremer *et al.* (1996) ont expérimenté plusieurs voies d'immunisation et de rappel chez les souris et deux voies ont généré une réponse humorale particulièrement forte. Les voies i. v. ou i. p. ont induit une réponse humorale après une seule immunisation et le rappel avec la même souche recombinante s'est accompagné d'une importante augmentation de la réponse humorale contre l'antigène parasitaire (Kremer *et al.*, 1996).

L'immunisation et le rappel par voie i. p. des souris Balb/C avec la souche recombinante produisant S1-TTC ont induit une réponse humorale contre l'antigène hétérologue dans les sérums des souris immunisées. Cette réponse humorale était détectée par l'analyse des sérums par immunoempreinte et par ELISA. La réponse humorale dirigée contre la protéine hybride s'est avérée être très stable dans le temps, pendant au moins six mois après la première immunisation. Elle était dirigée essentiellement contre le fragment C de la toxine tétanique. L'isotypage a montré la présence d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b spécifiquement dirigés contre S1-TTC, mais aucune production d'IgG3. Cette observation suggère une réponse de type mixte Th1 et Th2, à l'instar de celle observée chez des souris immunisées par voie i. p. avec une souche de BCG produisant la Sm28GST (Kremer *et al.*, 1996).

La réponse cellulaire contre la protéine hybride a également été testée chez les souris immunisées par la souche recombinante en utilisant S1-TTC purifiée et la toxine pertussique (PTX) afin de détecter la présence des lymphocytes T réactifs contre les deux domaines de la protéine chimérique. Une quantité importante d'IL-2, une cytokine sécrétée par les lymphocytes T de type Th1 et impliquée essentiellement dans l'activation des macrophages, a été induite dans les surnageants de culture des splénocytes, suivant l'activation de ceux-ci par S1-TTC. Une quantité faible, mais significative, de la même cytokine a été détectée après activation des splénocytes par la toxine pertussique. Ces résultats montrent la présence de lymphocytes T réactifs spécifiques, capables de reconnaître les deux composantes de la protéine hybride.

Nos résultats ont montré que la réponse cellulaire et la réponse humorale sont toutes les deux essentiellement dirigées contre un des deux domaines de la protéine hybride, la partie TTC. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer la faible réponse immunitaire détectée contre le domaine S1 de S1-TTC. La forme soluble de S1 est peu immunogène et l'adjonction de TTC a pu augmenter la réponse sérique contre S1 (Boucher *et al.*, 1994). D'autre part, l'adjonction de TTC pourrait conduire à une suppression épitopique ou un masquage du domaine S1. Cependant, différentes analyses par ELISA ont montré que les deux domaines de S1-TTC sont bien exposés (Boucher *et al.*, 1994). Néanmoins, un travail récent montre l'importance de la présentation de la partie S1 pour l'induction d'une réponse humorale. En effet, en produisant différentes formes de S1-TTC chez *Salmonella typhi*, Barry *et al.* (1996) ont montré que le niveau de production d'anticorps anti-toxine de *B. pertussis* induits après immunisation avec les différentes protéines hybrides dépend fortement de la localisation du domaine S1 dans la protéine hybride. Les souches recombinantes exprimant la partie S1 en fusion N-terminale de la sous-unité tétanique n'ont pas généré une réponse humorale spécifique contre S1, même après 4 immunisations par différentes voies. En revanche, une réponse humorale spécifique contre la toxine pertussique a été détectée dans les sérums des souris immunisées avec des souches recombinantes exprimant S1 en fusion C-terminale de la partie tétanique.

Néanmoins, l'ensemble de nos résultats démontre la capacité du BCG à induire une réponse humorale et cellulaire, à la fois spécifique et prolongée, dirigée contre une protéine hybride. L'intensité et la qualité de la réponse immunitaire dépendent sans doute du mode de présentation de l'antigène (sécrété dans le milieu ou maintenu dans le cytoplasme) et de la force des signaux d'expression. A l'avenir, d'autres constructions de fusion S1 et TTC peuvent être envisagées ainsi que l'adjonction d'autres antigènes protecteurs tels que l'hémagglutinine filamenteuse de *B. pertussis*. D'autre part, et suite au travail réalisé dans la troisième partie de cette thèse, nous pouvons maintenant procéder à la construction d'une souche exprimant et sécrétant S1-TTC à haut niveau en utilisant la combinaison du promoteur *hsp60* avec le peptide signal de l'antigène 85A.

La recherche de promoteurs mycobactériens inductibles *in vivo* chez l'hôte infecté constitue probablement également une approche prometteuse. De tels promoteurs ont déjà prouvé leur efficacité chez *Salmonella typhimurium* (Hohmann *et al.*, 1995). Les promoteurs inductibles *in vivo* pourraient être particulièrement avantageux pour produire certains antigènes chez le BCG dont la production risque d'être toxique pour le micro-organisme. La recherche de promoteurs mycobactériens inductibles *in vivo* est maintenant possible grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs tels que le gène codant la GFP (Kremer *et al.*, 1995b).

### **Production d'une protéine hybride composée de S1, TTC et DTB et expression chez le BCG**

Les vaccins contre le tétanos et contre la coqueluche sont actuellement administrés ensemble avec un vaccin contre la diphtérie. Comme pour le tétanos, il a été établi depuis longtemps que l'antigène protecteur contre la diphtérie est la toxine diphtérique. Dans le cadre d'une recherche visant à combiner les antigènes protecteurs de ces trois maladies en une seule molécule, nous avons donc procédé à la fusion de la toxine diphtérique à S1-TTC.

La toxine diphtérique est structurée en deux sous-unités, appelées sous-unité A et sous-unité B (Choe *et al.*, 1992). Comme chez la toxine de *B. pertussis*, la sous-unité A de la toxine diphtérique exprime une activité d'ADP-ribosyltransférase, qui est la base enzymatique de la toxicité de cette toxine. La sous-unité B peut être divisée en deux domaines, un domaine de translocation membranaire et un domaine responsable de la fixation de la toxine sur son récepteur cellulaire. Ce domaine est également capable de générer une réponse humorale neutralisante et protectrice chez la souris. Un gène hybride codant une protéine chimérique composée de S1, TTC et du fragment B de la toxine diphtérique a donc été construit.

Ce gène a été introduit dans un vecteur d'expression, sous le contrôle du promoteur inductible P<sub>lac</sub>. La production de la protéine chimérique de 115 kDa chez *E. coli* a pu être mise en

évidence par immunoempreinte. Elle était reconnue par les anticorps anti-toxine de *B. pertussis*, anti-toxine tétanique et anti-toxine diphtérique. Une analyse par fractionnement cellulaire a montré qu'elle était soluble, mais qu'elle subissait une dégradation protéolytique importante. Cette dégradation était observée malgré l'utilisation d'une part d'inhibiteurs de protéases et, d'autre part de souches d'*E. coli* déficientes en protéases.

