

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I**  
en Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Nathalie Reveneau**

le 25 Octobre 2001



---

**Vaccination par voie muqueuse : utilisation de**  
***Lactobacillus plantarum* et *Bordetella pertussis***  
**comme vecteurs vivants de vaccination**

---

Directeurs de thèse : Dr. Annick Mercenier et Dr. Camille Locht

**Jury**

Pr. Jean-Claude Michalski  
Dr. Geneviève Milon  
Pr. Jean Delcour  
Pr. Michel Simonet

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur

*à Cyril,*

*à mes parents,*

*à mes sœurs, Carine, Sylvie et Marie-Christine*

*à Elisabeth, Anne-Claire et Andréas*

*Remerciements*

*Je remercie les membres du jury d'avoir très gentiment accepté de lire et de juger ce travail.  
Je les remercie également pour leurs messages d'encouragements :*

*\*Professeur Jean-Claude Michalski*

*Université de Lille-1  
UMR CNRS 8576 " Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle"  
Labo Chimie Biologique C9*

*\*Docteur Geneviève Milon*

*Institut Pasteur Paris  
Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire*

*\*Professeur Jean Delcour*

*Université catholique de Louvain  
Laboratoire de Génétique Moléculaire*

*\*Professeur Michel Simonet*

*Institut de Biologie de Lille  
Equipe mixte Inserm-Université E9919  
Physiologie des bactéries pathogènes du tube digestif*

*\*Docteur Annick Mercenier*

*Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille  
Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes*

*\*Docteur Camille Loch*

*Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille  
Inserm U447, Mécanismes moléculaires de la pathogénie bactérienne*

*Je tiens également à remercier Nestlé France et l'Institut Pasteur de Lille pour le soutien financier de cette thèse.*

*Que tous ceux aux côtés de qui j'ai passé un peu, beaucoup..., de temps soient assurés de toute mon affection, de mon amitié et de ma reconnaissance.*

*Annick, je te remercie de nous avoir donné notre chance (à Cyril et à moi). Tu as été notre rayon de soleil en ce jour enneigé de Janvier où tu es venue nous rendre visite à Strasbourg. Je te remercie pour m'avoir accueillie dans ta toute nouvelle équipe de l'époque. Tu m'as permis de rencontrer et de travailler aux côtés de personnes très compétentes avec lesquelles j'ai appris beaucoup. Je leur souhaite, au passage, bon courage et bonne chance pour la poursuite de leur travail. J'ai beaucoup apprécié ton enthousiasme et ta persévérance dans le travail. Merci pour les critiques apportées lors de la rédaction de ce manuscrit. Je tiens également à te remercier de m'avoir écoutée quand il le fallait.*

*Un grand merci à toi, Camille : j'ai apprécié et j'apprécierai encore de travailler avec toi. C'est souvent avec une certaine angoisse que j'ai pu entrer dans ton bureau, pendant cette thèse, mais c'est toujours rassurée et motivée que j'en suis ressortie. Merci pour ta confiance, tes conseils, ta disponibilité et ton efficacité.*

*Merci à tous les deux, Annick et Camille, pour avoir tenu votre rôle de co-directeurs de thèse. Ces 4 années passées au sein de vos deux équipes ont été très enrichissantes à tous les niveaux.*

*Françoise, je te dois beaucoup, tu m'as fait confiance depuis le début et tu m'as toujours témoigné ton attention. Merci pour tes encouragements, surtout dans les moments les plus difficiles. Je te remercie du fond du cœur.*

*Patrice, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Tu m'as appris à rester calme et positive devant toutes les situations ainsi qu'à relativiser. Ta présence au sein du labo, ta disponibilité ainsi que tous les conseils et encouragements dont tu m'as fait part m'ont permis d'avancer et de réaliser cette thèse. J'ai toujours pu compter sur toi ; tu ne m'as jamais laissée tomber même après ton départ. Je te remercie de ton amitié. Je te souhaite bonne chance et beaucoup de bonheur avec ta petite famille.*

*Anne-Sophie, je ne saurai jamais comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci pour l'énorme coup de main pendant la rédaction. Tu as dû supporter toutes mes angoisses, mes colères, mes raz-le-bol et aussi mes joies. Tu as traversé cette épreuve avec moi, tu as souffert quand je stressais et tu vas encore souffrir jusqu'à la soutenance. Ta bonne humeur, ta sincérité et ton dévouement m'ont beaucoup touchée. Par contre, ça n'a pas beaucoup d'effet sur minette !*

*Marie-Christine, un grand merci pour la relecture et les corrections du manuscrit. Merci d'avoir supporté les hauts et les bas de chacun d'entre nous pendant ces 4 années. Les soirées chez la famille Renaud resteront gravées à jamais dans toutes nos têtes.*

*Je tiens également à remercier Bruno Pot pour son aide précieuse lors de la correction du manuscrit.*

*Sylvie, merci pour ton aide dans les manips et pour ton soutien. Je n'oublierai pas les bons moments passés à l'animalerie à se raconter les derniers ragots. Je vous souhaite beaucoup de réussite à toi et à Kévin et beaucoup de bonheur avec votre petite Julie. Au fait, tu n'aurais pas une paire de pompes en trop ?*

*Loïc, merci pour tous les petits services que tu m'as rendu. J'apprécie beaucoup ta gentillesse, ta disponibilité et ta serviabilité. Je te souhaite beaucoup de réussite. Je m'installe bientôt à la paillasse, alors attention à ce que tout soit rangé et propre, y compris la centri !*

*Emilie, ça a été une grande satisfaction de travailler avec toi pendant ces quatre mois. Je te remercie de t'être investie à ce point dans cette étude. Je te souhaite bonne route pour l'avenir.*

*Hélène, tes petites histoires croustillantes vont me manquer. Courage pour la thèse. J'oubliais, dès qu'on a un peu de temps, on se fait une bouffe à la maison avec Emilie. De toutes façons, on s'appelle...ou plutôt tu nous appelles !*

*Je te remercie ma petite Clairette pour tes visites détendantes quand l'inspiration n'y était plus. Je te souhaite bonne chance et beaucoup de réussite.*

*Pierre, il est loin le temps des longues conversations philosophiques après 20 heures. Les conversations par e-mail sont beaucoup plus limitées. Merci quand même pour toutes les blagues que tu m'as envoyées. Bonne chance pour ta thèse.*

*Sissi (une Reveneau de plus à l'IBL), attention à ne pas trop en dire sur moi, ça pourrait nuire à ma réputation. Merci pour le coup de main, chère soeurette.*

*A toute la famille de l'U447, j'adresse un énorme merci. Je serai toujours touchée par la gentillesse et la sympathie si bien mariées à la compétence de chacun d'entre vous. J'apprécie la bonne humeur ambiante et la volonté de chacun de préserver l'union du groupe malgré les départs et les arrivées. Merci aux anciens qui sont encore là, Véro, Domi, Rudy, Françoise, Eve, Franco, Philippe, Larry et à ceux qui sont partis, Zabeth, Corinne, Sandrine, Manue, Bibi, Juana, Nancy de m'avoir accueillie à bras ouverts il y a de cela déjà 4 ans et demi. Merci à ceux qui sont arrivés ou revenus après moi, Alex, Sylvie, Nath, Alain, Franck, Loïc, Jean, Xavier, Kévin, Anne-So, Fanny, Sarah pour tous les moments passés à leurs côtés. Merci à tous, pour tous les services que vous m'avez rendus, pour vos encouragements et vos conseils. J'espère que vous êtes tous prêts à m'accueillir une nouvelle fois pour de nouvelles aventures.*

*Je tiens à remercier toutes les filles de Bactério : Marie-Claude, Denise, Sole et Hélène, merci pour les coups de main dans les manip. Corinne et Catherine, merci pour la relecture des papiers. Sonia et Christel, je vous souhaite beaucoup de courage pour ce qui vous attend et beaucoup de réussite.*

*Une pensée pour toi, Heide, je regrette de ne pas avoir passé plus de temps à tes côtés. Je n'oublierai pas ton petit bonjour si radieux, chaque matin, qui mettait un peu de bonne humeur dans le labo.*

*Je remercie, tout le personnel du premier étage de l'IBL, en particulier Raphaële, Amena, Martine, Karl, Didier, Thierry et Hugues, pour leur accueil très chaleureux et pour m'avoir intégrée dans leur famille pendant les mois de rédaction. Karl, je te remercie pour tous les petits services informatiques que tu m'as rendus. Merci à toi et à Didier pour les pauses fringales.*

*A tous les NC, Odile, Marie, Anne-So, Manu, Christopher, Lionel, Patrice, David H., Cyril : je n'oublierai jamais tous les merveilleux moments passés ensemble soit autour d'une table, soit sur un vélo ou encore dans un canoë. Ces instants inoubliables nous ont permis à tous les deux d'égayer notre rude vie de malheureux thésards. La famille des NC s'agrandit, bienvenue à la petite Lou, aux petits Félix et Loïc ainsi qu'au grand David.*

*Je garde le meilleur pour la fin. Cyril, je te remercie pour tes conseils et ton soutien. Merci d'avoir supporté mes humeurs pendant la période de rédaction. Je pense que c'est maintenant à moi de souffrir (chacun son tour), je ferai en sorte de te soutenir du mieux que je le pourrai. Bon courage (tu verras, ce n'est qu'un très mauvais moment à passer).*

*Enfin, je tiens à présenter mes excuses à toutes les personnes qui me sont proches en particulier : mes parents, mes sœurs, mes nièces, mon petit neveu et mes amis (Laurette, Christèle, Valérie et Stéphane...). Pardon de ne pas avoir été présente pour partager vos joies et vos peines. Maman, papa, bon courage à tous les deux. Carine, reviens nous vite.*

*Abréviations et nomenclature*

Ac-Hly	Adénylate cyclase-hémolysine
ACIP	« Advisory Committee on Immunization Practices »
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
Ap <sup>r</sup>	Résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
<i>aro</i>	Gène de biosynthèse des acides aminés aromatiques
BAL	« Bronchoalveolar lavage »
BALT	« Bronchus-Associated Lymphoid Tissue »
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BG	Bordet-Gengou
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>B. pertussis</i> (pX)	<i>Bordetella pertussis</i> portant le plasmide X
Brk	« Bordetella resistance to killing »
BSA	« Bovine Serum Albumin »
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bvg</i>	« <i>Bordetella</i> virulence gene »
CFU	« Colony Forming Unit »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CR3	« Complement Receptor type 3 »
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CT	« Cholera Toxin », toxine cholérique de <i>Vibrio cholerae</i>
CTB	« Cholera Toxin B-subunit », sous-unité B de la toxine cholérique
C-terminal	Carboxy terminal
CTLs	« Cytotoxic T Lymphocytes », lymphocytes T cytotoxiques
DNT	« Dermo-Necrotic Toxin », toxine dermonécrotique
DO <sub>600nm</sub>	Densité Optique à 600 nanomètres
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	« Ethylene Diamine Tetra Acetate »
ELISA	« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »
ELISPOT	« Enzyme-Linked Immunosorbent Spot forming assay »
Em <sup>r</sup>	Résistance à l'erythromycine
<i>emm6</i>	Gène codant la protéine M6 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
EPI	« Expanded Programme on Immunization », programme élargi d'immunisation
ETEC	« Enterotoxigenic <i>E. coli</i> », <i>Escherichia coli</i> entéro-toxigénique
FAE	« Follicle-Associated Epithelium »
FHA	« Filamentous Haemagglutinin », hémagglutinine filamenteuse
Fha44	Troncat N-terminal de FHA
Fha44::TTFC	Protéine hybride FHA44-TTFC
Fim	Fimbriae
GALT	« Gut-Associated Lymphoid Tissue »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
gp	Glycoprotéine
GRAS	« Generally Recognized As Safe »
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HCl	Acide chlorydrique
<i>H. influenza</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> de type b
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
i.e	In example
IFN	Interféron
i.g	Intra-gastrique
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
i.n	Intra-nasal
INT-7	Intégrant <i>L. plantarum</i> (contenant la fusion génétique codant la protéine hybride M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup> )

ISCOM	« Immuno-Stimulating Complexes »
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LAB	« Lactic Acid Bacteria »
LD <sub>50</sub>	Dose létale à laquelle 50% de la population est morte
LDH	Lactate déshydrogénase
<i>ldh</i>	Gène codant la lactate déshydrogénase
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. plantarum</i> (pX)	<i>Lactobacillus plantarum</i> portant le plasmide X
LPS	Lipopolysaccharides de surface
LPXTG	Leucine, Proline, X, Tryptophane, Glycine
LT	« Labil Toxin », toxine labile de <i>E. coli</i>
LTB	« Labil Toxin B-subunit », sous-unité B de la toxine labile
M6 <sup>N</sup>	Séquence N-terminale de la protéine M6
M6 <sup>C</sup>	Séquence C-terminale de la protéine M6
M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup>	Protéine hybride M6-TTFC
MALT	« Mucosal-Associated Lymphoid Tissue »
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCIMB	« National Collections of Industrial and Marine Bacteria »
NK	« Natural Killer »
NO	Oxyde d'azote
N-terminal	amino terminal
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	paire de bases
PBMC	Cellules mononuclées isolées de sang périphérique humain
PBS	« Phosphate Buffer Saline »
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PEG	« Polyethylene glycol »
PLG	Polymères d'acides lactique et glycolique
Prn	Pertactine
PT	« Pertussis toxin », toxine pertussique
PVD	Pays en Voie de Développement
RCR	« Rolling Circle Replication », répllication en cercle déroulant
RGD	Arginine, Glycine, acide Aspartique
RSV	« Respiratory Syncytial Virus », virus respiratoire syncytial
s.c	Sous-cutané
SDS	« Sodium Dodecyl Sulfate »
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
sIgA	Immunoglobuline A sécrétoire
Sm28-GST	Glutathion S-transférase de <i>Schistosoma mansoni</i>
spp.	« Subspecies », sous-espèce
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ssp.	Sous-espèce
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
subsp.	« Subspecies », sous-espèce
Tcf	« Tracheal Colonization Factor », facteur de colonisation trachéale
TCT	« Tracheal Cytotoxin », cytotoxine trachéale
TGF	« Transforming Growth Factor »
Th	Lymphocytes T auxiliaires
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
TTFC	Fragment C de la toxine tétanique
UDP	Uridine Di-Phosphate
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	« World Health Organization »
µg	Micogramme
µl	Microlitre
θ	thêta

*Résumé*

Le développement de vaccins capables de stimuler le système immunitaire muqueux, ou d'induire des réponses systémiques protectrices après administration par voie muqueuse, représente un objectif majeur de la recherche en vaccinologie. Plusieurs stratégies sont développées, afin de délivrer des antigènes protecteurs au niveau des muqueuses ; l'une d'entre elles consiste à utiliser des bactéries vivantes comme auxiliaires d'immunisation. Notre étude est basée sur l'exploitation des propriétés de deux bactéries différentes, *Bordetella pertussis* et *Lactobacillus plantarum*, dans le but de délivrer un antigène modèle, le fragment C de la toxine tétanique (TTFC), au système immunitaire muqueux.

*B. pertussis*, l'agent étiologique de la coqueluche, est une bactérie pathogène hautement adaptée à la colonisation des voies respiratoires. Une infection intra-nasale, chez l'homme et la souris, par ce microorganisme induit une immunité cellulaire et humorale muqueuse contre différents antigènes, en particulier contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA). L'efficacité de sécrétion de cette dernière, ainsi que sa capacité d'adhérence et ses propriétés immunologiques ont motivé son utilisation pour la présentation d'antigènes au niveau des muqueuses. Nous avons fusionné le gène *fha44*, codant un fragment N-terminal de la FHA, au gène codant la TTFC. Le transfert du gène hybride à la fois dans le chromosome de la souche sauvage de *B. pertussis* et dans le chromosome d'un mutant atténué a montré que les deux souches recombinantes étaient capables de sécréter une chimère Fha44::TTFC. Cependant, la taille de la protéine hybride était nettement inférieure à celle attendue, suggérant une importante dégradation protéolytique. Aucune réponse primaire n'a été détectée après administration intra-nasale des souches productrices de la chimère, chez la souris. Néanmoins, une réponse anticorps anti-TTFC significative a été obtenue après un rappel intra-nasal avec la TTFC purifiée.

*L. plantarum* est une bactérie non-pathogène de la famille des bactéries lactiques. Le genre *Lactobacillus* contient des espèces capables de coloniser les cavités corporelles telles que l'intestin ou le vagin. Certaines d'entre elles possèdent des propriétés adjuvantes et immunomodulatrices. Notre choix s'est porté sur *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826, une souche capable de résister à la barrière gastrique. Des constructions génétiques ont été réalisées dans le but de produire la TTFC dans trois localisations cellulaires différentes (cytoplasme, milieu extracellulaire, paroi bactérienne). Pour cela nous avons utilisé les signaux d'export et/ou d'ancrage de la protéine de surface M6 de *Streptococcus pyogenes*. Nous avons montré que les souches recombinantes produisaient la TTFC, en grande quantité dans le cytoplasme, et en quantité moindre, sous forme d'une chimère M6<sup>N</sup>::TTFC dans le milieu extracellulaire, ou sous forme d'une chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> ancrée à la paroi. Les constructions se sont révélées être instables au cours de la multiplication bactérienne. Néanmoins, l'administration des souches recombinantes par voies intra-gastrique et intra-nasale a conduit à l'induction de fortes réponses immunitaires locales et systémiques spécifique de la TTFC. Les taux d'anticorps anti-TTFC les plus élevés ont été obtenus avec la souche produisant de grandes quantités de TTFC dans le cytoplasme.

Nous avons montré, dans ce travail, que des souches recombinantes de *L. plantarum* et *B. pertussis* sont capables d'induire la production d'anticorps anti-TTFC après administration muqueuse. Ceci démontre qu'une bactérie non-pathogène peut être utilisée tout comme une bactérie pathogène atténuée, comme vecteur vivant de vaccination. L'amélioration des systèmes d'expression propres à chaque vecteur devrait permettre de produire d'autres antigènes d'intérêt et ouvre des perspectives importantes quant à la lutte contre les infections des muqueuses respiratoires, intestinales et urogénitales.