Le même gène codant la protéine hybride a également été exprimé chez le BCG sous le contrôle du promoteur *hsp60*. La production de la protéine de 115 kDa chez le BCG a été mise en évidence grâce aux mêmes trois anticorps. Il était intéressant de constater que le nombre de fragments de dégradation était plus faible chez le BCG que chez *E. coli*. La présence d'un fragment majeur de dégradation d'environ 80 kDa et reconnu uniquement par les anticorps anti-toxine de *B. pertussis* et anti-toxine tétanique suggère qu'un site de clivage est situé entre les domaines S1-TTC et le domaine B de la toxine diphtérique. Il serait donc intéressant d'étudier la réponse immunitaire induite par cette souche recombinante et de la comparer à celle induite par la souche produisant S1-TTC.

### **Analyse des signaux d'expression et de sécrétion du complexe 85**

Stover *et al.* (1993) ont montré l'importance de la localisation ou de la présentation d'un antigène hétérologue chez le BCG pour son immunogénicité. Il est possible que la meilleure réponse protectrice soit conférée par un antigène produit sous la forme la plus proche de sa forme naturelle. Comme les toxines tétanique, diphtérique et pertussique sont des protéines sécrétées, on peut espérer que leur immunogénicité soit augmentée si elles sont sécrétées chez le BCG. Cependant, contrairement à l'immunogénicité de l'antigène S1-TTC dans le système d'expression cytoplasmique sous le contrôle du promoteur *hsp60*, son immunogénicité dans le système d'expression 85A n'était pas décelée. Pourtant, l'antigène 85A fait partie d'un complexe antigénique dont les constituants sont les protéines majeures de sécrétion (Wiker et Harboe, 1992). Afin de développer ultérieurement un système d'expression/sécrétion plus efficace, nous avons comparé les signaux d'expression/sécrétion des antigènes 85A, 85B et 85C, les trois éléments principaux du complexe 85. Dans ce but, les signaux d'expression/sécrétion des trois antigènes ont été clonés en amont du gène *phoA*, un gène rapporteur d'*E. coli*. Le dosage enzymatique de la phosphatase alcaline a été réalisé chez *M. smegmatis* et chez le BCG sur les cellules entières et les surnageants de culture des différents transformants. Chez le BCG, l'activité enzymatique la plus forte dans les bactéries entières et dans les surnageants de culture a été décelée avec les signaux d'expression de 85A, une activité plus faible a été mise en évidence avec les signaux d'expression de 85B et aucune activité n'a pu être décelée avec les signaux de 85C. Dans ce dernier cas, l'absence d'activité détectable était surprenante dans la mesure où la quantité d'ADN cloné en amont du gène *phoA* devait être suffisante pour contenir tous les signaux d'expression et de



sécrétion de l'antigène 85C, dont il a été montré qu'il est codé par un gène monocistronique (Harth *et al.*, 1996). Cependant, il est possible qu'il manque des séquences opératrices éventuellement nécessaires à la régulation d'expression de ce gène, bien qu'il n'existe aujourd'hui aucune évidence de régulation des gènes codant le complexe 85. D'autre part, il est possible que le système rapporteur *phoA* ne soit pas suffisamment sensible pour mettre en évidence l'expression de gènes faiblement exprimés, ce qui suggère de toute façon que le gène codant 85C est parmi les trois gènes celui qui est exprimé le plus faiblement.

### **Analyse des peptides signal des antigènes 85A et 85B**

La différence dans les niveaux d'activité enzymatique détectée entre la souche exprimant *phoA* sous le contrôle des signaux 85A et celle exprimant *phoA* sous le contrôle des signaux 85B peut s'expliquer par une différence soit dans la force des signaux d'expression, soit dans l'activité des peptides signal. Afin de distinguer entre les deux possibilités nous avons placé les peptides signaux dans un même contexte transcriptionnel et traductionnel. Dans ce but, nous avons fusionné les séquences codant les différents peptides signal couplées au gène *phoA* au promoteur et séquence d'initiation à la traduction du gène *hsp60*. Le peptide signal de 85A possède six codons d'initiation possibles, tandis que celui du 85B en possède trois. Le site de clivage de chaque peptide signal par la signal peptidase était connu, mais le codon d'initiation à la traduction des deux peptides signal inconnu. Nous avons donc construit des vecteurs correspondant à chacune des possibilités d'initiation à la traduction. Après transformation du BCG, le dosage enzymatique nous a permis de déterminer provisoirement les codons d'initiation des peptides signal 85A et 85B. Par ailleurs, la comparaison des niveaux d'activité enzymatique nous a indiqué que le peptide signal 85A était plus efficace pour la sécrétion de la phosphatase alcaline que le peptide signal 85B. La différence la plus importante observée entre ces deux peptides se trouve dans la région N-terminale du peptide signal. En effet, cette région, chargée positivement, est significativement plus longue pour 85A que pour 85B.

Grâce à cette étude, il est maintenant possible de construire des vecteurs d'expression/sécrétion optimisés pour la production des antigènes hybrides S1-TTC et S1-TTC-DTB. Ces vecteurs comprendraient le promoteur et la région d'initiation à la traduction du gène *hsp60* et l'ADN codant le peptide signal de l'antigène 85A. L'utilité de ces vecteurs dépasse évidemment le cadre de l'expression de toxines hybrides, car ils pourront être utilisés pour l'expression d'autres antigènes pour lesquels une sécrétion est désirable.

## V. BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Zeid, C., Garbe, T., Lathigra, R., Wiker, H., Harboe, M., Rook, G. A. W., and Young, D. B. 1991. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding protein. *Infect. Immun.* **59**:2712-2718.
- Abou-Zeid, C., Ratliff, T. L., Wiker, H. G., Harboe, M., Bennedsen, J., and Rook, G. A. W. 1988a. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* **56**:3046-3051.
- Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J., Ratliff, T. L., Steele, J., and Rook, G. A. W. 1988b. The secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies. *J. Gen. Microbiol.* **134**:531-538.
- Aldovini, A., and Young, R. A. 1991. Humoral and cell-mediated responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature (London)* **351**:479-482.
- Andersen, A. B., and Hansen, E. B. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **57**:2481-2488.
- Andersen, A. B., and Hansen, E. B. 1993. Cloning of the *lysA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene.* **124**:105-109.
- Andersen, A. B., Andersen, P., and Ljungqvist, L. 1992. Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **60**:2317-1323.
- Andersen, A. B., Ljungqvist, L., Haslov, K., and Bentzon, M. W. 1991. MPB64 possesses 'tuberculosis-complex'-specific B-and T-cell epitopes. *Scand. J. Immunol.* **34**:365-372.

- Andersen, A., B., Ljungqvist, L., and Olsen, M. 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J. Gen. Microbiol.* **136**:477-480.
- Andersen, A. B., Worsaae, A., and Chaparas, S. D. 1988. Isolation and characterization of recombinant lambda *gt11* bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. *Infect. Immun.* **56**:1344-1351.
- Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., and Heron, I. 1991b. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect. Immun.* **59**:1905-1910.
- Anderson, D. C., Barry, M. E., and Buchanan, T. M. 1988. Exact definition of species-specific and cross-reactive epitopes of the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* using synthetic peptides. *J. Immunol.* **141**:607-613.
- Anderson, R., Gao, X-M., Papakonstantinopoulou, A., Roberts, M., and Dougan, G. 1996. Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect. Immun.* **64**:3168-3173.
- André, F. E., and Peetermans, M. 1986. *In Immunotherapy and vaccines.* (ed. S.J. Cryz), pp. 47-76. VCH, Weinheim.
- Armstrong, J. A., and D'Arcy Hart, P. 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* **134**:713-740.
- Armstrong, J. A., and D'Arcy Hart, P. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* **142**:1-16.
- Ashcroft, M. T., Nicholson, C. C., and Balwant, S. 1967. A seven-year field trial of two typhoid vaccines in Guiana. *Lancet* **30**:623.
- Azuma, I., Ajisaka, M., and Yamamura, Y. 1970. Polysaccharides of *Mycobacterium bovis* Ushi 10, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei* and atypical *Mycobacterium* P1. *Infect. Immun.* **2**:347-349.
- Azuma, I., Kimura, H., Ninaka, I., Aoki, T., and Yamamura, Y. 1968. Chemical and immunological studies on mycobacterial polysaccharides. Purification and properties of polysaccharides from human tubercle bacilli. *J. Bacteriol.* **95**:263-271.

- Ballay, A., Lavrero, M., Buendia, M. A., Tiollais, P., and Perricaudet, M. 1985. *In vitro* and *in vivo* synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J.* **4**:3861-3865.
- Barnes, P. F., Bloch, A. B., Davidson, P. T., and Snider, D. E. 1991. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *New. Engl. J. Med.* **324**:1644-1650.
- Barnes, P. F., Fong, S. J., Brennan, P. J., Twomey, P. E., Mazumder, A., and Modlin, R. L. 1990. Local production of tumor necrosis factor and IFN- $\gamma$  in tuberculous pleuritis. *J. Immunol.* **145**:149-154.
- Barry, E. M., Duarte, O. G., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J., and Levine, M. M. 1996. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect. Immun.* **64**:4172-4181.
- Bart, K. J., Orenstein, W. A. and Hinman, A. R. 1986. *In Immunotherapy and vaccines.* (ed. S. J. Cryz), pp.47-76. VCH, Weinheim.
- Baulard, A., Escuyer, V., Haddad, N., Kremer, L., Loch, C., and Berche, P. 1995. Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. *Microbiology* **141**:1045-1050.
- Baulard, A., Kremer, L., Supply, P., Vidaud, D., Bidart, JM., Bellet, D., and Loch, C. 1996. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. *Gene* **147**:149-154.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portony, D. A. 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature (London)* **345**:175-176.
- Black, R. E., Levine, M. M., Young, C., Rooney, J., and Levine, S. 1983. Immunogenicity of Ty21a attenuated *Salmonella typhi* given with sodium bicarbonate or in enteric-coated capsules. *Dev. Biol. Stand.* **53**:9-14.
- Blackwell, J. M., Barton, C. H., White, J. K., Roach, T. I. A., Shaw, M-A, Whitehead, S. H., Mock, B. A., Searle, S., Williams, H., and Baker, A-M. 1994. Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the *Lsh/Iti/Bcg* gene story continues. *Immunol. Lett.* **43**:99-107.
- Bloom, B. R. 1989. Vaccines for the Third World. *Nature (London)* **342**:115-120.-Bloom, B. R. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. *ASM press.* Washington, DC.

- Bloom, B. R., and Murray. C. J. L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**:1055-1064.
- Borremans, M., DeWit, L., Volckaert, G., Ooms, J., De Bruyn, J., Huygen, K., Van Vooren, J. P., Stelandre, M., Verhofstadt, R., and Content, J. 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **57**: 3123-3130.
- Böttger, E. C. 1994. *Mycobacterium genavense*: an emerging pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 932-936.
- Boucher, P., Sato, H., Sato, Y. and Loch, C. 1994. Neutralization antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect. Immun.* **62**:449-456.
- Brennan, P. J. 1989. Structures of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* **11**(Suppl. 2):S420-S430.
- Bretcher, P. A. 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes 'susceptible' mice resistant to *Leishmania major*. *Science* **260**:539-542.
- Brown, R. F., and Stocker, B. A. D. 1987. *Salmonella typhi* 205aTy, a strain with two attenuating auxotrophic characters, for use in laboratory teaching. *Infect. Immun.* **55**:892-898.
- Butler, WR., O'Connor, S. P., Yakrus, M. A., Smithwick, R. W., Plikaytis, B. B., Moss, C. W., Floyd, M. M., Woodley, C. L., Kilburn, J. O., Vadney, F. S., and Gross, W. M. 1993. *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 539-548.
- Calmette, A. 1927. La vaccination préventive contre la tuberculose par le B.C.G. Paris: Masson. Ed.
- Calmette, A., Guérin, C. 1911. Recherches expérimentales sur la défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Ann. Inst. Pasteur* **25**:625-641.
- Calmette, A. Guérin, C. and Weill Halle, B. 1924. Essais d'immunization contre l'infection tuberculeuse. *Bull. Acad. Med.* **91**:787.
- Cancelleri, V., and Fara, G. M. 1985. Demonstration of specific IgA in human feces after immunization with live Ty21a *Salmonella typhi* vaccine. *J. Infect. Dis.* **151**:482-
- Cantwell, M. F., Snider, D. E., Cauthen, G. M., and Onorato, I. M. 1994. Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA* **272**:535-539.

- Carlin, N. I. A., Löfdahl, S., and Magnusson, M. 1992. Monoclonal antibodies specific for elongation factor Tu and complete nucleotide sequence of the *tuf* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **60**: 3136-3142.
- Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E., and Gros, P. 1994. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.* **180**:1741-1752.
- Chabalgoity, J. A., Khan, C. M. A., Nash, A. A., and Hormaeche, C. E. 1996. A *Salmonella typhimurium htrA* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of Herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from Herpes simplex virus infection. *Mol. Microbiol.* **194**:791-801.
- Chan, H. W., Israel, M. A., Garon, C. F., Rowe, W. P., and Martin, M. A. 1979. Molecular cloning of polyoma virus DNA in *Escherichia coli*: lambda phage vector system. *Science* **203**:887-892.
- Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., and Bloom, B. R. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* **59**:1755-1761.
- Chan, J., Fujiwara, J., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S. J., Sibille, J. C., Snapper, M., Aisen, P., and Bloom, B. R. 1989. Microbial glycolipid: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:2453-2457.
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S., and Bloom, B. R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**:1111-1122.
- Chanda, P. K., Natuk, R. J., Mason, B. B., Bhat, B. M., Greenberg, L., Dheer, S. K., Molnar-Kimber, K. L., Mizutani, S., Lubeck, M. D., Davis, A. R., and Hung, P. P. 1990. High level expression of the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 in presence of *rev* gene using helper-independent adenovirus type 7 recombinants. *Virology* **175**:535-547.
- Chapman, G. B., Hanks, J. H., and Wallace, J. H. 1959. An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepaemurium* in mouse spleen. *J. Bacteriol.* **77**:205-211.
- Chatfield, S. N., Charles, I. G., Makoff, A. J., Oxeer, M. D., Dougan, G., Slater, D., and Fairweather, N. F. 1992a. Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of

heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology* **10**:888-892.