*Table des matières*

<b>Remerciements</b> .....	3
<b>Abréviations et nomenclature</b> .....	9
<b>Résumé</b> .....	13

## **Exposé bibliographique** ..... 21

<b>Chapitre I : La vaccination</b> .....	22
<b>A. Généralités</b> .....	23
1. Des pionniers à nos jours .....	23
2. Plan de développement d'un vaccin .....	27
3. Vaccins et mécanismes de la défense immunitaire .....	28
4. Amélioration des vaccins existants et développement de nouveaux vaccins .....	32
<b>B. Vaccination par voie muqueuse</b> .....	34
1. Avantages .....	34
2. Surfaces muqueuses .....	35
3. Système immunitaire muqueux .....	35
3.1. Immunité innée et adaptative au niveau des muqueuses .....	35
3.2. Rôle des IgA sécrétoires .....	38
3.3. Organisation des sites inducteurs .....	40
3.4. Caractéristiques des cellules M .....	42
3.5. Tolérance .....	44
4. Stratégies de vaccination .....	45
4.1. Vaccins vivants atténués .....	45
4.1.1. Vaccins viraux .....	46
4.1.2. Vaccins bactériens .....	46
4.2. Vaccins tués ou inactivés .....	47
4.3. Vaccins sous-unitaires .....	48
4.4. Adjuvants .....	50
4.5. Vecteurs synthétiques .....	51
4.6. Vaccins ADN .....	53

4.7. Plantes transgéniques .....	54
4.8. Vaccins recombinants vivants .....	55
4.8.1. Vecteurs viraux recombinants .....	55
4.8.2. Vecteurs bactériens recombinants.....	57
4.8.3. Modulation des réponses immunitaires stimulées par les vecteurs bactériens.....	60
<b>C. Exemple d'antigène modèle utilisé dans de nombreux systèmes de vaccination</b>	<b>61</b>
<b>Chapitre II : Les bactéries lactiques .....</b>	<b>66</b>
<b>A. Caractéristiques générales des bactéries lactiques .....</b>	<b>67</b>
1. Propriétés physiologiques et habitats .....	67
2. Identification et taxonomie .....	67
3. Propriétés liées à l'utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire .....	69
4. Lactocoques, streptocoques et lactobacilles .....	69
<b>B. Effets bénéfiques en santé humaine ou animale .....</b>	<b>74</b>
1. Définition d'un « probiotique » .....	75
2. Effet immunomodulateur .....	76
2.1. Stimulation de l'immunité innée .....	76
2.2. Stimulation de l'immunité spécifique .....	78
<b>C. Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs de vaccination .....</b>	<b>79</b>
1. Microbiologie et devenir <i>in vivo</i> .....	79
1.1. <i>Lactococcus lactis</i> .....	79
1.2. <i>Streptococcus gordonii</i> .....	80
1.3. <i>Lactobacillus</i> .....	80
2. Outils génétiques pour la production de protéines hétérologues .....	81
2.1. Plasmides .....	81
2.1.1. Les plasmides de type RCR .....	83
2.1.2. Les plasmides de type thêta .....	86
2.1.3. Vecteurs utilisés chez <i>Lactococcus</i> et <i>Lactobacillus</i> .....	89
2.2. Intégration .....	89

2.3. Promoteurs .....	90
2.3.1. Description .....	90
2.3.2. Promoteurs utilisés pour l'expression hétérologue chez les bactéries lactiques .....	91
2.4. Localisation de la protéine hétérologue .....	92
2.4.1. Localisation cytoplasmique .....	92
2.4.2. Sécrétion .....	93
2.4.3. Ancrage .....	94
3. Réponse immunitaire induite par les bactéries recombinantes.....	100
3.1. <i>Lactococcus lactis</i> .....	100
3.2. <i>Streptococcus gordonii</i> .....	103
3.2. <i>Lactobacillus</i> ssp. ....	105
<b>Chapitre III : <i>Bordetella pertussis</i></b> .....	108
<b>A. Caractéristiques générales de <i>B. pertussis</i> et de la coqueluche</b> .....	109
1. Le genre <i>Bordetella</i> .....	109
2. Manifestations cliniques de la coqueluche chez l'homme .....	109
2.1. Forme clinique de l'enfant non vacciné .....	109
2.2. Forme clinique du nourrisson non vacciné .....	110
2.3. Forme clinique de l'enfant et l'adulte immuns .....	110
3. Diagnostic et traitements .....	111
4. Epidémiologie .....	111
5. Vaccins .....	112
<b>B. Pathogénicité de <i>B. pertussis</i></b> .....	114
1. Infection .....	114
2. Facteurs de virulence .....	114
2.1. Adhésines .....	116
2.1.1. Fimbriae .....	116
2.1.2. Pertactine .....	119
2.1.3. Facteur de résistance au sérum.....	121
2.1.4. Facteur de colonisation trachéale .....	121
2.2. Toxines .....	121

2.2.1. Toxine pertussique .....	122
2.2.2. Adénylate cyclase-hémolysine .....	127
2.2.3. Toxine dermonécrotique .....	129
2.2.4. Cytotoxine trachéale .....	130
2.2.5. Lipopolysaccharide .....	130
3. Régulation de la virulence de <i>B. pertussis</i> .....	131
<b>C. L'hémagglutinine filamenteuse de <i>B. pertussis</i></b> .....	134
1. Activités d'adhésion .....	134
2. Structure et biogénèse .....	136
2.1. Structure primaire .....	136
2.2. Structure tertiaire.....	138
2.3. Sécrétion .....	138
3. Propriétés immunologiques .....	141
<b>D. Utilisation de <i>B. pertussis</i> comme vecteur vivant de vaccination</b> .....	143
<b>Objectifs du travail</b> .....	146
<b>Résultats</b> .....	149
<b>Chapitre I : Production du fragment C de la toxine tétanique dans trois localisations différentes chez <i>Lactobacillus plantarum</i> et mesure de l'immunogénicité</b> .....	150
Introduction au chapitre I .....	151
<b>A. Stratégies moléculaires visant à produire la TTFC dans trois localisations différentes : cytoplasme, milieu extracellulaire et paroi bactérienne</b> .....	152

---

<b>B. Analyse du comportement <i>in vitro</i> des souches recombinantes de <i>Lactobacillus plantarum</i> productrices de TTFC dans le cytoplasme, dans le milieu extracellulaire ou en surface de la bactérie .....</b>	<b>170</b>
Article 1 : « Study of the structural stability of plasmid constructions targeting the production of tetanus fragment C in three different locations in <i>Lactobacillus plantarum</i> » .....	172
<b>C. Etude de l'immunogénicité des souches recombinantes de <i>L. plantarum</i> productrices de TTFC dans trois localisations différentes.....</b>	<b>189</b>
Article 2 : «Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant <i>Lactobacillus plantarum</i> producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations ».....	190
<b>Chapitre II : Sécrétion du fragment C de la toxine tétanique par <i>Bordetella pertussis</i> et mesure de l'immunogénicité.....</b>	<b>214</b>
Article 3 : « Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant <i>Bordetella pertussis</i> » .....	217
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>225</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>232</b>
<b>Annexe : publications et communications .....</b>	<b>267</b>

---

*Exposé bibliographique*

## *Chapitre I : La vaccination*

## A. Généralités

### 1. Des pionniers à nos jours

Le tableau 1 résume les 200 ans d'histoire de la vaccination. La vaccinologie est née de l'observation que les personnes développant certaines maladies infectieuses n'étaient, souvent, pas atteintes une seconde fois. Cette observation est à l'origine de la technique de la « variolisation », qui consistait à transmettre volontairement la variole à des personnes en excellente santé dans l'espoir qu'elles ne contractent qu'une forme bénigne et protectrice de la maladie. Cette technique était efficace mais non sans danger. C'est dans ce contexte que se situe la contribution d'Edward Jenner, médecin de campagne anglais qui, en 1796, a eu l'idée d'effectuer la variolisation en transmettant non pas la variole humaine, mais celle de la vache, *variola vaccinae* (Jenner, 1798). Ce nouveau type de variolisation, désormais appelé « vaccination » se révélait sans danger et protégeait contre l'infection par la variole humaine.

Un siècle plus tard, Louis Pasteur a montré comment on pouvait utiliser directement les microorganismes provoquant les maladies pour obtenir l'immunisation. Les premiers résultats de Pasteur en matière de vaccins, en 1879, concernaient le choléra des poules, dû à une bactérie appelée aujourd'hui *Pasteurella* (Pasteur, 1880). Inoculées à une poule, quelques gouttes d'une culture de cette bactérie tuent l'animal. Pasteur a constaté que les poules auxquelles il administrait une culture vieillie, non seulement ne mouraient pas, mais étaient protégées contre une épreuve ultérieure avec une culture virulente. Le principe de la vaccination par des germes pathogènes atténués était ainsi découvert. Par la suite, Louis Pasteur a produit un vaccin atténué contre la maladie du charbon qui affecte les moutons, les chevaux, les bovins et l'homme (Pasteur et al., 1881). Il a tiré parti du fait qu'après croissance à 42°C, une souche de *Bacillus anthracis* perd sa capacité à sporuler et sa virulence pour l'hôte mais conserve un pouvoir protecteur.

Durant cette même période, Pasteur s'est engagé dans la lutte contre la rage. Il comptait appliquer la même stratégie que celle décrite, à savoir utiliser le microbe de la rage atténué comme vaccin. Le 6 juillet 1885, il a inoculé au petit Joseph Meister, mordu par un chien enragé, la moelle épinière desséchée prélevée sur un lapin auquel il avait administré le virus rabique. Cette tentative a été concluante ; dans ce cas-ci, l'agent infectieux n'était pas seulement atténué mais détruit par la chaleur tout en demeurant capable d'induire l'immunité. La voie était alors ouverte aux vaccins tués qui sont des agents infectieux inactivés par divers agents physiques ou chimiques. Cette technique a permis de développer les vaccins contre la

**Tableau 1.** Liste des vaccins humains développés depuis 200 ans (d'après Plotkin, 1999).

**BCG** : Bacille de Calmette et Guérin ; **C. diphtheriae** : *Clostridium diphtheriae* ; **C. tetani** : *Clostridium tetani* ; **IPV** : « Inactivated poliovirus » ; **N. meningitidis** : *Neisseria meningitidis* ; **OPV** : « Oral poliovirus » ; **S. pneumoniae** : *Streptococcus pneumoniae* ; **S. typhi** : *Salmonella typhi* ; **V. cholerae** : *Vibrio cholerae*.

Vaccins vivant atténués	Vaccins inactivés	Vaccins sous-unitaires	Vaccins recombinants
<b>18<sup>ème</sup> Siècle</b>			
Variole 1798			
<b>19<sup>ème</sup> Siècle</b>			
Rage 1885	Typhoïde 1896 Choléra 1896 Peste 1897		
<b>Début 20<sup>ème</sup> Siècle</b>			
Tuberculose 1927 (BCG)	Coqueluche 1926 Grippe 1936	Diphtérie 1923 ( <i>C. diphtheriae</i> ) Tétanos 1927 ( <i>C. tetani</i> )	
Après 1945			
Poliomyélite (OPV) 1962	Poliomyélite (IPV) 1955	Pneumonie ( <i>S. pneumoniae</i> )	Hépatite B
Rougeole 1964	Rage	Méningite ( <i>N. meningitidis</i> A,C)	(recombinant) 1981
Oreillons 1967	Encéphalites japonaises	Hépatite B (dérivé du plasma)	
Rubéole 1970	Hépatite A	<i>H. influenzae</i> PRP	Choléra
Adénovirus	Choléra ( <i>V. cholerae</i> )	Coqueluche (acellulaire)	(Toxine B)
Typhoïde ( <i>S. typhi</i> Ty21a)	+CTB	<i>H. influenzae</i> (conjugué PRP protéine)	
Varicelle		Encéphalite	Coqueluche
Infections à rotavirus		Typhoïde Vi ( <i>S. typhi</i> carbohydrate Vi)	(toxine pertussique)

fièvre typhoïde en 1886 (Salmon & Smith, 1886), contre le choléra en 1896 (Kolle, 1896) et contre la peste en 1897 (Haffkine, 1897).

Par la suite, Pasteur et Roux constatèrent que certaines manifestations pathologiques sont moins le fait des microorganismes eux-mêmes que des toxines qu'ils sécrètent. En 1923, Ramon a introduit le processus d'inactivation de la toxine diphtérique puis tétanique par le formaldéhyde sans perte de l'immunogénicité. Ces « anatoxines » constituaient alors une nouvelle classe de vaccins, les vaccins sous-unitaires. Ce sont des substances chimiques immunisantes provenant de microorganismes infectieux.

Dans les années suivantes, le développement de ces 3 types de vaccins, vaccins vivants atténués, vaccins tués et vaccins sous-unités, a permis de lutter contre d'autres maladies infectieuses. En 1927, Calmette et Guérin ont mis au point le vaccin contre la tuberculose, le BCG (Bacille de Calmette et Guérin). La souche vaccinale a été obtenue par cultures successives d'une souche virulente de *Mycobacterium bovis*, agent étiologique de la tuberculose bovine (Calmette & Guérin, 1911). Son administration à un nouveau-né a démontré son efficacité dans la protection contre la tuberculose (Calmette, 1927). A la même époque, les premiers essais d'immunisation contre la coqueluche ont été entrepris par utilisation de la bactérie virulente *Bordetella pertussis* inactivée chimiquement ou par la chaleur (voir Fine & Clarkson, 1987). Quelques années plus tard, les vaccins contre la grippe (1937) et contre la fièvre jaune (1938) ont été mis au point. Après la seconde guerre mondiale, la révolution de la culture cellulaire ouverte par Enders a permis le développement de la plupart des vaccins viraux vivants ou tués. En 1955, Jonas Salk a produit le poliovirus à l'aide de cellules de rein de singe en culture. Le virus inactivé au formaldéhyde était injecté par voie musculaire. En 1957, Albert Sabin a développé un vaccin oral contre la poliomyélite en atténuant le virus par passages répétés sur des cellules de primates en culture. Cette explosion de la technologie a résulté en l'émergence de vaccins encore utilisés de nos jours, comme le vaccin tué injectable contre la poliomyélite et les vaccins contre la rougeole, les oreillons et la rubéole.

Au cours des 40 dernières années, la révolution de la microbiologie a permis, grâce au développement d'approches génétiques et moléculaires, l'élaboration de nouveaux vaccins et l'amélioration de vaccins existants. Par exemple, la génétique moléculaire est mise à contribution lorsque la culture de l'agent infectieux est difficile, dangereuse, voire impossible. Elle peut alors permettre la construction de microorganismes recombinés destinés à servir « d'usine » à produire les molécules vaccinales. Cette approche a été suivie pour la production

du premier vaccin recombinant utilisé chez l'homme : le vaccin contre l'hépatite B, constitué d'une protéine de surface du virus (protéine S) produite chez la levure (McAleer et al., 1984). Enfin, une nouvelle voie s'est ouverte depuis peu, conceptuellement différente, celle des vaccins ADN. Dans ce cas, il ne s'agit plus d'injecter des produits, vivants ou non, déclenchant directement une réponse immunitaire, mais d'injecter des gènes, c'est-à-dire de l'ADN, conduisant l'organisme à produire lui-même les molécules immunisantes. Cette voie a été ouverte par la démonstration en 1990 que l'injection de plasmides, par voie intramusculaire chez la souris, conduisait à l'expression des gènes modèles qu'ils portent (gènes de la luciférase, de la  $\beta$ -galactosidase et de la chloramphenicol acetyltransférase) et donc à la synthèse de protéines susceptibles d'induire une réaction immunitaire (Wolff et al., 1990).

Bien que la vaccination ait conduit au contrôle d'une grande partie des maladies infectieuses pendant les 200 années passées, de nouvelles (SIDA, hépatite C) et anciennes (tuberculose, malaria, infections respiratoires aiguës) maladies infectieuses ont tué 17 millions de personnes encore en 1997 (Pardigon & Laouini, 1999). Cependant, les vies de 3 millions d'enfants ont été sauvées grâce au Programme Elargi d'Immunisation (EPI) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), prouvant que la vaccination est un outil efficace pour la prévention et le contrôle des maladies infectieuses. L'impact le plus spectaculaire de la vaccination est sans conteste l'élimination définitive de la variole en 1978. Quand en 1967, l'OMS a lancé la campagne d'éradication de la variole, la maladie touchait annuellement jusqu'à 15 millions de personnes et provoquait deux millions de décès. Par la suite, la poliomyélite a été choisie comme autre cible d'éradication. En effet, un programme de vaccination massive a été lancé par l'OMS en 1988 avec comme objectif final l'année 2000 (Wright et al., 1991). Malgré le succès remarquable de l'élimination du virus sur le continent Américain, des foyers existent toujours en Afrique, dans les pays du Maghreb, reculant les objectifs d'éradication complète de plusieurs années (Cochi et al., 1997). Dans une étude globale sur les progrès et les perspectives de la vaccination en 1996, l'OMS et le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF) soulignent les progrès accomplis par l'EPI dans le monde entier ainsi que les efforts consentis contre la rougeole, le tétanos néonatal, la diphtérie, la coqueluche, la tuberculose, l'hépatite B et la fièvre jaune. D'autres vaccins, pourtant disponibles, restent peu utilisés dans les pays en développement, notamment celui contre *Haemophilus influenzae* de type b (Hib), l'agent bactérien le plus couramment responsable de la méningite, mais aussi ceux contre la rubéole, la varicelle, l'encéphalite japonaise, l'hépatite A, le choléra et la fièvre

typhoïde, en raison notamment du coût élevé de ces vaccins et d'un manque de données sur l'incidence de la maladie. Enfin, plusieurs vaccins sont en cours de développement contre une soixantaine d'agents responsables de maladies infectieuses incluant, le virus respiratoire syncytial, les rotavirus, le VIH, le virus de la dengue, les bactéries telles que le méningocoque du groupe B, *Shigella*, *Escherichia coli* entéro-toxigénique (ETEC) et les parasites comme *Plasmodium falciparum* et *Schistosoma*.

## 2. Plan de développement d'un vaccin

En plus des aspects immunologiques, le développement d'un vaccin doit prendre en compte différentes données économiques, épidémiologiques, environnementales, sanitaires, politiques et culturelles qui sont souvent très différentes entre un pays développé et un pays en voie de développement (PVD). Ainsi les caractéristiques définies pour un vaccin idéal selon l'OMS incluent la capacité à induire une réponse appropriée et une protection de longue durée contre plusieurs maladies à la fois (en particulier chez le jeune enfant), une administration facile, l'absence d'effets secondaires, une bonne stabilité dans des conditions environnementales particulières et un prix raisonnable.

La première étape dans le programme de développement d'un vaccin est de savoir s'il sera utilisé pour prévenir la maladie (vaccin prophylactique) ou pour la traiter (vaccin thérapeutique). Mis à part le vaccin basé sur le BCG pour le traitement de carcinomes de la vessie (Lockyer & Gillatt, 2001), tous les vaccins commercialisés actuellement sont prophylactiques. Alors que la plupart des vaccins thérapeutiques sont à un stade avancé du développement clinique et qu'ils ont montré des résultats prometteurs, aucun d'entre eux n'a prouvé son efficacité sur le terrain dans le traitement du cancer, de l'auto-immunité ou de l'infection.

La deuxième étape du plan de développement est l'étude épidémiologique de la maladie pour cibler une population en particulier. L'épidémiologie de la maladie indique l'âge auquel le vaccin doit être administré. Plusieurs maladies pédiatriques se développent après les 2 ou 3 premiers mois de la vie, période à laquelle les anticorps maternels diminuent et le système immunitaire n'est pas complètement développé. Le début de la vaccination infantile est donc fixé à 2 mois. Pour les maladies néonatales, la vaccination des femmes enceintes est particulièrement indiquée dans le but de transmettre des anticorps protecteurs au nouveau-né. Pour les maladies sexuellement transmissibles, la vaccination des adolescents est idéale. Dans

toutes les maladies, l'épidémiologie doit être étudiée et bien comprise avant d'initier un programme de développement.

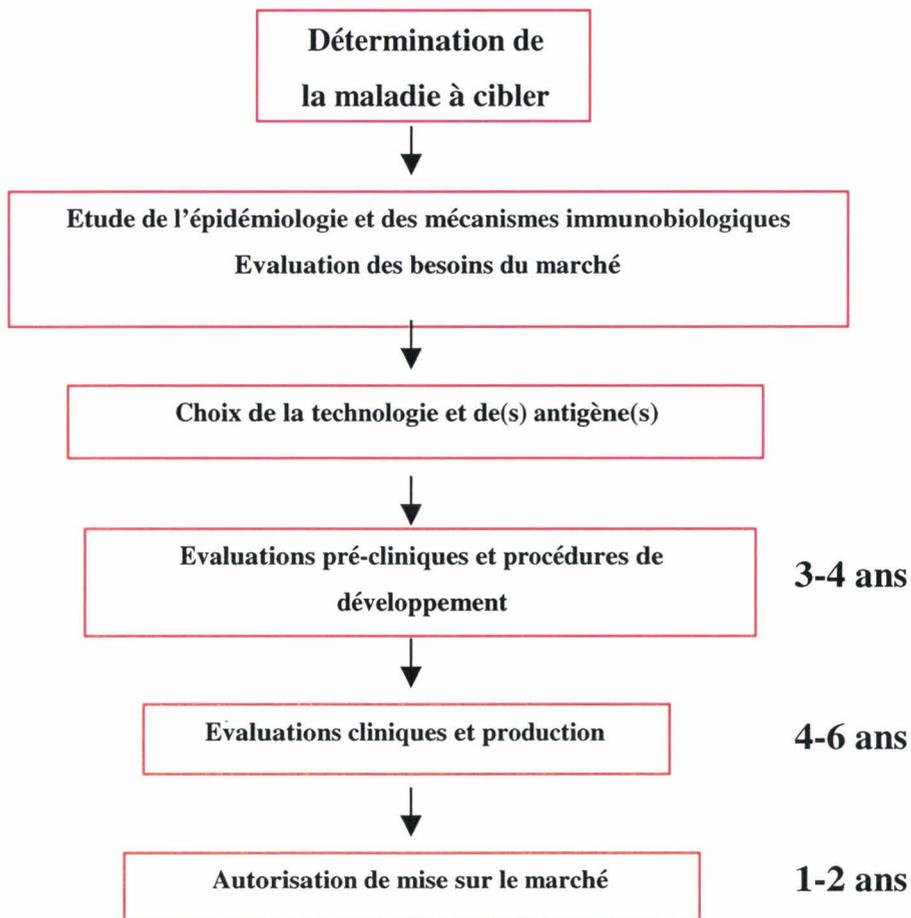
L'étude de l'immunobiologie de la maladie est très importante également pour comprendre les mécanismes immunitaires mis en œuvre lors de l'infection et ainsi identifier de nouveaux antigènes comme candidats vaccinaux.

A côté du besoin médical, il est important de confirmer qu'il existe bien un marché pour le nouveau produit justifiant l'investissement dans un programme de développement.

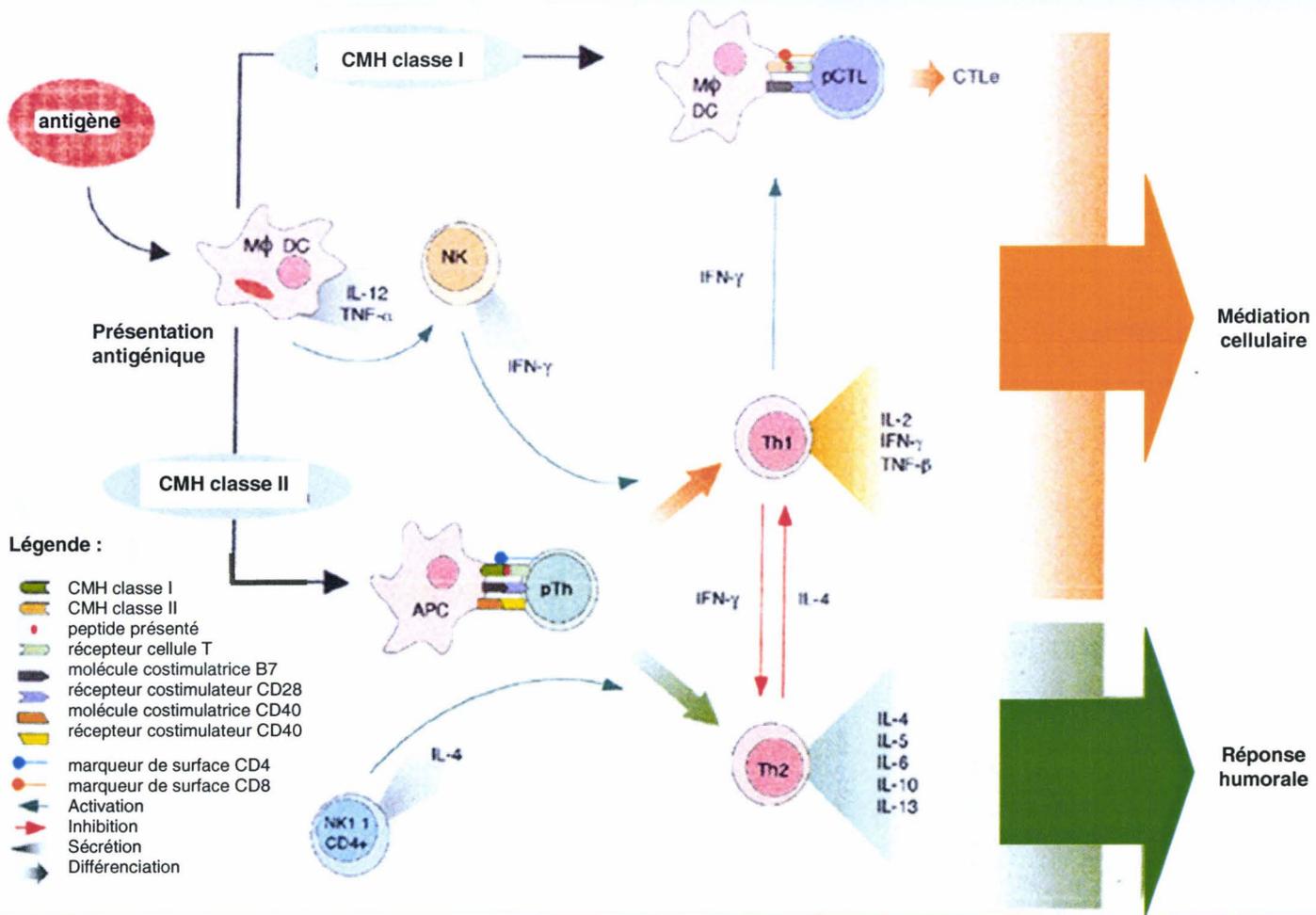
A partir de ces données, une ou plusieurs technologies sont sélectionnées pour l'élaboration du vaccin parmi les différentes catégories : vaccin vivant, vaccin inactivé, vaccin sous-unitaire. Dès que la technologie est sélectionnée, le plan de développement du produit est engagé et il s'étendra sur plus de 10 ans jusqu'à la mise sur le marché. Pendant cette période, différentes étapes se succéderont comme l'évaluation pré-clinique, le développement de procédés, les essais cliniques, le marketing et la production (Figure 1).

### **3. Vaccins et mécanismes de la défense immunitaire**

Toute réponse immunitaire implique la reconnaissance de l'agent pathogène suivie du développement d'une réaction destinée à l'éliminer. Les réponses immunitaires sont classées en 2 grandes catégories : les réponses innées et les réponses adaptatives ou spécifiques. Une réponse adaptative est hautement spécifique d'un pathogène particulier et augmente, en principe, à chaque nouveau contact avec le même microorganisme. Le système immunitaire spécifique garde la mémoire de l'agent infectieux et peut empêcher son action pathogène lors d'un nouveau contact. Les deux propriétés essentielles de la réponse adaptative sont donc la spécificité et la mémoire. Dans la nature, cette réponse est obtenue lors d'une infection mais avec le risque d'une issue fatale. La vaccination, s'appuyant sur les notions de spécificité et de mémoire, apprend au système immunitaire à reconnaître l'agent pathogène, sans risquer la maladie. Les cellules à l'origine des réponses immunitaires adaptatives et responsables de la reconnaissance spécifique des microorganismes sont les lymphocytes. Les lymphocytes B différenciés sécrètent des anticorps spécifiques bloquant l'adhésion et l'invasion des pathogènes ou neutralisant les facteurs de virulence et les toxines. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques ou macrophages) en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les peptides antigéniques présentés en association avec le CMH de classe II peuvent être reconnus par les lymphocytes T auxiliaires (Th pour « T helper »)



**Figure 1.** Stratégie et calendrier de développement d'un vaccin (d'après Ellis, 2001).



**Figure 2.** Orchestration de la réponse immunitaire. Après capture de l'antigène par la cellule présentatrice, l'antigène est dégradé et présenté dans un contexte CMH classe I ou classe II aux cellules T CD8+ (CTLs) ou CD4+ (Th1 ou Th2), respectivement. MΦ : macrophage, DC : cellule dendritique, APC : cellule présentatrice de l'antigène, pTh : précurseur de lymphocytes T auxiliaires, pCTL : précurseur de lymphocytes T cytotoxiques, NK : cellules « natural killer ».

alors que les peptides présentés en association avec le CMH de classe I sont reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs pour « cytotoxic T lymphocytes ») (Figure 2). Les molécules CD4 ou CD8, présentes à la surface des cellules Th ou CTLs respectivement, augmentent la liaison entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes. L'individu vacciné produit des anticorps spécifiques contre le pathogène ainsi que des cellules B et T capables de reconnaître l'agent pathogène de façon à pouvoir le combattre lors de l'infection.

Les cellules T jouent un rôle important dans la réponse immunitaire et sont essentielles pour la mise en place d'une mémoire immunitaire. Elles régulent la production d'anticorps par les cellules B et elles donnent lieu à la multiplication des cellules T cytotoxiques, responsables de la destruction des cellules infectées de l'hôte. L'orientation de la réponse vers l'immunité humorale (production d'anticorps) ou vers l'immunité à médiation cellulaire (production de cellules cytotoxiques) résulte principalement de la balance entre les cytokines produites par les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire. En effet, selon les cytokines présentes, la réponse T auxiliaire sera orientée vers une activité de type I (Th1) ou de type II (Th2). La réponse Th1 est caractérisée par la production d'IL-12, d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de TNF- $\beta$  (« Tumor Necrosis Factor »). Ces cytokines induisent la synthèse d'oxyde d'azote (NO) dans les macrophages pour augmenter leur activité microbicide. La réponse Th1 est souvent accompagnée de l'activation des cellules NK (natural killer) et des CTLs. La réponse Th2 est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-10 et par la maturation des cellules B conduisant à la production d'anticorps (Mosmann & Sad, 1996).

Le lieu de l'infection et la nature de l'agent infectieux déterminent quel type de réponse immunitaire sera efficace. La différence la plus importante réside dans la capacité du microorganisme à se développer ou non dans les cellules de l'hôte (pathogènes intracellulaires). Tous les virus, certains parasites et bactéries peuvent se multiplier dans les cellules de l'hôte. Pour guérir ces infections, le système immunitaire devra reconnaître et détruire les cellules infectées via une réponse de type Th1. Par contre, de nombreuses bactéries et parasites peuvent se localiser dans les tissus ou les liquides biologiques. Une réponse de type Th2 sera alors requise pour combattre ces pathogènes dits extracellulaires. Certains pathogènes intracellulaires migrent dans le sang ou dans d'autres liquides biologiques pour atteindre leurs cellules cibles. Pendant cette migration, ils pourront être neutralisés par les éléments du système immunitaire qui normalement reconnaissent les pathogènes extracellulaires.

La vaccination a donc pour objectif de déclencher la réponse la plus adaptée contre le pathogène de façon à contrecarrer l'infection et ses conséquences. La mise au point d'un vaccin protecteur nécessite ainsi une bonne compréhension de la pathogenèse de la maladie ciblée et de l'immunologie de la vaccination.

#### 4. Amélioration des vaccins existants et développement de nouveaux vaccins

Plusieurs vaccins existants mériteraient d'être améliorés, tel que le BCG qui n'est pas toujours efficace pour une bonne protection contre la tuberculose. Cette maladie est causée par *Mycobacterium tuberculosis*, bactérie intracellulaire qui infecte les macrophages alvéolaires. L'efficacité du BCG est discutée du fait de sa déficience en certains antigènes présents chez *M. tuberculosis*. Ainsi, l'immunogénicité du vaccin pourrait être augmentée par utilisation d'un BCG recombinant produisant des antigènes de *M. tuberculosis*. L'amélioration du vaccin contre la tuberculose pourrait également s'effectuer par l'induction d'une meilleure réponse T cytotoxique. Pour cela, diverses stratégies sont mises en œuvre, telles que l'utilisation de BCG comme vecteur d'immunomodulation pour la production de cytokines ou la vaccination ADN. La recherche de mutants atténués de *M. tuberculosis* constitue une autre approche pour la vaccination contre la tuberculose (Kaufmann & Hess, 2000).

La mise au point de vaccins plus adaptés aux pays en voie de développement, comme le vaccin contre la rougeole, constitue également une priorité. Dans les pays développés, la vaccination contre la rougeole est effectuée entre 12 et 18 mois, période pendant laquelle le vaccin n'est pas neutralisé par les anticorps transmis par la mère. Cependant, dans les pays non industrialisés beaucoup d'enfants meurent si le vaccin n'est pas administré plus tôt. Or le vaccin traditionnel, souvent inefficace en présence des anticorps produits par la mère, induit peu d'INF- $\gamma$  ainsi qu'une réponse cytotoxique faible chez le nourrisson. L'utilisation d'un vaccin ADN, couplé à des séquences CpG, permettrait d'obtenir une meilleure réponse Th1 (Siegrist, 2000).

Un autre enjeu important de la vaccination est la lutte contre les maladies transmissibles, parasitaires ou virales, comme la malaria, la schistosomiase ou le SIDA, touchant principalement les PVD. La compréhension du cycle de vie de *Plasmodium falciparum* est fondamentale pour le développement d'un vaccin contre la malaria. En effet, selon le stade de l'infection, le parasite peut être retrouvé soit au niveau du foie, soit au niveau du sang. Ainsi, la mise au point d'un vaccin est basée sur l'identification des cibles antigéniques selon le stade d'infection et la recherche d'un système de délivrance qui induirait la réponse

immunitaire désirée à chaque étape de la maladie. En effet, une réponse T CD8<sup>+</sup> est requise contre le parasite au stade d'infection du foie pour éliminer les hépatocytes infectés. De plus, une réponse anticorps permettrait de contrôler la parasitémie et de prévenir la transmission de la maladie par le sang (Miller & Hoffman, 1998 ; Hoffman & Doolan, 2000). Un vaccin contre la schistosomiase, basé sur l'utilisation de la glutathion S-transférase (GST) comme antigène protecteur (Riveau et al., 1998), est en cours d'essai clinique actuellement. Il vise à induire la production d'IgE et d'IgA neutralisants contre la GST permettant de contrôler la progression de la maladie en réduisant la production d'œufs par les femelles ainsi qu'en diminuant leur capacité d'attachement et leur viabilité. Le développement urgent d'un vaccin contre le SIDA se heurte aux mécanismes d'échappement au système immunitaire que le virus met en place, comme par exemple la variation antigénique. Cette variation affecte le plus souvent la liaison des anticorps au virus, par la modification des structures exposées à sa surface au cours de la réplication. L'administration successive d'un virus recombinant vivant et d'un vaccin sous-unitaire, constitué d'une glycoprotéine de surface (gp120) du VIH, permettrait dans un premier temps de contrôler la réplication du virus par induction d'une réponse cytotoxique et dans un second temps d'induire la production d'anticorps neutralisants anti-gp120 (Girard et al., 1999).

L'émergence d'agents résistants aux antibiotiques conduit à la relance du développement de nouveaux vaccins, ciblant par exemple les maladies diarrhéiques. Actuellement, l'utilisation de vaccins vivants atténués délivrés par voie orale contre *Vibrio cholerae*, *Shigella*, ETEC, *Salmonella typhimurium* semble être l'option la plus prometteuse (Levine & Noriega, 1995). La possibilité de vacciner également contre des infections du tractus urinaire ou contre d'autres pathogènes des muqueuses, comme les rotavirus, le virus de l'herpès simplex, *Borrelia* et *Staphylococcus aureus*, serait la bienvenue.

En plus des applications prophylactiques, l'approche vaccinale est fréquemment évoquée comme thérapie de maladies infectieuses telles que les infections chroniques (hépatites B et C, SIDA, leishmaniose, tuberculose), les maladies auto-immunes (Aichele et al., 1994) ou les cancers (Raychaudhuri & Rock, 1998), dont certains ont une origine microbienne. C'est le cas du cancer gastrique qui est fréquemment associé à une infection de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori*. La plupart des approches étudiées pour le développement d'un vaccin contre *H. pylori* sont basées sur l'utilisation d'antigènes protecteurs impliqués dans la pathogénie de l'infection comme l'uréase, VacA (« vacuolating cytotoxin »), CagA (« cytotoxin-associated antigen ») ou NAP (« neutrophil-activating protein ») (Del Giudice et al., 2001).

Plusieurs exemples cités ci-dessus illustrent le besoin de développer de nouveaux vaccins ciblant les nombreuses infections et maladies muqueuses contre lesquelles le déclenchement d'une réponse immunitaire locale est souvent essentiel. Comme décrit ci-dessous, ce type de réponse est généralement plus aisé à induire grâce à des vaccins administrés par voie muqueuse.

## **B. Vaccination par voie muqueuse**

### **1. Avantages**

Les surfaces muqueuses telles que les tractus gastro-intestinal, respiratoire et génital sont les sites principaux d'entrée, de colonisation ou de transit de la plupart des pathogènes. La protection contre de tels agents infectieux dépend souvent de la capacité à générer des réponses locales visant à inactiver le pathogène avant l'infection proprement dite. Alors que les vaccins administrables par voie parentérale stimulent principalement des réponses systémiques, les vaccins administrés par voie muqueuse miment la réponse immunitaire induite par une infection naturelle et peuvent ainsi conduire à des réponses muqueuses et systémiques efficaces (McGhee J.R. et al., 1992). L'administration par voie muqueuse offre en outre plusieurs avantages par rapport à l'immunisation parentérale. Elle minimise les effets secondaires en évitant le contact direct entre la circulation systémique et les composants potentiellement toxiques du vaccin. L'administration par voie muqueuse réduit également le besoin en personnel spécialisé requis pour l'administration d'injections et permet d'éviter l'utilisation de seringues. Enfin, la vaccination contre de multiples maladies devient de plus en plus complexe, à moins de pouvoir les associer. L'administration de vaccins associés serait plus aisée par voie muqueuse et permettrait de réduire le nombre de vaccins injectés par voie parentérale. En conséquence les vaccins administrables par voie muqueuse sont particulièrement appropriés pour des programmes d'immunisation massive, ciblant entre autres des individus moins immunocompétents, tels que les enfants en bas âge et les personnes âgées.