-Chatfield, S. N., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Pickard, D., Levine, M., Hone, D., Posada, M., Strugnelli, R. A., and Dougan, G. 1992b. 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.

-Chatterjee, D., Lowel, K., Rivoire, B., McNeil, MR., and Brennan, P. J. 1992a. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J. Biol. Chem.* **267**: 6234-6239.

-Chatterjee, D., Roberts, A. D., Lowell, K., Brennan, P. J., and Orme, I. M. 1992b. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* **60**:1249-1253.

-Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M. G., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. and Eisenberg, D. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature (London)* **357**: 216-222.

-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.

-Coetzee, A. M., and Berjak, J. 1968. BCG in the prevention of tuberculosis in adult population. *Proc. Mine. Med. Officers Assoc.* **48**:41-53.

-Cohn, Z. A. 1963. The fate of bacteria within phagocytic cells. The degradation of isotopically labeled bacteria by polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* **117**:27-42.

-Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V., and Mosteller, F. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**:698.

-Comstock, G. W., Woolpert, S. F., and Livesay, V. T. 1976. Tuberculosis studies in muscogee country, Georgia. Twenty-year evaluation of a community trial of BCG vaccination. *Public Health Resp.* **91**:276-280.

-Connell, N. D., Medina-Acosta, E., Bloom, B. R., and Russell, D. G. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant BCG expressing the leishmania surface proteinase (gp63). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11473-11477.

-Content, J., de la Cuvelierie, A., DeWit, L., Vincent-Levy-Frebault, V., Ooms, J., and de Bruyn, J. 1991. The gene coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis*

and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for the antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**: 3205-3212.

-Cryz, S. J. 1991. Immunotherapy and vaccines. (Ed. S. J. Cryz), VCH, Weinheim.

-Daffé, M., Brennan, P.J., and McNeill, M. 1990. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analyses. *J. Biol. Chem.* **265**:6734-6743.

-D'Arcy Hart, P., Young, M. R., Gordon, A. H., and Sullivan, K. H. 1987. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J. Exp. Med.* **166**:933-946.

-D'Arcy Hart, P., Young, M. R., Jordan, M. M., Perkins, W. J., and Geisow, M. J. 1983. Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibits saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study. *J. Exp. Med.* **158**:477-492.

-Davis, A. R., Kostek, B., Mason, B. B., Hsiao, C. L., Morin, J., Dheer, S. K., and Hung, P. P. 1985. Expression of hepatitis B surface antigen with a recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:7560-7564.

-Deforest, A., Long, S. S., Lischner, H. W., and Girone, J. A. C. 1988. In Immunotherapy and vaccines. (ed. S. J. Cryz), pp. 47-76. VCH, Weinheim. **81**:237-246.

-Dellagostin, O. A., Wall, S., Norman, E., O'Shaughnessy, T., Dale, J. W., and McFadden, J. J. 1993. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **10**:983-993.

-Denis, M. 1991. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell. Immun.* **132**:150-157.

-De Wit, R. T. F., Bekelie, S., Osland, A., Wieles, B., Janson, A. A. M., and Thole, J. E. R. 1993. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family : identification of the genes for 85A, 85B, 85C and related MPT51 proteins. *Infect. Immun.* **61**:3642-3647.

-Edward, M. F., and Stocker, B. A. D. 1988. Construction of del *aroA* his del *purA* strains of *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **170**:3991.



- Ellner, J. J., and Daniel, T. M. 1979. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin. Exp. Immunol.* **35**:250-257.
- Escuyer, V., Haddad, N., Frehel, C., and Berche, P. 1996. Molecular characterization of a surface-exposed superoxide dismutase of *Mycobacterium avium*. *Microb. Pathog.* **20**:41-55.
- Fairweather, N. F., Chatfield, S. N., Charles, I. G., Roberts, M., Lipscombe, M., Ling Li, L., Strugnell, D., Comerford, S., Tite, J., and Dougan, G. 1990. Use of live attenuated bacteria to stimulate immunity. *Res. Microbiol.* **141**:769-773.
- Fennelly, G. J., Flynn, J. L., Meulen, V., Liebert, U., and Bloom, B. R. 1995. Recombinant bacille Calmette-Guérin priming against measles. *J. Infect. Dis.* **172**:698-705.
- Fenner, F. Henderson, D. A., Arita, I, Jezek, Z., and Ladnyi, I. D. 1988. Smallpox and its eradication. *World Health Organisation*. Geneva.
- Ferguson, R. G., and Simes. A. B. 1949. BCG vaccination of Indian infants in Saskatchewan. *Tubercle.* **30**:5-11.
- Fine, P. E. M. 1981. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis and leishmaniasis: an epidermiological perspective. *Int. J. Lepr.* **49**:337-454.
- Fine, P. E. M. 1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* **11**(Suppl.2):S353-S359.
- Fine, P. E. M., and Rodrigues, L. C. 1990. Modern vaccines: mycobacterial diseases. *Lancet* **335**:1016-1020.
- Flesch, E. A., and Kaufmann, S. H. E. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon- $\gamma$ -activated bone marrow and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **138**:4408-4413.
- Flesch, E. A., and Kaufman, S. H. E. 1988. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon on activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* **56**:1464.
- Flesch, I. E. A., and Kaufmann, S. H. E. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* **59**:3213-3218.
- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., Bloom, B. R. 1993. An essential role for interferon in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* **178**:2249-2254.

- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Koller, B., and Bloom, B. R. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:12013-12017.
- Flynn, J. L., Weiss, W. R., Norris, K. A., Seifert, H. S., Kumar, S., and So, M. 1990. Generation of a cytotoxic T- lymphocytes response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol. Microbiol.* **4**:2111-2118.
- Frieden, T. R., Sterling, T., Pablos-Mendez, A., Kilburn, J. O., Cauthen, G., M., and Dooley, S. W. 1993. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New-York. *N. Engl. J. Med.* **328**:521-526.
- Fulginiti, V. A. 1984. Pertussis disease, vaccine, and controversy. *JAMA.* **251**:251.
- Garbe, T., Jones, C., Charles, I., Dougan, G., and Young, D. 1990. Cloning and characterization of the *aroA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **172**: 6774-6782.
- Gaylord, H., Brennan, P. J., Young, D. B., and Buchanan, T. M. 1987. Lipoarabinomannan: multiglycosylated forms of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *Infect. Immun.* **55**: 2860-2863.
- Gennaro, R., Florio, C., and Romeo, D. 1985. Activation of protein kinase C in neutrophil cytoplasts. *FEBS Lett.* **180**:185-190.
- Germanier, R., and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *galE* mutant Ty21a of *Salmonella typhi* oral vaccine: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **141**:553-558.
- Ghosh-Choudhury, G., Hai-Ahmed, Y., and Graham, F. L. 1987. Protein IX component of the human adenovirus capsid is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J.* **6**:1733-1739.
- Gilman, R. H., Hornick, R. B., and Woodward, W. E. 1977. Immunity in typhoid fever: evaluation of Ty21a-an epimerase mutant of *S. typhi* as a live oral vaccine. *J. Infect. Dis.* **136**:717.
- Gicquel, B. 1995. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* **23**:113-118.
- Glück, R., Hoskins, J. M., Wegmann, A., and Just, M. 1986. *In. Immunotherapy and vaccines.* (ed. S. J. Cryz), pp. 47-76. VCH, Weinheim.

- Good, R. C. 1992. The genus mycobacterium-medical. *In*: Balows A., Truper HG, Dworkin, M. Harder, W., Schleifer, K. H. (ed): The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application. Volume 2. Springer Verlag. New-York. pp. 1238-1270.
- Goren, M. B., Vatter, A. E., and Fiscus, J. 1987. Polyanionic agents as inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. *J. Leukocyte. Biol.* **41**:122-129.
- Hao, S., Slifka, M. K., Matloubian, M., Jensen, E. R., Ahmed, R., and Miller, J. F. 1995. recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:3987-3991.
- Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, Torres, M. L., Ramirez, C., and Cruz, N. 1986. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* **52**:293-302.
- Harmsen, A. G., Muggenburg, B. A., Snipes, M. B., and Bice, D. E. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* **230**:1277-1280.
- Harold, C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1073.
- Harth, G., Lee, B. Y., Wang, J., Clemens, D. L., and Horwitz. M. A. 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **64**: 3038-3047.
- Hasløv, K., Andersen, A., B., Ljungqvist, L., and Bentzon, M. W. 1990. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in seven inbred guinea pig strains. The 38-kDa antigen is immunodominant. *Scand. J. Immunol.* **31**:503-514.
- Havlir, D. V. 1994. *Mycobacterium avium* complex: advances in therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 915-924.
- Hilleman, M. R. 1970. *In*. Modern trends in medical virology. pp. 241-261. Butterworths, London.
- Hoffner, S. E. 1994. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slowly growing mycobacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 937-941.
- Hohmann, E., Oletta, C. A., Loomis, W. P., and Miller, S. I. 1995. Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2904-2908.

- Hoiseth, S., and Stocker, B. A. D. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature (London)* **292**:238-239.
- Hoiseth, S., and Stocker, B. A. D. 1985. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J. Bacteriol.* **170**:3991-
- Honda, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Okamoto, Y., Yoshizaki, H., Kitamura, K., Sugiura, W., Watanabe, K., Fukushima, Y., Haga, S., Katasura, Y., Tasaka, H., Komuro, K., Yamada, T., Asano, T., Yamazaki, A., and Yamazaki, S. 1995. Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble protein from recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10693-10697.
- Honoré, N., Bergh, S., Chanteau, S., Doucet-Populaire, F., Eiglmeier, K., Garnier, T., Georges, C., Launois, P., Limpaboon, T., Newton, S., Niang, K., del Portillo, P., Ramesh, G. R., Reddi, P., Ridet, P. R., Sittisombut, N., Wu-Hunter, S., and Cole, S. T. 1993. Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: structure and function of the Rif-Str regions. *Mol. Microbiol.* **7**:207-214.
- Hopkins, S., Kraehenbuhl, J. P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., De Grandi, P., and Nardelli-Haeffliger, D. 1995. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* **63**:3279-3286.
- Horowitz, M. S. 1990. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe, DM (eds). *Virology*, 2nd ed. New York: Raven Press. **1**:1723-1741.
- Horwitz, M. A., Lee, B-W. E., Dillon, B. J., and Harth, G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1530-1534.
- Hubbard, R. D., Flory, C. M., and Collins, F. M. 1992. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. *Clin. Exp. Immunol.* **87**:94-98.
- Husson, R. N., and Young, R. A. 1987. Genes for the major protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: the etiological agent of tuberculosis and leprosy share an immunodominant antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1679-1683.
- Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, J., DeBruyn, A., Kentos, A., Drowart, J. P., and Goldman, M. 1992. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* **60**:2880-2886.

-Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D. L., Yawman, A-M., Deck, R. R., De Wit, C., Orme, I. M., Baldwin, S., D'Souza, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandebussche, P., Van Vooren, J. P., Liu, M. A., and Ulmer, J. B. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine* **2**:893-898.

-Huygen, K., Palfliet, K., Jurion, F., Hilgers, J., ten Berg, R., van Vooren, J. P., and de Bruyn, J. 1988a. H-2-linked control of in vitro gamma interferon production in response to a 32-kilodalton antigen (P32) of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Infect. Immun.* **56**:3196-3200.

-Huygen, K., van Vooren, J. P., Turneer, M., Bosmans, R., Dierckx, P., and J. De Bruyn. 1988b. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand. J. Immun.* **27**:187-194.

-Israel, M. A., Chan, H. W., Rowe, W. P., and Martin, M. A. 1979. Molecular cloning of polyoma virus DNA in *Escherichia coli* plasmid vector system. *Science* **203**: 883-887.

-Jacobs, W. R., Jr., Tuckman, M., and Bloom, B. R. 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid. *Nature (London)* **327**:532-535.

-Jenner, E. 1798. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of cowpox. London.

-Jones, N., and Shenk, T. 1978. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus 5. *Cell* **13**:181-188.

-Kadival, G. V., Chaparas, S. D., and Hussong, D. 1987. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38 kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **139**:2447-2451.

-Kale, A. B., Kiessling, B. R., van Embden, J. D. A., Thole, J. E. R., Kumararatne, D. S., Pisa, P., Wondimu, A., and Ottenhoff, T. H. M. 1990. Induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup> HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65kDa heat-shock protein. *Eur. J. Immunol.* **20**:369-377.

-Kameoka, M., Nishino, Y., Matsuo, K., Ohara, N., Kimura, T., Yamazaki, A., Yamada, T., and Ikuta, K. 1994. Cytotoxic T lymphocytes response in mice induced by recombinant BCG vaccination which produces an extracellular alpha antigen that fused with the human

immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop. *Vaccine* **12**: 153-158.

-Kavoussi, L., Brown, E. J., Ritchey, J. K., and Ratliff, T. L. 1990. Fibronectin-mediated Calmette-Guérin bacillus attachment to murine bladder mucosa. *J. Clin. Invest.* **85**:62-67.

-Kazuhiro, M., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, K. Terasaka, M. Totsuka, K. Kobayashi, H. Yukitake, and T. Yamada. 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**:4049-4054.

-Khan, C. M. A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Riveau, G., Hormaeche, R. D., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. 1994a. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* p28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11261-11265.

-Khan, C. M. A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Riveau, G., Hormaeche, R. D., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. 1994b. Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J. Immunol.* **153**:5634-5642.

-Kiehn, T. E., and Smith, M. 1994. *Mycobacterium haemophilus*: an emerging pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:915-941.

-King, C., Sathish, J., Crawford, T., and Shinnick, T. M. 1993. Expression of contact-dependent cytolytic activity of *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the locus encoding the activity. *Infect. Immun.* **61**:2708-2712.

-Kirschner, R. A. Jr., Parker, B. C., and Falkinham III, J. O. 1992. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**:272-275.

-Kong, D., and Kunimoto, D. Y. 1995. Secretion of human interleukin 2 by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* **63**:799-803.