## **2. Surfaces muqueuses**

La surface corporelle occupée par les muqueuses est considérable chez l'être humain : environ 400m<sup>2</sup>, dont 250m<sup>2</sup> associés au tube digestif (Brandtzaeg et al., 1999). L'épithélium muqueux de la cavité orale, du pharynx, de l'œsophage, de l'urètre ou du vagin est constitué de cellules en strates comprenant entre autres des cellules dendritiques migratoires, chargées de la présentation d'antigènes. Dans l'intestin et le tractus respiratoire, l'épithélium est constitué d'une simple couche de cellules. La capture de l'antigène est principalement assurée par des cellules spécialisées, appelées cellules M (pour « microfolds ») caractérisées par leur membrane en microreplis (Neutra et al., 1996). Les cellules M sont présentes au niveau des amas lymphoïdes appelés plaques de Peyer dans l'intestin. Elles présentent un grand intérêt pour le développement de nouveaux vaccins qui visent à cibler ce site inducteur majeur.

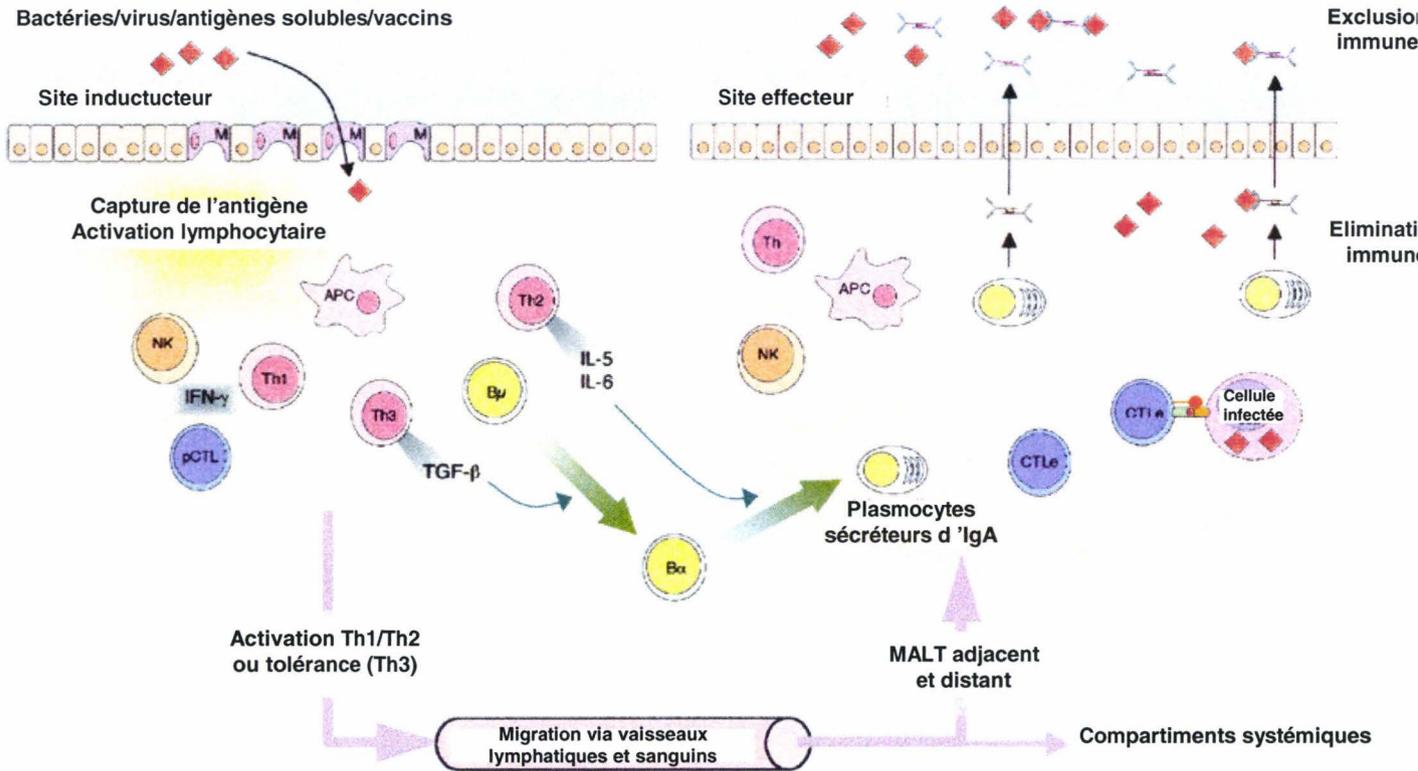
Les surfaces muqueuses constamment exposées à différents agresseurs (virus, bactéries, parasites et champignons) sont protégées par un système immunitaire propre aux muqueuses, relativement indépendant du système immunitaire systémique.

## **3. Système immunitaire muqueux**

La tâche du système immunitaire associé aux muqueuses est encore plus délicate que celle du système immunitaire systémique. Il doit distinguer les molécules propres à l'organisme (le soi) des molécules étrangères (le non-soi) tout comme le système immunitaire systémique. Mais il doit de plus être capable de différencier les microorganismes pathogènes, contre lesquels il défend l'organisme, des microorganismes inoffensifs ou commensaux, contre lesquels aucune réponse immune n'est requise ou même désirable. Il est vital que cette tolérance s'étende également aux antigènes alimentaires.

### **3.1. Immunité innée et adaptative au niveau des muqueuses**

Les surfaces muqueuses sont protégées à la fois par des mécanismes de défense non immunitaires et par les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les mécanismes innés sont initiés lors de la rétention des pathogènes dans le mucus. Le mouvement du mucus par battements des cils dans les poumons et le péristaltisme dans l'intestin aident à prévenir l'attachement des pathogènes aux surfaces muqueuses, constituant ainsi une première barrière de défense. D'autres mécanismes, tels que la compétition avec les microorganismes



**Figure 3.** Organisation du MALT et de l'immunité muqueuse. L'antigène est capturé au niveau des sites inducteurs via les cellules M et est présenté par les APC. Les lymphocytes activés migrent vers le MALT adjacent ou distant via les vaisseaux lymphatiques et sanguins. Les cellules B, sous l'action du TGF- $\beta$ , de l'IL-5 et l'IL-6, se différencient en plasmocytes sécréteurs d'IgA. Au niveau des sites effecteurs, l'élimination de l'antigène peut se faire par la voie des CTLs ou via la capture par les IgA. APC : cellules présentatrices de l'antigène, Th : lymphocytes T auxiliaires, NK : cellules « natural killer », B : lymphocytes B, pCTL/eCTL : CTL précurseurs/effecteurs.

commensaux, la destruction des pathogènes par le pH acide de l'estomac ou la digestion enzymatique dans le tractus gastro-intestinal, permettent la protection des surfaces muqueuses. Les cellules épithéliales jouent un rôle important dans l'immunité innée puisqu'elles peuvent être stimulées en présence du pathogène à produire des cytokines pro-inflammatoires conduisant à l'élimination de ce dernier (Jung et al., 1995; Laurent et al., 1997; Rasmussen et al., 1997). Dans d'autres sites, les sécrétions muqueuses jouent également un rôle protecteur ; ainsi, dans les larmes, la paroi des bactéries est endommagée par action d'une enzyme, le lysozyme, qu'elles contiennent.

La réponse adaptative muqueuse consiste en grande partie en la production locale d'immunoglobulines A sécrétoires (sIgA), anticorps prédominants à cet endroit et de loin les plus abondants dans tout le corps (Conley & Delacroix, 1987; Lamm, 1997a; Lamm, 1997b).

Le système immunitaire muqueux est constitué de sites inducteurs où l'antigène est capté et dégradé pour initier la réponse, et de sites effecteurs où la réponse est exprimée (Figure 3). Au niveau des sites inducteurs, les antigènes franchissent la barrière muqueuse principalement grâce aux cellules M par un phénomène de transcytose intracellulaire et sont présentés aux cellules du système immunitaire associé aux muqueuses (Hathaway & Kraehenbuhl, 2000). Les antigènes entrent en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sous-jacentes, sont dégradés et activent les cellules Th1, T2 et les cellules T régulatrices (Th3). Les cellules B sont alors stimulées pour devenir des plasmocytes producteurs d'IgA. Suite à la stimulation antigénique, les cellules T et B activées quittent les sites inducteurs, sont transportées via les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions drainants où ils se différencient, et entrent dans la circulation sanguine (Figure 3). Les lymphocytes effecteurs, comme les cellules T-auxiliaires, les lymphocytes cytotoxiques et les cellules B productrices d'IgA, rejoignent ensuite les sites effecteurs présents au niveau de la muqueuse dont ils sont issus ou au niveau des autres muqueuses. Ce phénomène est à l'origine du concept du « système immunitaire muqueux général », qui s'étend aux différentes cavités muqueuses (Mestecky, 1987). Le retour des lymphocytes vers les muqueuses est médié via leur liaison spécifique aux cellules endothéliales des veinules qui sillonnent les muqueuses. Les lymphocytes portent à leur surface des molécules d'adhérence, la L-sélectine et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , qui ont une forte affinité pour les molécules MAdCAM-1, présentes à la surface des cellules endothéliales (Shyjan et al., 1996).

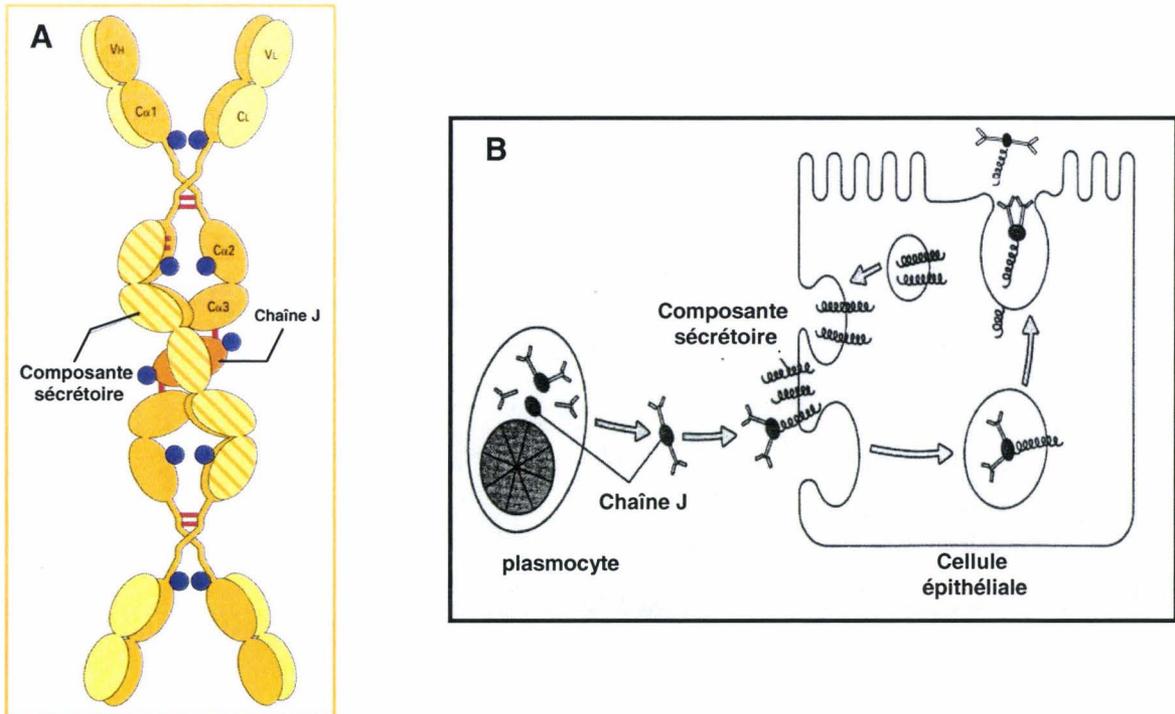
### 3.2. Rôle des IgA sécrétoires (sIgA)

La majorité des IgA synthétisées par les plasmocytes aux sites effecteurs l'est sous forme dimérique. Les deux molécules d'IgA sont reliées au niveau des régions constantes de leurs chaînes lourdes par un peptide appelé chaîne J, également produit par les plasmocytes (Figure 4A). Les cellules épithéliales des muqueuses possèdent des récepteurs d'immunoglobulines polymériques sur leur membrane basolatérale (Mestecky & McGhee, 1987). L'IgA dimérique se lie au récepteur, est internalisée puis transportée à travers la cellule épithéliale vers le pôle apical où le récepteur est clivé et l'anticorps sécrété dans la lumière intestinale. Une partie du récepteur reste attachée à l'anticorps formant la composante sécrétoire qui rend l'anticorps plus résistant à la protéolyse (Figure 4B).

Plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer le rôle protecteur des IgA sécrétoires. Ces anticorps représentent une barrière immunitaire qui empêche l'attachement des pathogènes aux cellules épithéliales (Michetti et al., 1992). Les sIgA possèdent également la propriété de neutraliser les virus au niveau intracellulaire (Mazanec et al., 1992). Les sIgA sont capables d'inhiber l'activité de certaines enzymes ou toxines. Cet effet résulte d'un encombrement stérique du site de fixation des enzymes à leur substrat ou à leur cellule cible (Kilian et al., 1988). Enfin, les sIgA permettent de diminuer un excès d'antigènes en formant des complexes immuns, qui seront piégés dans le mucus et éliminés par le péristaltisme intestinal ou par le système de transport mucociliaire des voies respiratoires (Kraehenbuhl & Neutra, 1992 ; Kaetzel et al., 1994).

Une fois sécrétées dans le lumen, les sIgA n'adhèrent pas à la surface apicale des entérocytes mais sélectivement à celle des cellules M (Roy & Varvayanis, 1987). Dans ce cadre, Corthésy et al. ont utilisé les IgA sécrétoires comme vecteurs muqueux de vaccination. Ainsi, l'expression d'un épitope protecteur de l'invasine de *Shigella flexneri* au sein de la composante sécrétoire des IgA, a permis d'obtenir des réponses immunitaires contre l'invasine après administration orale des anticorps recombinants (Corthesy et al., 1996).

Les sIgA ne sont pas les seuls effecteurs du système immunitaire muqueux. La cytotoxicité médiée par les lymphocytes T, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) et l'activité des cellules natural killer (NK) peuvent également se développer au niveau des tissus muqueux, en particulier au niveau de l'épithélium gastro-intestinal (McGhee D.W. et al., 1992).



**Figure 4. A.** Structure d'un dimère d'IgA sécrétoire humain.

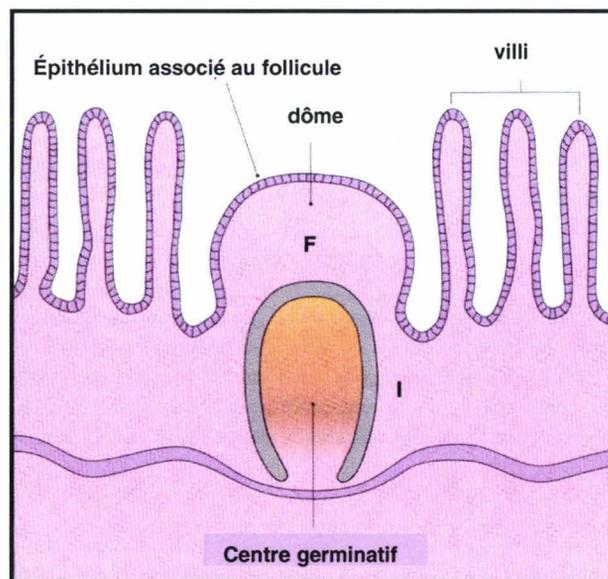
Les IgA monomériques (jaune) sont reliées par leur extrémité C-terminale grâce à la chaîne J (orange). La composante sécrétoire, constituée de 5 domaines (hâchures jaunes), est greffée au dimère et attachée par deux ponts disulfure (rouge) au domaine C $\alpha$ 2 de chaque monomère. **B.** Transport d'IgA à travers l'épithélium muqueux. Le dimère d'IgA sécrété par le plasmocyte dans la lamina propria se fixe sur son récepteur sur la surface interne de la cellule épithéliale. Le complexe sIgA-récepteur est endocyté et transporté via une vésicule de transport. La vésicule fusionne avec la membrane plasmique à la surface luminale et relargue le dimère d'IgA. La composante sécrétoire (spirale) dérive du clivage du récepteur et protège le dimère d'IgA des enzymes protéolytiques du lumen.

### 3.3. Organisation des sites inducteurs

Les sites inducteurs sont constitués d'agrégats organisés de cellules lymphoïdes connus sous le nom de « tissu lymphoïde organisé associé aux muqueuses » (MALT, pour « Mucosal-Associated Lymphoïd Tissue »). Les MALT ont leur organisation propre et sont désignés par des noms spécifiques : le GALT (« Gut-Associated Lymphoïd Tissue ») pour la muqueuse intestinale, le BALT (« Bronchus-Associated Lymphoïd Tissue ») pour la muqueuse bronchique et le NALT (« Nasal-Associated Lymphoïd Tissue ») pour la muqueuse nasale.

Le GALT est représenté par les plaques de Peyer (Figure 5), l'appendice et les ganglions mésentériques (Staats & McGhee, 1996). Les plaques de Peyer, décrites pour la première fois par Peyer en 1677, sont des follicules lymphoïdes de la paroi de l'intestin grêle qui se projettent dans la lumière intestinale en formant un dôme (Peyer, 1677). Les follicules contiennent des lymphocytes B et T ainsi que des cellules présentatrices spécialisées, comme les cellules dendritiques et les macrophages. L'épithélium recouvrant le dôme des plaques de Peyer est appelé épithélium associé au follicule (FAE, « Follicle-Associated Epithelium ») et contient les cellules M, spécialisées dans la capture des antigènes.