-Kotloff, K. L., Noriega, F., Losonosky, G. A., Szein, M. B., Wasserman, S. S., Nataro, J. P., and Levine, M. M. 1996. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect. Immun.* **64**:4542-4548.

- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A., and Locht, C. 1995a. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* **177**:642-653.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Poulain-Godefroy, O., and Locht, C. 1995b. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **175**:913-922.
- Kremer, L., Riveau, G., Baulard, A., Estaquier, J., Capron, A., and Locht, C. 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *J. Immunol.* **156**:4309-4317.
- Lagranderie, M. R. R., Balazuc, A. M., Deriaud, E., Leclerc, C., and Gheorghiu, M. 1996. Comparaison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect. Immun.* **64**:1-9.
- Lamb, J. R., Ivanyi, J., Rees, A. D. M., Rothbard, J. B., Howland, K., Young, R. A., and Young, D. B. 1987. Mapping of T-cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. *EMBO J.* **6**:1245-1249.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Sadziene, A., Stover, C. K., and Koenig, S. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature (London)* **372**:552-555.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Burlein, J. E., Koenig, S., Hanson, M. S., Briles, D. E., and Stover, C. K. 1994. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* **180**:2277-2286.
- Leclerc, C. 1995. Le bel avenir des vaccins. *La Recherche.* **26**:548-555.
- Lee, B. Y., Hefta, S. A., Brennan, P. J. 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **60**:2066-2074.
- Lee, M. H., Pascopella, L., Jacobs, W. R. Jr., and Hatfull, G. F. 1991. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guérin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3111-3115.
- Lefford, M. J. 1975. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* **11**:1174-1181.

- Levine, M. M., Herrington, D., and Murphy, J. R. 1987. Safety, infectivity, immunogenicity, and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in man. *J. Clin. Invest.* **79**:888-902.
- Levine, M. M., Taylor, D. N., Ferreccio, C. 1989. Typhoid vaccines come of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:374-381.
- Levy-Frebault, V., and Portaels, F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing mycobacterium species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:315-323.
- Liew, F. Y., Li, A., Severn, S., Millott, S., Schmitt, J., Salter, M., and Moncada, S. 1991. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *J. Immunol.* **21**:2489-2494.
- Mackett, M., Williamson, J. D. 1995. Human vaccines and Vaccination. Bios Scientific Publishers.
- Markowitz, L. E., and Bernier, R. H. 1987. *In Immunotherapy and vaccines.* (ed. S. J. Cryz), pp. 47-76. VCH, Weinheim.
- Mason, B. B., Davis, A. R., Bhat, B. M., Chengalvala, M., Lubeck, M. D., Zandle, G., Kostek, B., Cholodofsky, S., Dheer, S., Molnar-Kimber, K., and Hung, P. P. 1990. Adenovirus vaccine vectors expressing hepatitis B surface antigen: importance of regulatory elements in the adenovirus major late intron. *Virology* **177**:452-461.
- Matsumoto, S., Hanagi, T., Ohara, N., Wada, N., Kanbara, H., and Yamada. T. 1996. Stable expression and secretion of the B-cell epitope of rodent malaria from *Mycobacterium bovis* BCG and induction of long-lasting humoral response in mouse. *Vaccine* **14**:54-60.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., and Yamada. T. 1990. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive  $\alpha$  antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect. Immun.* **58**:550-556.
- Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., and Yamada. T. 1988. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for the extracellular  $\alpha$  antigen. *J. Bacteriol.* **170**:3847-3854.
- McDermott, M. R., Graham, F. L., Hanke, T., and Johnson, D. C. 1989. Protection of mice against lethal challenge with Herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing glycoprotein B. *Virology* **169**:244-247.



- McDonough, K. A., Kress, Y., and Bloom, B. R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* **61**: 2763-2773.
- McNeil, M., Daffé, M., and Brennan, P. J. 1991. Location of the mycoloyl ester substituents in the cell wall of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **266**: 13217-13223.
- 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.
- Mehra, V., Sweetser, D., and Young, R. A. 1986. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7013-7017.
- Menozzi, F. D., Rouse, J. H., Alvani, M., Laude-Sharp, M., Muller, J., Bischoff, R., Brennan, M. J., and Locht, C. 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J. Exp. Med.* **184**:993-1001.
- Michel, M. L., Pontisso, P., Sobezek, E., Malpiece, Y., Streeck, R. E., and Tiollais, P. 1984. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7708-7712.
- Milstien, J. B., and Gibson, J. J. 1989. Quality control of BCG vaccines by the World Health Organization: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety, 30 p. Publication WHO/EPI/Gen/89.1. WHO. Geneva.
- Minnikin, D. E. 1982. Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. *In*. The biology of the mycobacteria, Vol 1 (eds. Ratledge, C. Stanford, J. L.), pp.95-184. Academic Press. London.
- Misaki, A., and Yukawa, S. 1966. Studies on cell walls of mycobacteria. Constitution of polysaccharides from BCG cell walls. *J. Biochem.* **59**:511-520.
- Misaki, A., Azuma, I., and Yamamura, Y. 1977. Structural and immunochemical studies on D-arabino-d-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterium species. *J. Biochem.* **82**: 1759-1770.
- Mitchison, D. A. 1964. The virulence of tubercle bacilli from patients with pulmonary tuberculosis in India and other countries. *Bull. Int. Union. Tuberc.* **35**:287-293.

- Moreno, C., Mehlert, A., and Lamb, J. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T-cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **74**: 206-210.
- Mukkur T. K., S., McDowell, G. H., Stocker, B. A. D., and Lascelles A. K. 1987. Protection against experimental salmonellosis in mice and sheep by immunization with aromatic-dependent *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.* **24**:11.
- Munk, M. E., Schinnick, T. M., and Kaufmann, S. H. E. 1990. Epitopes of the mycobacterial heat shock protein 65 for human T cells comprise different structures. *Immunobiology.* **180**: 272-277.
- Murray, A., Winter, N., Lagranderie, M., Hill, D. F., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Moriarty, K. M., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. 1992. Expression of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.* **6**: 3331-3342.
- Murray, P. J., and Young, R. A. 1992. Stress and immunological recognition in host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **174**: 4193-4196.
- Murray, P., Aldovini, A., and Young, R. A. 1996. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:934-939.
- Myrvic, Q. N., Leake, E. S., and Wright, M. J. 1984. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**:322-328.
- Nagai, S., Wiker, H. G., Harboe, M., and Kinomoto, M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**:372-382.
- Neill, M. A., and Klebanoff, S. J. 1988. The effect of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. Exp. Med.* **167**:30-42.
- Nelson, B. J., Ralph, P., Green, S. J., and Nacy, C. A. 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. Immunol.* **146**:1849-1857.