En 1973, Bienenstock et al. ont décrit des agrégats folliculaires dans la paroi bronchique chez le lapin et ont inventé le terme de BALT (Bienenstock et al., 1973). Plus tard, il est devenu évident qu'il existait des différences majeures entre le GALT et le BALT et que ce dernier était très différent d'une espèce à l'autre. Cependant des structures semblables aux plaques de Peyer ont été décrites et, chez certaines espèces comme la souris, des cellules similaires aux cellules M du FAE sont retrouvées dans l'épithélium bronchique (Teitelbaum et al., 1999 ; Tango et al., 2000). Chez l'homme sain, Tschernig et Pabst ont récemment rapporté que le BALT ne semble être présent que chez l'enfant et l'adolescent (Tschernig & Pabst, 2000). Ces mêmes auteurs ont montré que le BALT peut être « induit » par une infection microbienne par exemple. Les caractéristiques du MALT sont différentes entre les voies respiratoires hautes et basses (NALT et BALT). Par exemple, le nombre de cellules B contenant des IgA est plus important dans le nez que dans les bronches (McDermott & Snider, 1997). Chez l'homme, de larges agrégats de lymphocytes peuvent être identifiés au niveau de l'oronasopharynx. En complément d'un MALT organisé, les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires sont particulièrement efficaces pour la capture de petits antigènes solubles (Holt et al., 1990). De nombreuses études montrent que la stimulation du système immunitaire muqueux à un site donné peut conduire à la production d'IgA sécrétoires au

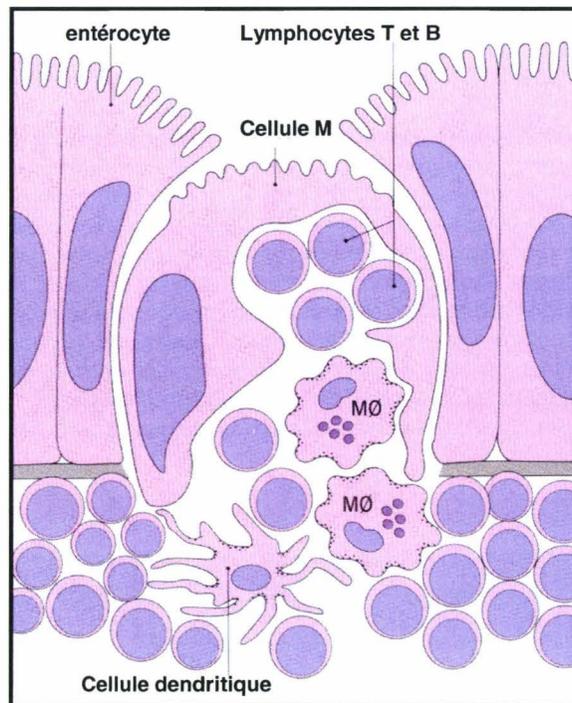


**Figure 5.** Structure d'une plaque de Peyer. Les antigènes sont capturés à partir du lumen à travers l'épithélium folliculaire pour être apprêtés dans le dôme. Le follicule (F) et son centre germinatif sont composés en grande partie de cellules B. Les espaces interfolliculaires (I), composés de cellules T, contiennent à la fois des veinules endothéliales par lesquels les lymphocytes T entrent dans le follicule et des vaisseaux lymphatiques par lesquels les lymphocytes T quittent les plaques de Peyer.

niveau d'autres muqueuses (Mestecky et al., 1997). Par exemple, la stimulation des plaques de Peyer dans le tractus gastro-intestinal active les cellules B productrices d'IgA dans l'intestin mais aussi dans les bronches et le tractus urogénital (Nugent et al., 1998). L'immunité génitale peut aussi être obtenue par immunisation rectale (Lehner et al., 1993) ou intra-nasale (Johansson et al., 1998; Mielcarek et al., 2000). Il existerait néanmoins une compartimentalisation du système immunitaire muqueux général, c'est-à-dire que les cellules B productrices d'IgA originaires d'un site inducteur migreraient préférentiellement à certains sites effecteurs plutôt qu'à d'autres (Mestecky & McGhee, 1992). La re-circulation des cellules B se ferait du NALT aux voies aérodigestives supérieures et des muqueuses digestives basses au tractus urogénital. Les cellules B stimulées au niveau du GALT retourneraient principalement dans le tractus gastro-intestinal. Cette compartimentalisation du système immunitaire muqueux général aurait donc un impact sur le choix de la voie d'immunisation. Par exemple, une immunisation orale ne serait pas aussi efficace qu'une immunisation rectale pour induire la production de sIgA dans le tractus génital, mais elle serait plus appropriée pour l'induction d'une immunité gastro-intestinale (Chen, 2000).

#### 3.4. Caractéristiques des cellules M

La surface apicale des cellules M humaines diffère de celle des autres cellules épithéliales de l'intestin par l'absence de bordure en brosse typique et par la présence de micropilis (Owen & Jones, 1974). Les cellules M présentent une large invagination de la membrane basale formant une poche dans laquelle se nichent les cellules lymphoïdes (Figure 6). La distance entre le côté externe (apical) et le côté interne (basolatéral) des cellules M est courte, et les antigènes les traversent assez facilement par transcytose. La villine, protéine associée à l'actine, confinée dans les microvillosités des entérocytes, est distribuée de façon diffuse dans les cellules M (Kerneis et al., 1996). Ceci pourrait expliquer la capacité des cellules à répondre rapidement à l'adhérence d'un microorganisme par la phagocytose. Une autre différence entre les cellules M et les entérocytes concerne les lectines qu'elles peuvent lier au niveau de leur surface apicale. Les cellules M sont capables de lier les lectines portées par des microorganismes tels que *E. coli* entéro-adhérent (Inman & Cantey, 1983), *Salmonella typhimurium* (Clark et al., 1994) et *Yersinia enterocolitica* (Autenrieth & Firsching, 1996). Ces microorganismes exploitent les cellules M pour traverser la barrière épithéliale.



**Figure 6.** Schéma d'une cellule M au sein de l'épithélium d'une plaque de Peyer. La cellule M comporte des microvilli de forme irrégulière et de petite taille. Elle forme une poche dans laquelle se logent les cellules lymphoïdes intra-épithéliales.

Par exemple, *Yersinia pseudotuberculosis* se lie à l'intégrine- $\beta$ 1, exprimée sur la membrane apicale des cellules M, grâce à son invasine (Clark et al., 1998). Les cellules M sont spécialisées dans la capture des antigènes et leur transport vers les cellules du système immunitaire muqueux. La capacité des cellules M à lier et transporter des macromolécules, des particules et des microorganismes adhérents a été largement observée mais les mécanismes impliqués sont peu connus. Par exemple, on ne sait pas pourquoi des particules inertes, comme les billes de latex (Pappo & Ermak, 1989), les microsphères de polymères biodégradables (Ermak et al., 1995) ou les liposomes (Zhou et al., 1995), adhèrent plus facilement aux cellules M qu'aux entérocytes. De plus, les cellules M sont capables de phagocyter des bactéries non invasives, comme *Vibrio cholerae*, et de les transporter du côté basolatéral (Owen et al., 1986). La capacité des cellules M à capter les antigènes particuliers peut, en partie, être déterminée par l'absence de microvilli organisés et de glycocalyx. De plus, la couche de mucus est plus fine au niveau des cellules M et ceci faciliterait leur accessibilité aux antigènes du lumen (Owen, et al., 1986). Il n'en est pas de même pour les antigènes solubles qui peuvent être captés par les entérocytes, pour être ensuite dégradés en peptides et acides aminés. Le contact de tels peptides avec le système lymphoïde de l'intestin, en dehors des sites inducteurs du MALT, ne génère pas de réponse IgA sécrétoire (Bland & Warren, 1986). Ce phénomène est connu sous le nom de tolérance orale. Elle évite à l'organisme de développer des réponses contre les antigènes alimentaires rencontrés chaque jour. Cette tolérance peut également être induite par d'autres muqueuses.

### 3.5. Tolérance

La tolérance correspond à un état d'insensibilité immunologique spécifique vis-à-vis d'un antigène. La persistance de l'antigène assure la longévité de la tolérance qui dépendrait aussi de la dose initiale : l'absorption d'une dose importante déclenche une tolérance plus longue qu'une dose faible. De plus, l'administration orale répétée d'un antigène déclenche généralement une meilleure tolérance que son application unique, même à haute dose. Dans l'acquisition de la tolérance, il semblerait qu'une administration unique aurait pour conséquence une délétion (par apoptose) ou une inactivation (par anergie) de certains lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Un autre mécanisme, basé sur l'expansion de cellules T régulatrices (Th3) productrices de cytokines immunosuppressives (IL-4, IL-10 et TGF- $\beta$ ), interviendrait lors de l'administration répétée de l'antigène pour diminuer la capacité

de réponse des cellules T. De nombreux travaux sont en cours afin de tirer parti du phénomène de tolérance pour la prévention et le traitement des maladies auto-immunes, de l'allergie ou du rejet d'allogreffes (Bergerot et al., 1997; Tamura et al., 1997 ; Ma et al., 1998).

#### **4. Stratégies de vaccination**

Presque tous les vaccins utilisés actuellement sont dirigés contre des infections virales ou bactériennes. Ils sont basés sur 3 technologies différentes : microorganismes vivants atténués, microorganismes entiers inactivés et préparations sous-unitaires. De nouvelles approches, principalement basées sur l'utilisation de bactéries non pathogènes, de plantes ou d'ADN recombinant, font aujourd'hui l'objet de recherches actives. Le seul vaccin utilisé de routine pour une administration par voie muqueuse est le vaccin oral contre la poliomyélite (vaccin vivant atténué). Après un bref rappel sur les différentes stratégies utilisées actuellement, nous nous intéresserons aux systèmes les plus prometteurs parmi la liste grandissante de systèmes de vaccination par voie muqueuse.

##### **4.1. Vaccins vivants atténués**

L'infection naturelle de plusieurs pathogènes induit des réponses immunitaires fortes à la fois au niveau systémique et au niveau muqueux et ces réponses sont souvent protectrices contre une ré-infection. L'utilisation de virus ou de bactéries vivants atténués comme vaccins permettrait donc de prévenir et de contrôler une infection par la souche sauvage, du fait de leur potentiel de stimulation de réponses immunitaires différentes et complémentaires. De plus, la majorité des pathogènes microbiens colonisent ou entrent dans l'organisme au niveau des muqueuses et ont donc élaboré des stratégies pour contourner les barrières physico-chimiques naturelles. L'atténuation de la virulence d'un agent pathogène à des fins vaccinales nécessite d'atteindre un équilibre entre l'atténuation qui élimine tout symptôme toxique chez l'hôte, en particulier pour la santé des enfants, des personnes immunocompromises ou des personnes âgées, et le maintien d'un pouvoir infectieux minimum (colonisation et réplication) qui suscite une réponse immunitaire protectrice contre la maladie naturelle (Sansonetti, 1989).

#### 4.1.1. Vaccins viraux

Il existe 3 approches pour développer de tels vaccins :

- La première est basée sur l'utilisation de virus naturellement pathogènes chez un hôte différent de celui qu'on souhaite vacciner, mais non pathogènes pour l'individu ciblé. Cette méthode a été utilisée par Jenner pour lutter contre la variole humaine en vaccinant avec l'agent de la variole de la vache (« cowpox »), virus apparenté à celui qui infecte l'homme (« smallpox »).
- Plus généralement, l'atténuation est obtenue par propagation du virus sur des cellules de l'hôte en culture sous des conditions différentes de celles rencontrées chez l'hôte infecté. Ces conditions, non favorables à sa croissance, conduisent à l'atténuation spontanée de leur virulence. Les vaccins contre la poliomyélite, la rougeole et la fièvre jaune sont des représentants de cette catégorie.
- La troisième approche concerne les virus infectant le tractus respiratoire de l'homme. Elle consiste à sélectionner des mutants sensibles à la température, qui poussent bien à une température inférieure à celle du corps. En théorie, la croissance des mutants devrait être restreinte aux voies respiratoires supérieures où la température est de 28-30°C. Ils pourraient alors induire une réponse immunitaire et ne provoquer que de légers symptômes (Chanock & Murphy, 1980). De tels mutants ont été obtenus pour le virus de la grippe (Maassab & DeBorde, 1985). La stabilité de ces mutations étant discutable, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de tels vaccins utilisables chez l'homme.

#### 4.1.2. Vaccins bactériens

En contraste avec le succès obtenu pour les vaccins viraux atténués, le BCG est longtemps resté le seul vaccin bactérien atténué connu. Cependant, une approche rationnelle a été utilisée pour plusieurs bactéries pathogènes : l'altération des voies métaboliques essentielles ou des mécanismes de la virulence, en inactivant des groupes de gènes clairement identifiés. Un vaccin atténué contre la fièvre typhoïde a été obtenu par élimination de l'antigène bactérien O, composant essentiel du lipopolysaccharide de surface de *Salmonella typhi*. Le mutant *galE* de *Salmonella typhi* (Ty21a) n'exprimant pas l'UDP-galactose-4-épimérase en absence de galactose, testé pour son atténuation chez l'homme, a été utilisé dans un vaccin distribué dans

plusieurs pays (Germanier & Fuer, 1975). Des travaux ultérieurs ont montré que la souche vaccinale Ty21a contenait une mutation, initialement non détectée, qui la rendait sensible aux stress environnementaux (Robbe-Saule et al., 1995) et contribuait ainsi à l'innocuité du vaccin. Une étude chez l'homme a montré que le vaccin Ty21a est beaucoup moins toxique que le vaccin à germes entiers, mais la protection est moins importante dans le temps malgré l'administration de 3 doses (Engels & Lau, 2000).

Des mutations ciblées dans les gènes de biosynthèse des acides aminés aromatiques (*aroC* ou *aroD*) ont permis d'atténuer *Salmonella typhi* et ont conduit à l'élaboration d'un vaccin oral atténué CVD 908 bien toléré et hautement immunogénique (Levine et al., 1996). Le même type de mutations (*aroC* et *aroD*), associées à une mutation dans un gène de biosynthèse des purines (*purE*), a conduit à l'atténuation de la virulence de *Shigella flexneri*, pathogène de l'intestin (Cersini et al., 1998). L'administration de ce double mutant par voie intra-gastrique chez l'animal permet d'obtenir une protection comparable à celle obtenue avec la souche sauvage (Bernardini et al., 2001).

Malgré ces exemples encourageants, l'atténuation par mutations ponctuelles ciblées reste peu sûre. Le gène ciblé devrait être idéalement supprimé pour limiter la réversion par recombinaison avec les bactéries présentes au site d'administration du vaccin. L'atténuation de *Vibrio cholerae*, par délétion de la cassette de virulence contenant les gènes codant différentes toxines, a permis de développer une étude clinique pour le test d'un vaccin contre le choléra (Taylor et al., 1999). D'autres microorganismes, comme *Bordetella pertussis*, sont en cours d'atténuation par utilisation de ce même principe (Locht, 1999) (voir section D chapitre III).

#### 4.2. Vaccins tués ou inactivés

Généralement, les vaccins inactivés sont plus sûrs que les vaccins atténués mais ils nécessitent souvent des administrations répétées et en grande quantité. La protection est plutôt de courte durée et les réactions secondaires, dues aux endotoxines bactériennes, sont courantes. Les vaccins inactivés entiers induisent généralement la production d'anticorps neutralisants mais ne génèrent pas de réponse cytotoxique, requise contre les microorganismes intracellulaires. Les vaccins bactériens inactivés étaient bienvenus dans les années 1890 quand il n'y avait pas d'autres moyens de prévenir des maladies infectieuses. Ceci a spécialement été le cas de la fièvre typhoïde. Le même principe a été appliqué pour développer des vaccins contre la coqueluche, les maladies diarrhéiques ou les infections à méningocoques mais avec moins de

succès. Seuls les vaccins contre la fièvre typhoïde et contre la coqueluche ont survécu jusqu'à maintenant. Néanmoins, il existe actuellement des vaccins améliorés contre ces deux maladies : le vaccin pertussique (contre la coqueluche) est ainsi remplacé par un vaccin sous-unitaire (Mortimer, 1994) et un vaccin vivant atténué (*Salmonella typhi* Ty21a) remplace le vaccin inactivé contre la fièvre typhoïde (Germanier & Fuer, 1975).

Le bilan pour les vaccins viraux inactivés est meilleur, mais ils ne sont pas aussi efficaces que les vaccins atténués. Il serait intéressant de coupler les avantages des deux systèmes et d'associer efficacité et innocuité, par administrations successives d'un vaccin inactivé (moins efficace, plus sûr) puis d'un vaccin atténué (plus efficace, moins sûr). En effet, le premier assure la protection contre un effet potentiel du second qui, lui, induit une immunité à plus long terme. Cette approche a été proposée pour la vaccination contre la poliomyélite aux Etats-Unis (ACIP, 1997).

#### 4.3. Vaccins sous-unitaires

Les anticorps produits par immunisation avec des microorganismes vivants atténués ou tués sont dirigés contre un grand nombre d'épitopes des différents antigènes qui composent le microorganisme. Cependant, des réponses immunitaires efficaces peuvent être générées par immunisation avec des composants individuels d'organismes bactériens ou viraux. Les vaccins sous-unités, à base de composés purifiés, offrent l'avantage de ne pas inclure de composés toxiques dans les préparations vaccinales comparés aux vaccins entiers. Par contre, la purification des composants microbiens peut altérer leurs sites antigéniques et générer des anticorps qui seront partiellement réactifs avec l'antigène natif. De plus, la réponse immunitaire générée par un vaccin à germes entiers est probablement plus élevée que la somme des réponses contre chaque composant d'un vaccin sous-unités, du fait de l'activité adjuvante de certaines molécules sur d'autres.

La génération d'anticorps protecteurs ou neutralisants dirigés contre un agent pathogène, tant intracellulaire qu'extracellulaire, est souvent une exigence pour l'élaboration d'un vaccin. Les épitopes reconnus par de tels anticorps sont fréquemment portés par une ou plusieurs protéines présentes à la surface externe du microorganisme. L'isolement ou la synthèse de tels composants est à la base des premiers vaccins sous-unités développés contre le virus de la grippe et contre l'hépatite B (Thomssen et al., 1983). Les vaccins sous-unitaires contre le tétanos ou la diphtérie sont basés sur une situation particulière où la première exigence est la

neutralisation de l'activité de la toxine sécrétée par la bactérie, activité qui est la cause essentielle de la maladie.

Les vaccins à base d'un unique composant purifié sont théoriquement attractifs : le stimulus immunitaire est dirigé principalement contre l'épitope ou l'antigène protecteur et les réactions secondaires dues à des composants additionnels sont évitées. Cependant, il peut être difficile d'identifier de tels épitopes immunodominants. De plus, beaucoup de pathogènes ont développé des moyens pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Ainsi, une mutation conduisant à une légère modification de la molécule ciblée par la vaccination peut conduire à sa non-reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Ce phénomène est désigné sous le nom de variation antigénique. Les polysaccharides de surface des bactéries encapsulées sont un bon exemple de ce problème. Ainsi, pour les pneumocoques et les méningocoques, il a été montré chez des patients ou des animaux de laboratoire qu'un antisérum contre un polysaccharide de capsule pouvait être efficace mais l'effet était spécifique de la capsule d'un sérotype particulier (Chudwin, 1989 ; Casadevall & Scharff, 1994). Ainsi, les différents types antigéniques ou les sérotypes dominants (90 pour les pneumocoques et 3 pour les méningocoques) doivent être pris en compte pour l'élaboration d'un vaccin à valences multiples. Dans le cas des méningocoques, les polysaccharides sont facilement purifiables en grande quantité et leur utilisation comme vaccin a été efficace dans le cas des groupes A et C (Gold & Artenstein, 1971; Wahdan et al., 1973). Cependant, les polysaccharides du groupe B ne sont pas ou peu immunogéniques, en particulier chez le jeune enfant, du fait de leur ressemblance avec les polysaccharides des protéines N-CAM présentes à la surface de certaines cellules humaines ou animales (Finne et al., 1983). Quant aux polysaccharides du groupe C, ils ne sont pas immunogéniques chez le jeune enfant. Le sérotype C possède une capsule appelée « polysaccharide pédiatrique » parce qu'ils sont plus fréquemment rencontrés chez le nourrisson ou le jeune enfant que chez l'adulte. L'incapacité à répondre à ce type de polysaccharides réside dans le fait que certains d'entre eux sont T-indépendants. Les cellules T reconnaissent les petits peptides présentés en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Les polysaccharides T-indépendants peuvent directement stimuler l'activation des cellules B, leur multiplication et la production d'anticorps. Les étapes de maturation des cellules B sont cependant très lentes dans les premières années de la vie, rendant difficiles les interactions cellules B/polysaccharides (Barrett et al., 1992). La mise au point d'un vaccin à base de polysaccharides sous une forme capable d'interagir avec les cellules T a d'abord été réalisée pour *H. influenza* type b, agent de la méningite. La conjugaison chimique de polysaccharides

de capsule avec une protéine (toxine tétanique) a permis d'induire chez le nourrisson une réponse T-dépendante caractérisée par une mémoire immunologique et la prédominance d'anticorps de type IgG (Kurikka et al., 1996). L'application de cette technologie a conduit au déclin spectaculaire de l'incidence de la maladie (Hargreaves et al., 1996). Des essais cliniques ont débuté avec ce même type de vaccin contre les pneumocoques (Eskola & Anttila, 1999). L'augmentation de l'immunogénicité par conjugaison des polysaccharides à une protéine porteuse implique que celle-ci agisse comme adjuvant sur les polysaccharides.

#### 4.4. Adjuvants

Un adjuvant est un composé qui, combiné à un antigène, permet d'induire une réponse immunitaire plus rapide, plus forte et/ou de plus longue durée. Depuis plusieurs années, la recherche d'adjuvants fait l'objet de nombreuses études du fait du développement de vaccins sous-unités. Ces préparations vaccinales sont souvent peu immunogènes et nécessitent d'administrer plusieurs doses de vaccins à des concentrations élevées afin d'obtenir une immunité protectrice durable et d'éviter l'installation d'une tolérance. Parmi les adjuvants les plus étudiés (Gupta & Siber, 1995) on peut citer :

- les sels d'aluminium et de calcium,
- les composants bactériens : lipopolysaccharides de surface (LPS), muramyl dipeptide, monophosphoryl lipid A ou parois de mycobactéries tuées (adjuvant complet de Freund),
- les saponines (Quil A).

L'utilisation d'adjuvants chez l'homme est freinée par l'effet toxique et les effets secondaires que la plupart d'entre eux exercent. Seuls les sels d'aluminium (Alum) sont aujourd'hui acceptés comme adjuvant chez l'homme. La majorité des substances adjuvantes étudiées sont utilisées par voie parentérale. Néanmoins certaines molécules comme la toxine labile (LT) d'*E. coli* et la toxine cholérique (CT) de *Vibrio cholerae* sont décrites comme étant capables d'exercer une puissante activité comme adjuvants muqueux (Holmgren et al., 1993 ; Douce et al., 1995). Leur toxicité et leurs effets secondaires potentiels empêcheraient cependant leur utilisation chez l'homme (Snider et al., 1994). L'obtention de mutants de l'ADP-ribosyltransférase a permis d'obtenir des dérivés non toxiques de la LT et la CT tout en conservant leur activité adjuvante (Yamamoto et al., 1997 ; Giuliani et al., 1998). Cependant, l'administration intra-nasale de LT génétiquement modifiée entraîne une altération de la muqueuse respiratoire, une infiltration inflammatoire des méninges et le passage de la toxine dans le cerveau (Garçon, 1999).

Récemment, il a été montré que SfbI («fibronectin-binding protein I» de *Streptococcus pyogenes*) était un adjuvant efficace capable d'améliorer substantiellement les réponses cellulaires et humorales ainsi que la réponse muqueuse, quand elle est couplée ou co-administrée avec l'ovalbumine par voie nasale (Medina et al., 1998a; Medina et al., 1998b). L'utilisation de SfbI induit une réponse Th2 dominante et permet la stimulation de la réponse T cytotoxique.

Enfin, Poulain-Godefroy et al. ont montré que l'incorporation de l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *Bordetella pertussis* avec la glutathion S-transférase de *Schistosoma mansoni* (Sm28-GST) dans des vecteurs synthétiques (liposomes) augmente l'immunogénicité de l'antigène par voie intra-nasale. L'ajout de 3µg de FHA aux liposomes induit des titres d'anticorps anti-Sm28-GST dix fois plus élevés que dans le cas où les liposomes ne contiennent pas de FHA. L'augmentation de la réponse immunitaire contre la Sm28-GST dépend de la dose de FHA incorporée, sans que le profil isotypique ne soit modifié (Poulain-Godefroy et al., 1998).

La capacité des cytokines à réguler et augmenter les réponses immunitaires rend attrayante la possibilité de les inclure dans les préparations vaccinales, comme l'ont montré des études utilisant l'IL-6 (Larsen et al., 1998) ou l'IL-1 (Staats & Ennis, 1999).

Enfin, l'ADN bactérien contenant des motifs immunostimulants, comme les séquences CpG non méthylées, peut déclencher une réponse caractérisée par la production de cytokines de type Th1. Ces motifs sont capables d'augmenter la réponse immunitaire envers différents antigènes vaccinaux (Klinman et al., 1999).

#### 4.5. Vecteurs synthétiques

Les antigènes solubles, administrés par voie muqueuse, sont généralement sensibles à la dégradation enzymatique et au pH acide au niveau de l'estomac, et sont de ce fait moins immunogéniques que les antigènes particuliers. Leur incorporation dans des « véhicules » non-toxiques permet de les protéger de la dégradation, augmente leur capture par les surfaces muqueuses et peut exercer un effet adjuvant.

Plusieurs types de vecteurs synthétiques sont à l'étude : il peut s'agir de polymères mucoadhésifs (Gizurason et al., 1995), de microsphères biodégradables ou de particules lipidiques, comme les liposomes ou les ISCOM (« Immuno-Stimulating Complexes »). Les microsphères biodégradables les plus étudiées sont composées de polymères d'acides lactique

et glycolique (PLG) dans lesquels sont incorporés des antigènes ou de l'ADN. Le taux de libération de l'antigène peut être contrôlé par le taux de dégradation de la particule, déterminé par sa composition et son poids moléculaire (Cleland, 1995). Ainsi, l'administration nasale ou orale de particules de PLG contenant la glutathion S-transférase de *S. mansoni* induit une réponse humorale de longue durée avec un pic à 10 semaines après l'immunisation (Baras et al., 1999). D'autres polymères biodégradables ont été explorés, comme le chitosan (Jabbal-Gill et al., 1998), l'amidon, le dextran ou l'alginate (Schroder & Stahl, 1984 ; Bowersock et al., 1994; Heritage et al., 1998).

Les liposomes sont des particules sphériques constituées de couches lipidiques concentriques renfermant un cœur aqueux (Childers et al., 1994). L'utilisation de liposomes permet la co-administration d'antigènes et d'adjuvants, augmentant significativement les réponses immunitaires. Par exemple, la conjugaison de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) à des liposomes contenant un antigène de *Streptococcus mutans* (« saliva-binding region » de l'adhésine AgI/II) a permis d'augmenter considérablement leur efficacité par voie orale (Harokopakis et al., 1998). De plus, il a été montré que l'IL-12 augmente la réponse sérique quand elle est administrée par voie intra-nasale avec des liposomes contenant des glycoprotéines recombinantes du virus de l'herpès de type I (Baca-Estrada et al., 1999).

Les ISCOM sont constitués d'un mélange de lipides de cholestérol et de saponine (Quil A). A titre d'exemple, l'utilisation d'ISCOM pour délivrer des protéines d'enveloppe du virus respiratoire syncytial (RSV) permet d'induire de fortes réponses IgG sériques après administration intra-nasale chez des souris BALB/c. Elle permet également l'induction de fortes réponses IgA dans les poumons, le tractus respiratoire supérieur ainsi que dans les tractus intestinal et génital (Hu et al., 1999). Le principal avantage des ISCOM vient de la combinaison des propriétés adjuvantes de la saponine et de l'immunogénicité de l'antigène incorporé. Leur application chez l'homme est en cours d'évaluation clinique (Cox et al., 1998).

Les caractéristiques attrayantes des vecteurs synthétiques sont contrebalancées par de sérieux désavantages. Leur faible taux d'absorption, souvent inférieur à 1% de la dose ingérée, rend cette approche coûteuse. De plus, l'utilisation de solvants pendant l'incorporation des antigènes peut sévèrement compromettre l'immunogénicité ou la non toxicité de tels vaccins.

#### 4.6. Vaccins ADN

Depuis la découverte que l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique codant un antigène résultait en l'expression durable du gène qu'il porte et pouvait ainsi induire des réponses humorales et cellulaires, le concept de l'utilisation d'ADN comme vaccin a été très exploré (Gurunathan et al., 2000). L'approche « ADN nu » est basée sur un principe simple : le gène codant l'antigène vaccinal est placé sous le contrôle d'un promoteur fort dans un plasmide qui ne se réplique pas chez l'organisme à vacciner. Injecté par voie intramusculaire, l'ADN est pris en charge par les cellules musculaires et atteint le noyau où il est transcrit. L'ARNm est ensuite transporté dans le cytosol et traduit. L'antigène est produit dans les cellules de l'individu vacciné et ainsi directement pris en charge par les cellules présentatrices exprimant les molécules du CMH I pour la stimulation des cellules T cytotoxiques. A titre d'exemple, l'injection intramusculaire chez la souris d'ADN plasmidique codant la nucléoprotéine A (NP) du virus de la grippe a permis de générer une réponse CTL spécifique de la NP (Ulmer et al., 1993). Le plasmide peut de plus contenir des séquences immunostimulantes, les CpG non méthylées, qui lui confèrent une activité adjuvante intrinsèque (Klinman et al., 1996). Bien que le plasmide ne se réplique pas chez l'individu vacciné, il y persiste pendant quelques semaines et conduit pendant cette période à une production continue d'antigène.

Cette approche peut être envisagée aussi bien dans un but prophylactique que thérapeutique. Un grand nombre d'antigènes ont été testés (Watts & Kennedy, 1999). Des essais cliniques sont en cours chez l'homme pour les vaccins contre VIH-1 (MacGregor et al., 1998), *Herpes simplex*, *Influenza*, mais aussi contre la malaria (Wang et al., 1998).

Cette approche a également retenu l'attention des vaccinologues pour l'immunisation par voie muqueuse. Ainsi, l'administration intra-nasale chez la souris d'ADN plasmidique codant l'hémagglutinine du virus de la grippe induit une protection contre une épreuve intra-nasale avec le virus (Fynan et al., 1993). De même, l'instillation intra-vaginale d'ADN plasmidique codant une glycoprotéine d'enveloppe de VIH-1 permet la production d'IgA et d'IgG dans les sécrétions vaginales et d'anticorps neutralisants dans le sérum (Wang et al., 1993). Une étude récente rapporte l'utilisation de la technologie du « gene-gun » pour transfecter les tissus muqueux et stimuler la production d'anticorps locaux dans le tractus génital de rats femelles (Livingston et al., 1998). Le « gene-gun » est un dispositif qui délivre, sous pression d'hélium, des micro-particules d'or enrobées d'ADN plasmidique. Dans cette étude, les

auteurs ont utilisé un gène rapporteur, le gène de l'hormone de croissance humaine, pour étudier son expression dans les tissus muqueux.

Plusieurs formulations ont été développées pour faciliter la capture du plasmide et sa protection vis-à-vis de la dégradation dans le micro-environnement muqueux, en utilisant les liposomes ou le monophosphoryl lipid A déjà décrits plus haut. Dans le cas de l'administration orale, l'ADN plasmidique peut aussi être protégé de la dégradation dans l'intestin par encapsulation dans des micro-particules de PLG (Chen S.C. et al., 1998). Une alternative récemment développée utilise *Salmonella thyphimurium*, bactérie intracellulaire, comme véhicule d'ADN (Darji et al., 1997).

Les vaccins ADN offrent plusieurs avantages : (i) ils peuvent coder plusieurs épitopes et générer à la fois des réponses humorales et cellulaires (ii) les épitopes immunogéniques sont, en principe, présentés au système immunitaire sous leur forme native (iii) les vecteurs plasmidiques sont rapidement construits et leur purification est peu coûteuse (iv) l'ADN est thermostable, diminuant les contraintes de stockage et de transport rencontrées pour la plupart des vaccins actuels. Malgré l'enthousiasme concernant le développement de ce nouveau type de vaccin, des incertitudes persistent sur le risque d'intégration de l'ADN à des sites chromosomiques aléatoires, du fait entre autres de la présence de séquences de virus oncogènes dans beaucoup de constructions plasmidiques.

#### 4.7. Plantes transgéniques

Le concept de la production de vaccins dans les plantes transgéniques a été introduit récemment (Mason et al., 1992). Cette approche offre l'avantage de pouvoir produire les plantes localement et d'éviter ainsi les problèmes économiques et logistiques posés par le transport sur de longues distances. Plusieurs systèmes de transformation et d'expression chez les plantes ont été développés (Walmsley & Arntzen, 2000). Le tabac et la pomme de terre, utilisés comme modèles, permettent la production d'antigènes microbiens comme la sous-unité B de la toxine labile (LTB) d'*E. coli* et les VLP (« Virus-Like Particles ») du virus de Norwalk (Mason et al., 1996 ; Lauterslager et al., 2001). Lors d'un essai clinique chez l'homme, l'ingestion de pommes de terre transgéniques, exprimant la LTB, a conduit à l'induction de réponses locales et systémiques spécifiques de la LTB (Tacket et al., 1998). En dehors de la pomme de terre, d'autres plantes sont étudiées pour l'élaboration de vaccins comme la tomate, la banane, la laitue, le riz, le blé, le maïs et le soja, et chacune présente ses propres caractéristiques. Par exemple, la pomme de terre est pourtant facile à cultiver et ne

nécessite pas de réfrigération au cours du stockage ; mais elle est pratiquement toujours consommée cuite, or la chaleur dénature les protéines. La banane ne nécessite pas de cuisson mais la maturation du bananier prend plusieurs années. Enfin la tomate pousse plus vite mais elle peut pourrir rapidement.

Malgré les résultats encourageants obtenus pour l'utilisation de plantes comme vaccins oraux, les niveaux d'expression de l'antigène hétérologue restent faibles, nécessitant l'ingestion de quantités importantes de plantes transgéniques pour recevoir une dose suffisante d'antigène (Mor et al., 1998). L'utilisation de promoteurs forts ou la co-expression d'adjuvants avec les antigènes pourraient être envisagées pour l'amélioration de ce système.

#### 4.8. Vaccins recombinants vivants

Les vecteurs viraux ou bactériens recombinants sont des organismes vivants modifiés génétiquement pour synthétiser des antigènes hétérologues, qui peuvent ainsi être délivrés sous forme protégée au système muqueux. Les vecteurs recombinants vivants, capables pour certains de persister dans les cavités externes de l'organisme ou de coloniser les muqueuses, permettraient une production *in vivo* de l'antigène. L'utilisation de tels vaccins devrait conduire à diminuer le nombre d'administrations et ainsi réduire le coût de la vaccination. La construction de vecteurs vivants recombinants permet d'envisager leur développement comme vaccins polyvalents ciblant plusieurs maladies infectieuses à la fois. Des difficultés inhérentes à cette approche incluent la construction de souches recombinantes immunogènes stables qui synthétisent des quantités d'antigènes suffisantes *in vivo* et qui ne posent aucun risque pour l'environnement et les individus vaccinés.

##### 4.8.1. Vecteurs viraux recombinants

Les vecteurs viraux vivants les plus étudiés sont le poliovirus, les adénovirus et les poxvirus.

###### - Poliovirus

Le vaccin contre la poliomyélite mis au point par Sabin en 1957 a ouvert l'aire des vecteurs viraux atténués. L'administration orale de ce vaccin induit des réponses IgG, IgM et IgA, ainsi qu'une résistance locale à l'infection grâce à la production de sIgA dans le nasopharynx et dans l'intestin. Naturellement, le poliovirus entre dans l'organisme par la voie orale et prolifère dans les plaques de Peyer avant de se répandre au niveau systémique.

Comme le poliovirus sauvage, le mutant atténué adhère sélectivement aux cellules M et exploite leur système de transport pour traverser la barrière épithéliale (Sicinski et al., 1990). Le poliovirus semble donc être un vecteur idéal pour délivrer des antigènes étrangers au niveau des sites inducteurs muqueux. Cependant, son utilisation comme vecteur de vaccination est limitée par le fait que l'organisation des protéines de sa capsid ne permette pas d'insérer de séquences étrangères de plus de 20 acides aminés, conduisant à une instabilité génétique des constructions (Dedieu et al., 1992). Pour contourner ce problème, le produit du gène désiré, équipé d'un site de clivage d'une protéase virale (protéase 3C ou 2A), a été fusionné à l'extrémité N-terminale d'une polyprotéine de capsid. Ainsi, lors de l'assemblage de la capsid, la protéine hétérologue est clivée du reste de la polyprotéine virale. De cette façon, toutes les protéines du poliovirus sont correctement produites et le virus peut se répliquer normalement sans l'aide d'un virus auxiliaire (Tang et al., 1997).

#### - Adénovirus

Les adénovirus sont des systèmes attrayants du fait de leur capacité à infecter efficacement les cellules différenciées, pour des applications en vaccinologie (Imler, 1995) et en thérapie génique (Zhang, 1999). De nombreux adénovirus recombinants, construits pour la production de divers antigènes, ont été testés chez l'animal. Par exemple, l'administration intra-nasale chez la souris d'un adénovirus recombinant exprimant la glycoprotéine B du virus de l'*Herpes simplex* induit une réponse sIgA anti-glycoprotéine B (Gallichan & Rosenthal, 1998) ainsi qu'une réponse mémoire CTL (Gallichan & Rosenthal, 1996) dans le tractus génital. Une autre étude a montré que l'administration orale d'un adénovirus exprimant des séquences du RSV induit la production d'anticorps circulants chez le chien et le chimpanzé (Hsu et al., 1992). Malgré ces résultats encourageants, l'efficacité des adénovirus recombinants comme vecteurs vivants pourrait être diminuée par la présence d'une immunité préexistante chez l'homme, ne permettant pas l'administration de doses répétées de vaccins.

#### - Poxvirus

Les poxvirus recombinants ont été utilisés dans de nombreuses études incluant des essais cliniques chez l'homme. La voie systémique est bien documentée mais peu de données sont disponibles sur l'utilisation de ces virus recombinants par voie muqueuse. Une étude récente rapporte l'utilisation du virus de la vaccine atténué NYVAC et du canarypox ALVAC comme vecteurs d'antigènes du CDV (« Canine Distemper Virus ») chez le jeune furet.