- Nikaido, H., and Jarlier, V. 1991. Permeability of the mycobacterial cell wall. *Res. Microbiol.* **142**:437-443.
- Nikaido, H., Kim, S. H., and Rosenberg, E. Y. 1993. Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol. Microbiol.* **8**:1025-1030.
- Noriega, F. R., Losonsky, G., Wang, J. Y., Formal, S. B., and Levine, M. M. 1996. Further characterization of  $\Delta$ aroA  $\Delta$ virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:23-27.
- North, R. J. 1973. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. *Cell Immunol.* **7**:166-176.
- O'Donnell, M., Aldovini, A., Duda, R. B., Yang, H., Szilvasi, A., Young, R. A., and DeWolf, W. 1994. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. *Infect. Immun.* **62**:2508-2514.
- OMS. 1966. Expert committee on biological standardization. Technical report series no. 329. WHO. Geneva.
- OMS. 1992. Expanded program for immunization. Program Report. WHO. Geneva.
- OMS. 1995. Rapport sur la santé mondiale. WHO. Geneva.
- Orme, I. 1988. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **140**:3589-3593.
- Orme, I. M., Collins, F. M. 1983. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy. *J. Exp. Med.* **158**:74-83.
- Orme, I. M., Collins, F. M. 1984. Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. *Cell. Immunol.* **84**:113-120.
- Orme, I. M., Miller, E. S., Roberts, A. D., Furney, S. K., Griffin, J. P., Dobos, K. M., Chi, D., Rivoire, B., and Brennan, P. J. 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **148**:189-196.
- Osborn, T. W. 1983. Changes in BCG strains. *Tubercle.* **64**:1-132.

- Pal, P. G., and Horwitz, M. A. 1992. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **60**:4781-4792.
- Palmer, C. E., and Long, M. W. 1966. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am. Rev. Dis.* **94**:553-568.
- Park, W. H. 1922. Toxin-antitoxin immunization against diphtheria. *JAMA.* **79**:1584.
- Pasteur, L., Chamberland C-E, and Roux, E. 1881. Sur la vaccination charbonneuse. *CR Acad. Sci. Paris* **92**:1378.
- Peake, P., Basten, A., and Britton, W. J. 1991. Characterization and functional properties of the 70 kDa protein of *Mycobacterium bovis*. *J. Biol. Chem.* **266**: 20828-20832.
- Perkus, M. E., Piccini, A., Lipinskas, B. R., and Paoletti, E. 1985. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science* **229**:981-984.
- Pessolani, M. C. V., and Brennan, P. J. 1992. *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. *Infect. Immun.* **60**:4452-4459.
- 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.
- Pincus, S., Tartaglia, J., and Paoletti, E. 1995. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals* **23**:159-164.
- Pituell, C., Dorsch, M., Kazda, J., Wolters, J., and Stackebrandt, E. 1992. Phylogeny of rapidly growing members of the genus *mycobacterium*. *Int. J. Syst.Bacteriol.* **42**: 337-343.
- Polla, B. S. 1988. A role for heat shock proteins in inflammation? *Immunol. Today.* **9**: 134-137.
- Ramon, G. 1928. L'anatoxine diphtérique: ses propriétés, ses applications. *Ann. Inst. Pasteur* **42**:959.
- Randrianarison-Jewoukoff, V., and Perricaudet, M. 1995. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* **23**:145-157.
- Rastogi, N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res. Microbiol.* **142**: 464-481.

- Ratliff, T. L., Palmer, J. O., McGarr, J., and Brown. E. J. 1987. Intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Res.* **47**:1762-1766.
- Renauld-Mongénie, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A-M., Capron, A., Riveau, G., and Loch, C. 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. USA* **93**:7944-7949.
- Rieder, H., L., Cauthen, G., M., Comstock, G., W., and Snider, D. E. 1989. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epid. Rev.* **11**:79-98.
- Robbins, A. 1990. Modern vaccines. *Lancet* **16**:1436-1438.
- Roberton, J. S. 1994. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* **12**:1526-1527.
- Roche, P. W., Triccas, J. A., and Winter, N. 1995. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointment and future hopes. *Trends in Microbiol.* **3**:397-401.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., and Böttger, E. C. 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:323-330.
- Romain, F., Augier, J., Pescher, P., and Marchal, G. 1993a. Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5322-5326.
- Romain, F., Laqueyrie, A., Militzer, P., Pescher, P., Chavarot, P., Lagranderie, M., Auregan, G., Gheorghiu, M., and Marchal, G. 1993b. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect. Immun.* **61**:742-750.
- Rook, G. A. W., Steels, J., Barnass, S., Mace, J., and Stanford, J. L. 1986. Responsiveness to live *Mycobacterium tuberculosis*, and common antigens, of sonicate-stimulated T cell lines from normal donors. *Clin. Exp. Immunol.* **63**:105-110.
- Rous, N., Christophe, S., Bellet, D., Troalen, F., Guillet, J. G., and Bidart, J. M. 1992. Immune recognition of a molecule naturally presented as a monomeric or an oligomeric structure: the model of the human chorionic gonadotropin a subunit. *Mol. Immunol.* **29**:883-893.

- Roux, E., and Yersin, A. 1888. Contribution à l'étude de la diphtérie. *Ann Inst Pasteur*. **2**:629.
- Russell, D. G. 1995. *Mycobacterium* and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell. Biol.* **5**:125-128.
- Sansone, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T., and Mounier, J. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cell: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* **51**:461-469.
- Sarosombath, S., Banchuin, N., Tassanee, S., Vanaduringhan, S., Rungpitarangsi, B., and Dumhavibhat, B. 1987. Systemic and intestinal immunities after different typhoid vaccination. *Asian Pacific J. All. Immunol.* **5**:53-61.
- Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* **150**:2920-2930.
- Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R., and Horwitz, M. A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* **144**:2771-2780.
- Schödel, F., and Will, H. 1990. Expression of hepatitis B virus antigens in attenuated *Salmonellae* for oral immunization. *Res. Microbiol.* **141**:831-837.
- Schödel, F., Aguado, M. T., and Lambert, P. H. 1994. Introduction: Nucleic acid vaccines. *Vaccine* **12**:1491-1942.
- Schonberger, L. B., Kaplan, J., Kim-Farley, R., and Moore, M. 1984. In Immunotherapy and vaccines. (ed. S. J. Cryz), pp.47-76, VCH, Weinheim.
- Schowebel, V., Papillon, F., Haeghebaert, S., Truffot-Pernot, C., and Grosset, J. 1993. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en 1992. *Bull. Epidémiol. Hebd.* **50**:235-236.
- Schurr, E., Malo, D., Radzloch, D., Buschman, E., Morgan, K., Gros, P., and Skamene, E. 1991. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. *Immunology. Today* **12**:42-45.
- Shinnick, T. M. 1987. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **169**:1080-1088.