L'infection au CDV chez le furet est cliniquement et immunologiquement similaire à la rougeole chez l'homme, ce qui fait du CDV un bon modèle d'étude de la maladie. L'administration intra-nasale de NYVAC et ALVAC exprimant l'hémagglutinine du CVD protège les furets contre un challenge CDV. L'utilisation de poxvirus recombinants permettrait d'éviter les interférences du vaccin avec les anticorps maternels (Welter et al., 2000). Enfin, l'obtention d'un mutant hautement atténué du MVA (« Modified Vaccinia Ankara ») fait du virus de la vaccine un système très prometteur comme vecteur vaccinal administrable par voie muqueuse (Belyakov et al., 1998).

Les vecteurs viraux atténués ont leurs limites de par leur capacité d'encapsulation d'ADN étranger limitée à quelques kilobases. De plus, leur phénotype atténué nécessite souvent l'ajout d'un virus auxiliaire. Enfin, leur cycle de vie intracellulaire n'est pas toujours compatible avec le type de réponse désiré.

#### 4.8.2. Vecteurs bactériens recombinants

La plupart des vecteurs bactériens vivants dérivent de microorganismes pathogènes tels que *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis* (voir section D chapitre III) ou BCG pour lesquels des mutants atténués stables, non toxiques mais qui restent immunogènes, doivent être sélectionnés ou construits. Une approche alternative est développée depuis quelques années. Elle est basée sur l'utilisation de bactéries non pathogènes (bactéries commensales et bactéries des aliments) comme *Staphylococcus* et certaines bactéries lactiques (voir section C chapitre II).

##### 4.8.2.1. Bactéries pathogènes atténuées

###### - *Salmonella*

Les espèces du genre *Salmonella* sont les plus largement utilisées comme vecteurs bactériens à ce jour. *Salmonella* est un microorganisme équipé pour l'invasion de différentes cellules de vertébrés. La pathogenèse de la bactérie commence avec l'invasion des cellules épithéliales intestinales, aussi bien les entérocytes que les cellules M des plaques de Peyer (Jones et al., 1994). L'invasion induit un important ballonnement de la surface apicale des cellules M suivi de la dégénérescence et la mort des cellules. La bactérie migre alors jusqu'au tissu subépithélial. Pour les espèces non adaptées à l'hôte, l'infection semble être

restreinte à l'épithélium, alors que les espèces adaptées à l'hôte envahissent les cellules lymphoïdes et se répandent dans la circulation systémique (Jones, et al., 1994). L'adhérence rapide et sélective aux cellules M a incité l'utilisation des pathogènes humains, *-S. typhi-* et murin *-S. typhimurium-* comme vecteurs potentiels de vaccination muqueuse. Différents mutants atténués ont été construits et caractérisés pour leur virulence chez la souris (voir (Sirard et al., 1999)). Plusieurs de ces souches atténuées utilisées comme vecteurs d'antigènes hétérologues ont montré leur capacité à induire une immunité à la fois systémique et muqueuse, contre une variété d'antigènes dans les modèles animaux (Killeen et al., 1998). Comme l'utilisation de promoteurs constitutifs pour l'expression de gènes hétérologues conduisait à l'instabilité du plasmide et la perte précoce de la synthèse de l'antigène, des systèmes d'expression inductible *in vivo* tel que le promoteur *nirB* qui est induit en conditions anaérobies ont été développés. L'expression du gène codant la toxine A de *Clostridium difficile* par un mutant *aroA aroD* de *S. typhimurium* résulte en l'induction de taux d'IgA anti-toxine A protecteurs dans les muqueuses et d'IgG sériques (Ward et al., 1999). D'autres promoteurs inductibles *in vivo* ont été employés, comme *ppagC* et *pkatG*, qui ont tous deux permis d'améliorer l'immunogénicité de ce même mutant de *S. typhimurium* produisant le fragment C de la toxine tétanique (Dunstan et al., 1999).

#### - *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae*, bactérie à Gram négatif, est l'agent du choléra. Ce vibron est capable de coloniser les surfaces muqueuses de l'intestin grêle, où il peut adhérer aux cellules épithéliales par action de différentes adhésines. Il n'est toutefois pas capable de proliférer dans le tissu muqueux et ne peut se répandre dans la circulation systémique. Sa virulence est principalement basée sur la colonisation des surfaces muqueuses et sur la production de la toxine cholérique (CT). Non-invasif par lui-même, *V. cholerae* est transporté par endocytose vers les plaques de Peyer par les cellules M et induit ainsi, après infection, une réponse sIgA contre la CT et les composants de surface, comme le LPS. Sa non-invasivité combinée à son immunogénicité fait de ce microorganisme pathogène un candidat intéressant comme vecteur vaccinal. Des souches atténuées de *V. cholerae* portant des mutations génétiques définies, ont été employées comme vecteurs d'antigènes hétérologues par voie orale (Killeen, et al., 1998). Par exemple, un candidat vaccin contre la shigellose a été développé en utilisant *V. cholerae* 103 HgR comme vecteur de l'antigène-O de *Shigella sonnei* (Viret et al., 1996). La vaccination avec ce prototype résulte en l'induction de titres élevés d'anticorps spécifiques de l'antigène-O chez les animaux vaccinés (Favre et al., 1996).

- Le Bacille de Calmette et Guérin (BCG)

Le BCG est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* utilisée depuis des dizaines d'années comme vaccin contre la tuberculose. Cette mycobactérie est capable d'adhérer sélectivement aux cellules M et est efficacement transportée jusqu'au tissu lymphoïde (Fujimura, 1986). C'est une bactérie intracellulaire qui survit dans les macrophages et est capable d'induire de fortes réponses immunitaires humorale et cellulaire. Son innocuité chez l'homme, couplée à son pouvoir immunoadjuvant, ont stimulé son utilisation comme véhicule de protéines recombinantes. Des systèmes d'expression ciblés ont permis la synthèse d'une variété d'antigènes dans différentes localisations cellulaires du BCG. L'immunisation avec ces bactéries recombinantes induit des réponses systémiques chez la souris (O'Donnell, 1997). Malgré la bonne acceptabilité du vaccin, l'application de cette technologie chez l'homme avec un BCG recombinant produisant la protéine A de *Borrelia burgdorferi* (OspA) n'a pas jusqu'ici permis d'obtenir de réponses anticorps sériques spécifiques (Edelman et al., 1999). L'administration intra-nasale de BCG recombinants permet d'induire des réponses anticorps au niveau des muqueuses chez l'animal, particulièrement quand les antigènes sont présentés en surface de la bactérie grâce à une lipoprotéine de 19 kDa. Dans le cas de OspA et de PspA de *Streptococcus pneumoniae*, l'administration intra-nasale confère une immunité protectrice en modèle animal. Par contre, l'administration orale de BCG exposant OspA à sa surface n'a jusqu'ici rencontré qu'un succès limité (O'Donnell, 1997) à l'exception d'une étude récente chez le daim (Miller et al., 1999).

4.8.2.2. Bactéries non pathogènes

- *Staphylococcus*

En plus du système basé sur l'utilisation des bactéries lactiques (voir section C, chapitre II), les Staphylocoques non-pathogènes, tels que *Staphylococcus xylosus* (Nguyen et al., 1993) et *Staphylococcus carnosus* (Samuelson et al., 1995), ont été testés pour leur capacité à présenter des antigènes hétérologues aux surfaces muqueuses (Stahl et al., 2000). *S. carnosus* est largement utilisé dans l'industrie de la viande et du poisson (Schleifer & Fischer, 1982) et *S. xylosus* est une bactérie commensale de la peau chez l'homme (Schleifer & Kloos, 1975). Pour les deux espèces, des systèmes d'ancrage des antigènes à la paroi

bactérienne ont été développés tirant parti de la séquence d'ancrage de la protéine A (SpA) de *S. aureus* (Hansson et al., 1992; Samuelson, et al., 1995). La production d'anticorps systémiques a été obtenue contre un antigène modèle (« Albumin Binding Domain », ABD, de la protéine G de *Streptococcus*) exposé en surface de *S. carnosus* et *S. xylosus*, après administration orale chez la souris. Les titres d'anticorps obtenus étaient plus élevés après administration de *S. carnosus* recombinant que de *S. xylosus* recombinant (Stahl, et al., 2000). Dans une étude récente, les auteurs décrivent l'amélioration du système par co-présentation en surface de *S. carnosus*, de l'antigène modèle et d'un facteur d'adhésion de *Streptococcus dysgalactiae*, appelé « fibronectin binding protein ». L'administration intranasale chez la souris de cette souche recombinante permet d'augmenter d'un facteur 10 la production d'IgG sériques anti-ABD comparée à la souche n'exposant que l'antigène modèle (Liljeqvist et al., 1999). De même, une nette augmentation de la production d'anticorps contre l'ABD a également été observée lorsqu'un peptide de la CTB (acides aminés 50 à 75) est co-exposé à la surface de *S. carnosus* (Cano et al., 1999). Ce même système a permis d'obtenir une protection contre le RSV chez la souris, après administration de *S. carnosus* co-synthétisant la CTB et différents peptides de la protéine G du RSV humain à sa surface (Cano et al., 2000).

#### 4.8.3. Modulation des réponses immunitaires stimulées par les vecteurs bactériens

Suivant la nature de l'agent pathogène, la réponse protectrice nécessite l'intervention de sous-populations de cellules immunitaires de types différents. Par exemple, il a été montré que l'induction de réponses immunitaires de type Th2 est particulièrement importante pour protéger un individu contre les infections parasitaires (Else & Finkelman, 1998). Au contraire, les réponses Th1 augmentent l'activité microbicide des macrophages, facilitant l'élimination des pathogènes intracellulaires (Trinchieri, 1997). Le choix d'un vecteur bactérien peut, en principe, orienter la réponse vers l'une ou l'autre des voies (Golding & Scott, 1995). Par exemple, l'utilisation de bactéries intracellulaires peut avoir un impact décisif sur le type de sous-population de cellules T qui sera stimulée suite à la vaccination. Les cellules T CD8<sup>+</sup> sont la principale population cellulaire stimulée pendant l'infection à *Listeria monocytogenes* alors que l'infection à *Salmonella* stimulerait préférentiellement les cellules T CD4 (Mollenkopf et al., 2001).

La qualité de la réponse immunitaire induite à l'aide d'un vecteur vivant dépend de plusieurs facteurs, liés non seulement à ses propriétés intrinsèques mais aussi à la nature de la mutation

affectant les propriétés de virulence en cas de vecteurs dérivés de bactéries pathogènes (VanCott et al., 1998 ; Medina et al., 1999).

Le mode de présentation de l'antigène par le vecteur et le compartiment où l'antigène recombinant est produit peuvent aussi influencer la qualité de la réponse. Selon la topologie, l'antigène peut accéder aux voies de dégradation du MHC I ou II qui influenceront la génération de cellules T CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup>.

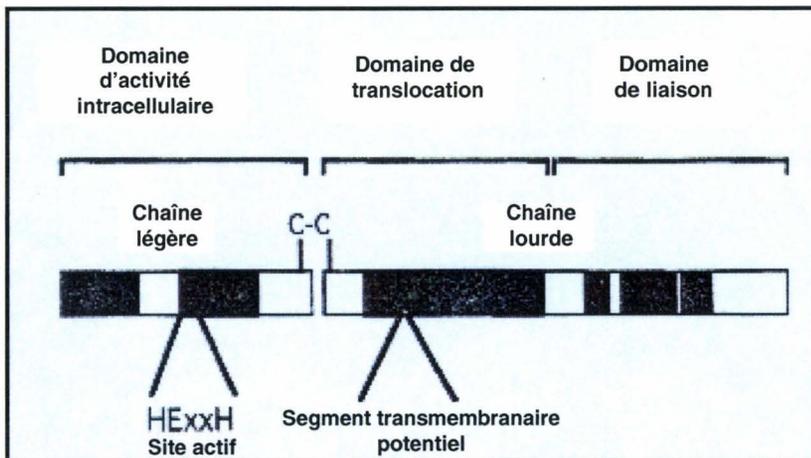
Comme mentionné plus haut, la qualité globale de la réponse immunitaire stimulée contre l'antigène hétérologue est prédéterminée par le type d'immunité obtenu par le vecteur lui-même. Cependant, celle-ci peut être modifiée par co-administration ou co-expression de cytokines pouvant modifier la polarisation des populations de cellules T stimulées (Denich et al., 1993).

### **C. Exemple d'antigène modèle utilisé dans de nombreux systèmes de vaccination : le fragment C de la toxine tétanique**

Le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) correspond à la partie C-terminale de la toxine (voir structure ci-dessous). C'est un polypeptide non toxique, très immunogénique, capable de protéger contre une épreuve avec la toxine tétanique (Fairweather et al., 1987). La TTFC a été utilisée dans de nombreux modèles vaccinaux dont les vaccins ADN (Anderson et al., 1997), les vecteurs synthétiques (Tobio et al., 1999), les organismes recombinants atténués (Chatfield et al., 1992 ; Porter et al., 1997 ; Chen I. et al., 1998 ; Abomoelak et al., 1999; Brossier et al., 2000) ou les bactéries non pathogènes (Norton et al., 1997 ; Grangette et al., 2001; Medaglini et al., 2001) (voir ce travail).

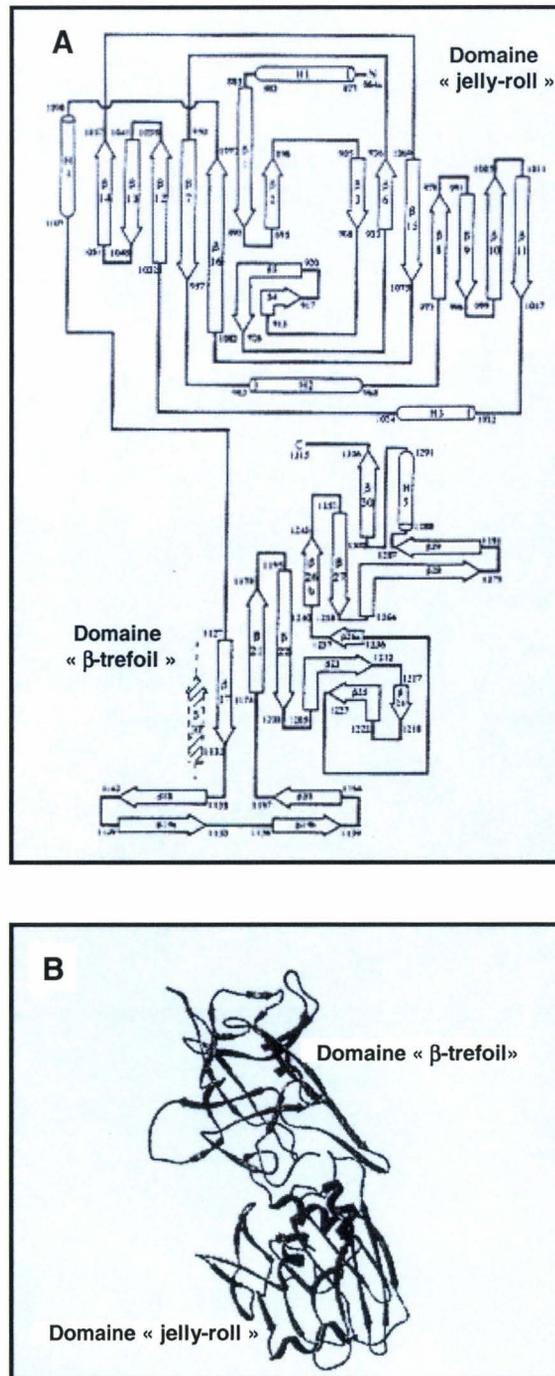
La toxine tétanique fait partie de la famille des neurotoxines clostridiales, tout comme la toxine botulique. Elles sont structurellement et fonctionnellement très proches (Minton, 1995). La toxine tétanique est une des toxines les plus puissantes et est seule responsable de tous les symptômes du tétanos, maladie grave du système nerveux. Cette maladie a pratiquement été éradiquée dans les pays industrialisés grâce à la vaccination de masse. En revanche, elle cause encore 700 000 à 1 000 000 morts chaque année dans les pays en voie de développement (Galazka & Gasse, 1995). La toxine tétanique est une protéine intracellulaire, produite par une bactérie à Gram positif strictement anaérobie, *Clostridium tetani*, et libérée par autolyse de la bactérie. Elle est synthétisée sous forme d'un polypeptide unique de 150 kDa, qui est ensuite clivé en deux chaînes : une chaîne légère (L) N-terminale de 50 kDa et

une chaîne lourde (H) C-terminale de 100 kDa, reliées entre elles par un pont disulfure (Figure 7) (Montecucco & Schiavo, 1995).



**Figure 7.** Présentation schématique des domaines fonctionnels de la toxine tétanique (d'après Popoff & Marvaud, 1999).

La chaîne H peut être clivée en deux domaines : le domaine N-terminal ( $H_N$ ) et le domaine C-terminal ( $H_C$  ou TTFC), de 50 kDa chacun. Le mode d'action de la toxine tétanique est décomposé en quatre événements principaux : la liaison de la toxine à la cellule, l'internalisation vésiculaire, la translocation cytoplasmique et l'action intracellulaire. Le domaine  $H_C$ , encore appelé fragment C, est responsable de la liaison à la membrane présynaptique des jonctions (Kamata et al., 1993). Il possède une grande affinité pour les récepteurs glycolipidiques sur les surfaces neuronales principalement vis-à-vis des gangliosides (Kozaki et al., 1987). Le domaine  $H_N$  joue un rôle dans la translocation de la chaîne L à travers la membrane vésiculaire jusqu'au cytosol (Hoch et al., 1985). La chaîne L, appartenant à la famille des protéases zinc-dépendantes (Montecucco & Schiavo, 1993), catalyse la protéolyse de la synaptobrévine (Schiavo et al., 1992), composant essentiel de la machinerie d'exocytose. Le résultat de ce clivage est l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques, conduisant à la paralysie. L'étude de la structure cristalline du fragment C par Umland et al. (Figure 8) a révélé la présence de structures tridimensionnelles particulières dans le domaine N-terminal (« jelly roll ») et dans le domaine C-terminal (structure en «  $\beta$ -trefoil ») (Umland et al., 1997).



**Figure 8.** Structure tertiaire du fragment C de la toxine tétanique (Hc ). **A.** Topologie de Hc : les feuilletts  $\beta$  sont représentés par des flèches et les hélices par des cylindres (d'après Umland & al., 1997). **B.** Repliegements de Hc : la protéine est composée de deux domaines, un domaine lectin-like N-terminal et un domaine C-terminal « $\beta$ -trefoil » (d'après Emsley & al., 1996).