- Shinnick, T. M., and Good, R. C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:884-901.
- Sibley, L. D., Adams, C. B., and Krahenbuhl, J. L. 1990. Inhibition of gamma-interferon-mediated activation in mouse macrophages treated with lipoarabinomannan. *Clin. Exp. Immun.* **80**:141-148.
- Sibley, L. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., and Krahenbuhl, J. L. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* **56**:1232-1236.
- Smith, H. A. 1994. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* **12**:1515-1519.
- Smith, P. G. 1988. Epidemiological methods to evaluate vaccine efficacy. *Br. Med. Bull.* **44**:679-690.
- Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R., Kieser, T., Bloom, B. R., and Jacobs, W. R. Jr. 1988. Lysogeny and transformation of mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6987-6991.
- Sory, M. P., and Cornelis, G. R. 1990. Delivery of the cholera toxin B subunit by using a recombinant *Yersinia enterocolitica* strain as a live oral carrier. *Res. Microbiol.* **141**:921-929.
- Stead, W. W., Lofgren, J. P., Senner, J. W., and Reddick, W. T. 1990. Racial differences in susceptibility to infection with *M. tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* **322**:422-427.
- Stead, W. W. 1992. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering. *Ann. Intern. Med.* **116**:937-941.
- Stern, B. J. 1927. Should we be vaccinated? A survey of the controversy in its historical and scientific aspects. New-York: Harper and Bros.
- Stover, C. K., Bansal, G. P., Hanson, M. S., Burelin, J. E., Palaszynski, S. R., Young, J. F., Koenig, S., Young, D. B., Sadziene, A., and Barbour, A. 1993. Protective immunity elicited by a recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate for lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* **178**:197-209.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R. Jr., and Bloom, B. R. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature (London)*. **351**:458-460.

- Sturgill-Koszyński, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., and Russell, D. G. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**:678-681.
- Supply, P., Sutton, P., Coughlan, S. N., Saman, E., Trees, A. J., Cesbron, M. F., and Loch, C. Immunogenicity and protective activity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. (Soumis).
- Suter, E. 1961. Passive transfer of acquired resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis* by means of cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* **83**:535-543.
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., and Taylor, J. 1992. NYVAC: A highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**:217-232.
- Tartaglia, J., Pincus, S., and Paoletti, E. 1990. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Crit. Rev. Immunol.* **10**:13-31.
- Tascon, R. E., Colston, M. J. O., Rango, S., Stavropoulos, E., Gregory, D., and Lowrie, B. D. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Medicine* **2**:888-892.
- Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P., and Paoletti, E. 1988. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**:497-503.
- ten Dam, H. G. 1993. In BCG vaccination. (ed. L. B. Reichman et E. S. Hershfield), pp.251-269. *Tuberculosis*. Marcel Dekker, New-York.
- Thole, J. E., Dauwerse, H. G., Das, P. K., Groothuis, D. G., Schouls, L. M., and van Embden, J. D. A. 1985. Cloning of *Mycobacterium bovis* DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **50**:800-806.
- Thole, J. E. R., Keulen, W. J., Kolk, A. H. J., Groothuis, D. G., Berwald, L. G., Tiesjema, R. H., and Van Embden, J. D. A. 1987. Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.* **55**:1466-1475.
- Thole, J. E. R., Schoningh, R., Janson, A. A., Garbe, T., Cornelisse, Y. E., Clark-Curtiss, J. E., Kolk, A. H. J., Ottenhoff, T. H. M., De Vries, R. R. P., and Abou-Zeid, C. 1992. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol.* **6**:153-163.



- Treanor, J. J., Mattison, H. R., Dumayati, G., Yinnon, A., Erb, S., and O'Brien, D. 1992. Protective efficacy of combined live intranasal and inactivated influenza A virus vaccines in the elderly. *Ann. Intern. Med.* **117**:625.
- Valenzuela P., Medina. A., Rutter, W. J., Ammerer, G., and Hall, B. D. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B surface antigen particles in yeast. *Nature (London)* **298**:347-350.
- Vandiviere, H. M., Dworski, M., Melvin, I. G., Watsonk, K. A., and Begley, J. 1973. Efficacy of bacillus Calmette-Guerin and isoniazid-resistant bacillus Calmette-Guerin with and without isoniazid chemoprophylaxis from day of vaccination. II. Field trial in man. *Am. Rev. Respir. Dis.* **108**:301-313.
- Venisse, A., Berjeaud, J. M., Chaurand, P., Gilleron, M., and Puzo, G. 1993. Structure of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **268**: 12401-12411.
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasite: isolation of a candidate for BCG. *Cell.* **73**:469-485.
- Wahdan, M. H., Serie, C., Cerisier, Y., Sallam, S., and Germanier, R. 1982. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three years results. *J. Infect. Dis.* **145**:292-296.
- Waisman, A., Ruiz, P. J., Hirschberg, D. L., Gelman, A., Oksenberg, J. R., Brocke, S., Mor, F., Cohen, I. R., and Steiman, L. 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nature Medicine* **2**:899-905.
- Walker, R. I. 1994. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* **12**:387-400.
- Wallace, R. J. Jr. 1994. Recent changes in taxonomy and disease manifestation of the rapidly-growing mycobacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:953-969.
- Wayne, L. G., and Sramek, H. A. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:1-25.
- Wiker, H. G., Sletten, K., Nagai, S., and Harboe, M. 1990. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. *Infect. Immun.* **58**:272-274.

- Wiker, H. G., and M. Harboe. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**:648-661.
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H. G., Darai, G., Schaller, H., and Schekklekens, H. 1982. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature (London)* **299**:740-742.
- Wilson, G. S. 1967. The hazards of immunization. The Athlone press. University of London.
- Wilson, E., Oclott, M. C., Bell, R. M., Merrill, A. M., Jr., and Lambeth, J. D. 1986. Inhibition of the oxidative burst in human neutrophils by sphingoid long-chain bases. *J. Biol. Chem.* **261**:12616-12623.
- Winter, N., Lagranderie, M., Gangloff, S., Leclerc, C., Gheorghiu, M., and Giquel, B. 1995. Recombinant BCG expressing the SIV<sub>mac251</sub> nef gene induce proliferative and CTL responses against Nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* **13**:471-478.
- Winter, N., Lagranderie, M., Rauzier, J., Timm, J., Leclerc, C., Guy, B., Kieny, M. P., Gheorghiu, M., and Gicquel, B. 1991. Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG : induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* **109**:47-54.
- Wolinsky, E. 1979. Non tuberculous mycobacteria and associated disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* **119**: 107-159.
- Wright, A. E. 1896. On the association of serious hemorrhages with conditions and defective blood-coagulability. *Lancet* **2**:807.
- Wright, S. D., and Silverstein. S. C. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**: 2016-2023.
- Yamamoto, T., Nishiura, M., Harada, N., and Imaeda, T. 1958. Electron microscopy of ultra-thin sections of lepra cells and *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* **26**:1-11.
- Yasutomi, Y., Koenig, S., Haun, S. S., Stover, C. K., Jackson, R. K., Conard, P., Conley, A. J., Emini, E. A., Fuerst, T. R., and Letvin, N. L. 1993. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* **150**:3101-3107.
- Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., and Young, R. A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4267-4270.
- Young, D. B., Kauffman, S. H. E., Hermans, P. W. M., and Thole, J. E. R. 1992. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.* **6**:133-145.

-Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M., Ivanyi, J., Thomas, D., and Davis, R. W. 1985a. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 25883-2587.

-Young, R. A., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T., Clark-Curtiss, J., Davis, R. W., and Bloom, B. R. 1985b. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite, *Mycobacterium leprae*. *Nature (London)* **316**:450-452.

-Zhang, Y., Lithgra, R., Garbe, T., Catty, D., and Young, D. 1991. Genetic analysis of superoxide dismutase, the 32 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **5**:381-391