## *Chapitre II : Les bactéries lactiques*

## A. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

### 1. Propriétés physiologiques et habitats

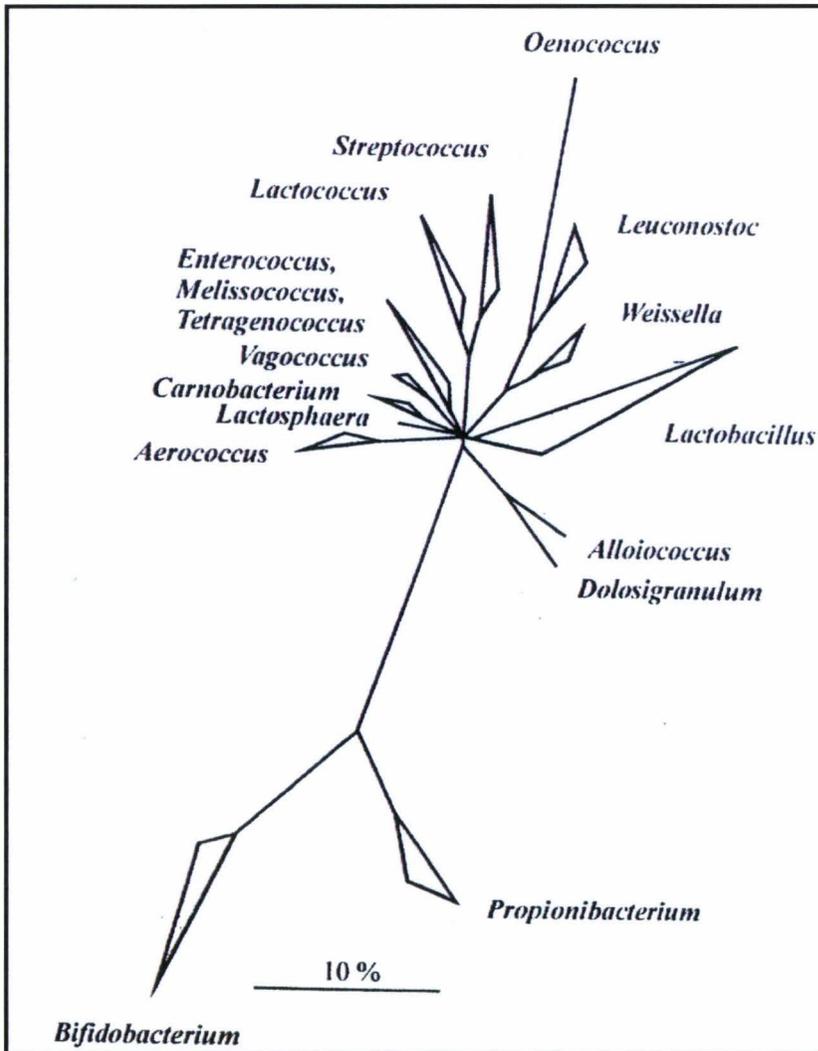
Sous l'appellation « bactéries lactiques » sont regroupées des bactéries très variées dont le point commun est leur produit métabolique principal : l'acide lactique qu'elles produisent au départ des sucres qu'elles sont capables de fermenter. Cette caractéristique est à l'origine de leur dénomination. Ce sont des microorganismes à coloration de Gram positive, non-sporulants, non-mobiles et présentant des morphologies diverses (coques ou bacilles). Ils sont anaérobies facultatifs et sont résistants aux conditions acides. Ces bactéries sont dites homofermentaires lorsque l'acide lactique représente près de 70% du produit métabolique final, ou hétérofermentaires lorsque la production d'acide lactique atteint 50% et est associée à d'autres composés tels que l'acide acétique, le CO<sub>2</sub> ou encore l'éthanol.

Les bactéries lactiques ne se développent que dans des milieux riches et sont rencontrées dans des écosystèmes aussi variés que les produits alimentaires fermentés tels que le lait et ses dérivés (beurre, fromage, yaourts), les viandes (saucisses, saucissons), le poisson et ses dérivés, les boissons (vin, cidre, bière), le pain ou les produits végétaux (chou, soja, manioc). Les bactéries lactiques sont également retrouvées au niveau des cavités corporelles externes de l'homme ou de l'animal (Sharpe, 1981).

### 2. Identification et taxonomie

Les méthodes traditionnelles d'identification des bactéries lactiques étaient basées principalement sur leur capacité à fermenter les sucres, leur morphologie et la biochimie (composition de la paroi cellulaire, contenu en acides gras). Cependant, la classification des bactéries lactiques s'appuie maintenant sur des techniques moléculaires comme par exemple le contenu en GC de l'ADN, l'hybridation ADN/ADN, la structure et la séquence de l'ARN ribosomique (ARN 16S et 23S) ainsi que le profil protéique. De nombreux genres sont classés parmi les bactéries lactiques (*Streptococcus* (*S.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (*L.*) et *Carnobacterium*) auxquels on ajoute généralement les bifidobactéries (Figure 9). Plus que tout autre groupe bactérien, la taxonomie des bactéries lactiques est

soumise à une constante évolution montrant la nécessité d'utiliser une approche combinatoire des techniques d'identification.



**Figure 9.** Groupes phylogénétiques majeurs des bactéries lactiques et des bactéries à Gram positif apparentées (d'après Stiles & Holzapfel, 1997).

### 3. Propriétés liées à l'utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire

Les bactéries lactiques sont utilisées traditionnellement depuis des siècles dans le processus de fabrication de nombreux aliments fermentés. En effet, sous l'influence de ces microorganismes non-pathogènes ou GRAS (« Generally Recognized As Safe »), les produits alimentaires cités plus haut subissent une fermentation lactique spontanée ou induite par des levains leur conférant des propriétés gustatives, nutritionnelles et sanitaires très prisées.

La fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Indispensable à la fourniture d'énergie à la bactérie, la dégradation des sucres s'accompagne d'une acidification de l'environnement. Cette diminution du pH est souvent fatale à la flore « concurrente » mais aussi à la flore pathogène éventuellement présente. Cet effet est renforcé par la présence d'acides organiques tels que l'acide lactique et l'acide acétique. Il a été démontré que l'action conjointe de ces 2 facteurs inhibe généralement la croissance des germes suivants : *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* ou *Listeria*.

Les bactéries lactiques sont également recherchées pour leurs propriétés aromatisantes. En effet, un certain nombre de composés (par exemple : acide citrique, acide acétique, acide formique, pyruvate, glycérol) sont produits au départ des sucres pour alimenter les voies de synthèse d'arômes ou de leurs précurseurs modifiant ainsi les qualités organoleptiques du produit fermenté.

Enfin, ces microorganismes ont également la capacité de produire des substances antibactériennes de type peptidique ou protéique : les bactériocines (à titre d'exemple : nisine, pédiocine, sakacine) (Klaenhammer, 1988). La nisine produite par *Lc. lactis* est un lantibiotique à large spectre qui est actif contre les bactéries à Gram positif (*Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria monocytogenes*). Elle est commercialisée comme conservateur de nourriture dans 45 pays (Delves-Broughton et al., 1996).

### 4. Lactocoques, streptocoques et lactobacilles

Parmi les nombreux genres que regroupent les bactéries lactiques, nous nous intéresserons plus particulièrement aux trois genres suivants : *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

Le genre *Lactococcus*, connu à travers l'utilisation de *Lc. lactis* est de grande importance économique. *Lc. lactis* a largement été étudié pour ses caractéristiques biochimiques et physiologiques et pour son utilisation en agro-alimentaire (Teuber et al., 1991). Les sous-espèces de *Lc. lactis* sont les bactéries lactiques les plus commercialisées. Elles sont généralement isolées de matériel végétal, mais les produits laitiers sont l'habitat le plus reconnu pour les lactocoques. A travers l'acquisition d'ADN plasmidique codant le système phosphoénolpyruvate-phosphotransférase, certaines espèces se sont particulièrement adaptées à la croissance dans le lait fermentant efficacement le lactose. L'utilisation de *Lc. lactis* comme levain de culture dans l'industrie agroalimentaire a conduit à de nombreuses études génétiques sur la fermentation lactique et la résistance aux bactériophages par exemple.

Les Streptocoques sont impliqués dans un grand nombre de maladies humaines et animales. Le nom générique de *Streptococcus* a été utilisé pour la première fois par Rosenbach (1884) pour décrire les bactéries en formes de coques formant des chaînettes présentes au niveau de blessures (Rosenbach, 1884). Le genre *Streptococcus* comprend un large spectre d'organismes et renferme à la fois des bactéries hautement pathogènes (par exemple : *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*) et des bactéries commensales de la bouche (par exemple : *S. gordonii*). La sous-espèce *S. salivarius* ssp. *thermophilus* est une exception : elle est la seule classée dans le genre *Streptococcus* qui soit utilisée comme levain de culture pour la fabrication de yaourts et de fromages de type suisse ou italien (Stiles & Holzapfel, 1997).

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène, il contient plus de 60 espèces qui diffèrent par le contenu en G+C de l'ADN (G+C, 32 à 52%), leur métabolisme, leurs propriétés phénotypiques et leur distribution dans la nature (Kandler & Weiss, 1986). Ils sont associés à des écosystèmes très variés et riches en nutriments (Tableau 2). Certaines espèces sont utilisées pour la préparation de laits fermentés (par exemple *L. delbrueckii*) et d'autres sont utilisées comme levain dans la fermentation de produits carnés ou céréaliers (par exemple *L. sakei* et *L. plantarum*) (Stiles & Holzapfel, 1997). Les lactobacilles peuvent aussi être retrouvés au niveau des cavités corporelles externes (orale, gastrique, intestinale et vaginale principalement) de l'homme ou de l'animal, où ils exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

**Tableau 2.** Différents habitats du genre *Lactobacillus* (d'après Stiles & Hozapfel, 1997).

---

**Cavités corporelles humaines**

- cavité orale
- tractus intestinal
- vagin

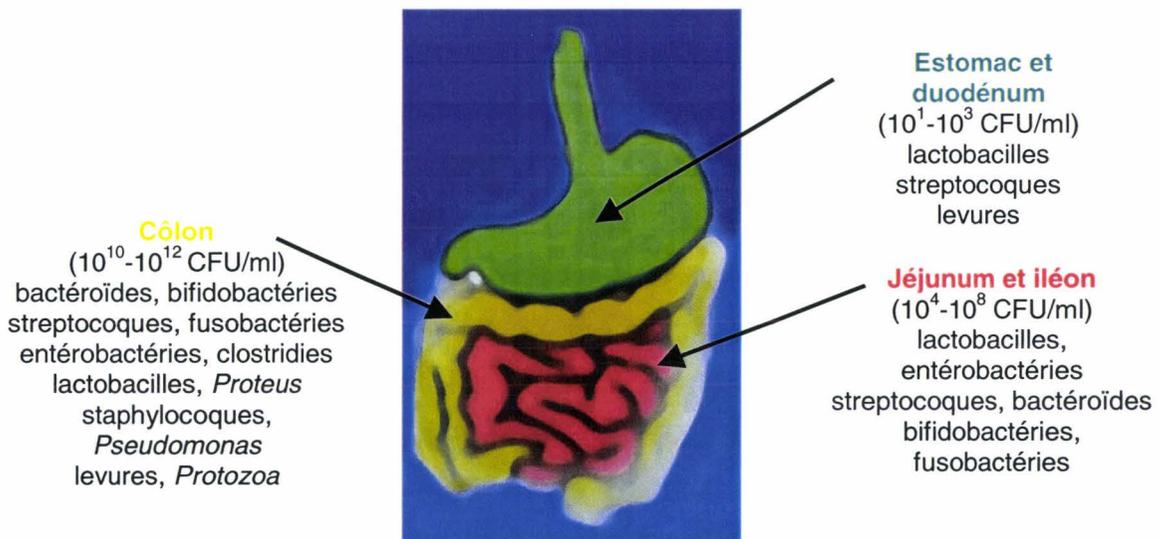
**Autres habitats**

- plantes
- terre, eau, égoûts, engrais
- produits alimentaires fermentés (lait, viande, légumes)
- produits céréaliers
- ensilage

---

Le tractus gastro-intestinal de l'homme contient une population bactérienne d'environ  $10^{14}$  cellules constituée de plus de 500 espèces ou sous-espèces bactériennes différentes (Tableau 3 ; Figure 10) parmi lesquelles les lactobacilles. Cette population de bactéries est en équilibre permanent et constitue une véritable barrière contre les microorganismes pathogènes. Les lactobacilles sont trouvés en nombre croissant, entre  $10^3$  et  $10^8$  UFC/g (Unité Formant Colonies /g de contenu intestinal) dans toutes les sections du tube digestif allant de l'estomac au colon. Ils sont les microorganismes les plus fréquemment trouvés dans l'estomac ( $10^3$ UFC/ml de contenu luminal) et constituent la flore intermédiaire au niveau de l'intestin grêle ( $10^5$ UFC/ml). Par contre, ils ne correspondent qu'à une infime proportion de la flore totale du colon, région où les bactéries anaérobies strictes telles que les *Bactéroïdes* sont dominantes (Orrhage & Nord, 2000). Selon Molin et al., les principales espèces de lactobacilles représentées au niveau du tractus gastro-intestinal sont *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus* et plus irrégulièrement *L. plantarum* et *L. reuteri* (Molin et al., 1993). Une étude plus récente (Ahrne et al., 1998) des flores rectale et orale sur des volontaires sains, a mis en évidence les mêmes espèces de lactobacilles (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*) dans des proportions semblables à celles obtenues par Molin et al (Molin et al., 1993). Par contre, *L. plantarum* est retrouvé comme flore lactobacillaire dominante dans cette étude. Les lactobacilles sont également présents en grand nombre dans le vagin de la femme post-pubertaire en bonne santé, à des concentrations

variant de  $10^5$  à  $10^7$  lactobacilles/ml de sécrétions vaginales. Les principales espèces répertoriées sont *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* et dans une moindre mesure, *L. fermentum*, *L. oris*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. vaginalis* et *L. plantarum* (Antonio et al., 1999 ; Song et al., 1999).



**Figure 10.** Colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal de l'homme (d'après Holzapfel & al. 1998).

**Tableau 3.** Composition de la microflore oropharyngée et gastro-intestinale chez l'homme (d'après Orrhage & Nord, 2000). (UFC/ml de sécrétions ou UFC/g contenu).

Microorganismes	Oropharynx	Estomac	Jéjunum	Iléon	Côlon
<b>Nombre total</b>	$10^8-10^{10}$	$0-10^4$	$0-10^5$	$10^4-10^8$	$10^{10}-10^{12}$
<b>Microorganismes aérobie</b>					
<i>Streptococcus</i>	$10^6-10^8$	$0-10^3$	$0-10^4$	$10^2-10^4$	$10^3-10^5$
<i>Enterococcus</i>	rare	rare	$0-10^2$	$10^2-10^4$	$10^5-10^{10}$
<i>Staphylococcus</i>	$0-10^2$	$0-10^2$	$0-10^3$	$10^2-10^5$	$10^4-10^6$
<i>Enterobacteriaceae</i>	rare	$0-10^2$	$0-10^3$	$10^2-10^7$	$10^4-10^{10}$
Levures	$0-10^3$	$0-10^2$	$0-10^2$	$10^2-10^4$	$10^2-10^5$
<b>Microorganismes anaérobies</b>					
<i>Peptostreptococcus</i>	$10^4-10^6$	$0-10^3$	$0-10^3$	$10^2-10^6$	$10^{10}-10^{12}$
<i>Bifidobacterium</i>	$0-10^2$	$0-10^2$	$0-10^4$	$10^3-10^9$	$10^8-10^{11}$
<i>Lactobacillus</i>	$0-10^3$	$0-10^3$	$0-10^4$	$10^2-10^5$	$10^6-10^8$
<i>Clostridium</i>	rare	rare	rare	$10^2-10^4$	$10^6-10^9$
<i>Eubacterium</i>	$10^2-10^3$	rare	rare	rare	$10^9-10^{12}$
<i>Veillonella</i>	$10^3-10^8$	$0-10^2$	$0-10^3$	$10^2-10^4$	$10^3-10^6$
<i>Fusobacterium</i>	$10^4-10^8$	$0-10^2$	$0-10^3$	$10^3-10^4$	$10^6-10^8$
<i>Bacteroides fragilis</i>	rare	rare	$0-10^3$	$10^3-10^4$	$10^{10}-10^{12}$
<i>Prevotella</i>	$10^6-10^8$	$0-10^2$	$10^2-10^4$	$10^3-10^4$	$10^4-10^5$

## B. Effets bénéfiques en santé humaine ou animale

L'association bénéfique de microorganismes avec un hôte a pour la première fois été suggérée par Döderlein (Döderlein, 1892). Il proposa que les bactéries du vagin produisaient de l'acide lactique empêchant la croissance de bactéries pathogènes. Depuis, il est reconnu que les microflores endogènes jouent plusieurs rôles (Tableau 4) dont deux sont spécialement importants en santé humaine : la stimulation du système immunitaire (voir section 1.2) et le renforcement de la barrière muqueuse vis à vis des pathogènes. Cette dernière propriété se manifeste par l'abaissement du pH (production d'acide lactique), par la production de substances antimicrobiennes (peroxyde d'hydrogène et bactériocines) et par une compétition pour l'adhésion aux surfaces muqueuses. C'est pourquoi il existe un intérêt croissant pour les stratégies visant à augmenter ces effets à travers l'apport, par la nourriture par exemple, de microorganismes bénéfiques appelés « probiotiques », comme les lactobacilles.

**Tableau 4.** Principales fonctions physiologiques de la microflore intestinale endogène (d'après Moreau et al., 2000).

<b>Modification du contenu intestinal</b>	Diminution du potentiel oxydo-réducteur Production de métabolites (vitamines, enzymes digestives...) Réduction de métabolites (urée, cholestérol, triglycérides...)
<b>Modification anatomique du tractus digestif</b>	Diminution du volume caecal Renouvellement des entérocytes Morphométrie des villosités
<b>Modification physiologique du tube digestif</b>	Augmentation des transits gastrique et intestinal Absorption des composés abiotiques
<b>Résistance aux infections gastro-intestinales</b>	Effet barrière Modulation de la production de toxines dans l'intestin
<b>Stimulation des fonctions immunitaires</b>	

## **1. Définition d'un « probiotique »**

L'importance des lactobacilles en santé humaine, comme agents bactérioprophy lactiques ou bactériothérapeutiques, a été proposée par Metchnikoff (Metchnikoff, 1908). Il a établi une corrélation entre la longévité des populations balkaniques et orientales et leur consommation régulière de produits fermentés à base de lait. Metchnikoff suggérait que la substitution des microorganismes de l'intestin par les bactéries du yaourt pouvait être bénéfique. Depuis, de nombreux efforts ont été menés, spécialement dans les 20 dernières années pour améliorer la santé en modulant la flore endogène par administration de bactéries vivantes. Plusieurs définitions ont été proposées pour décrire les probiotiques, mais la plus appropriée est donnée par Havenaar et al. (Havenaar et al., 1992) : « un probiotique est une culture pure ou mixte de microorganismes vivants qui, quand ils sont appliqués à l'homme ou l'animal, affectent de façon bénéfique l'hôte en améliorant les propriétés de la microflore endogène ». Cette définition a certains avantages comparée aux autres :

- elle ne restreint pas les activités probiotiques à la microflore intestinale mais englobe la communauté microbienne présente à d'autres sites de l'organisme.
- le probiotique peut consister en une ou plusieurs espèces de bactéries
- il peut être appliqué à la fois à l'homme et à l'animal

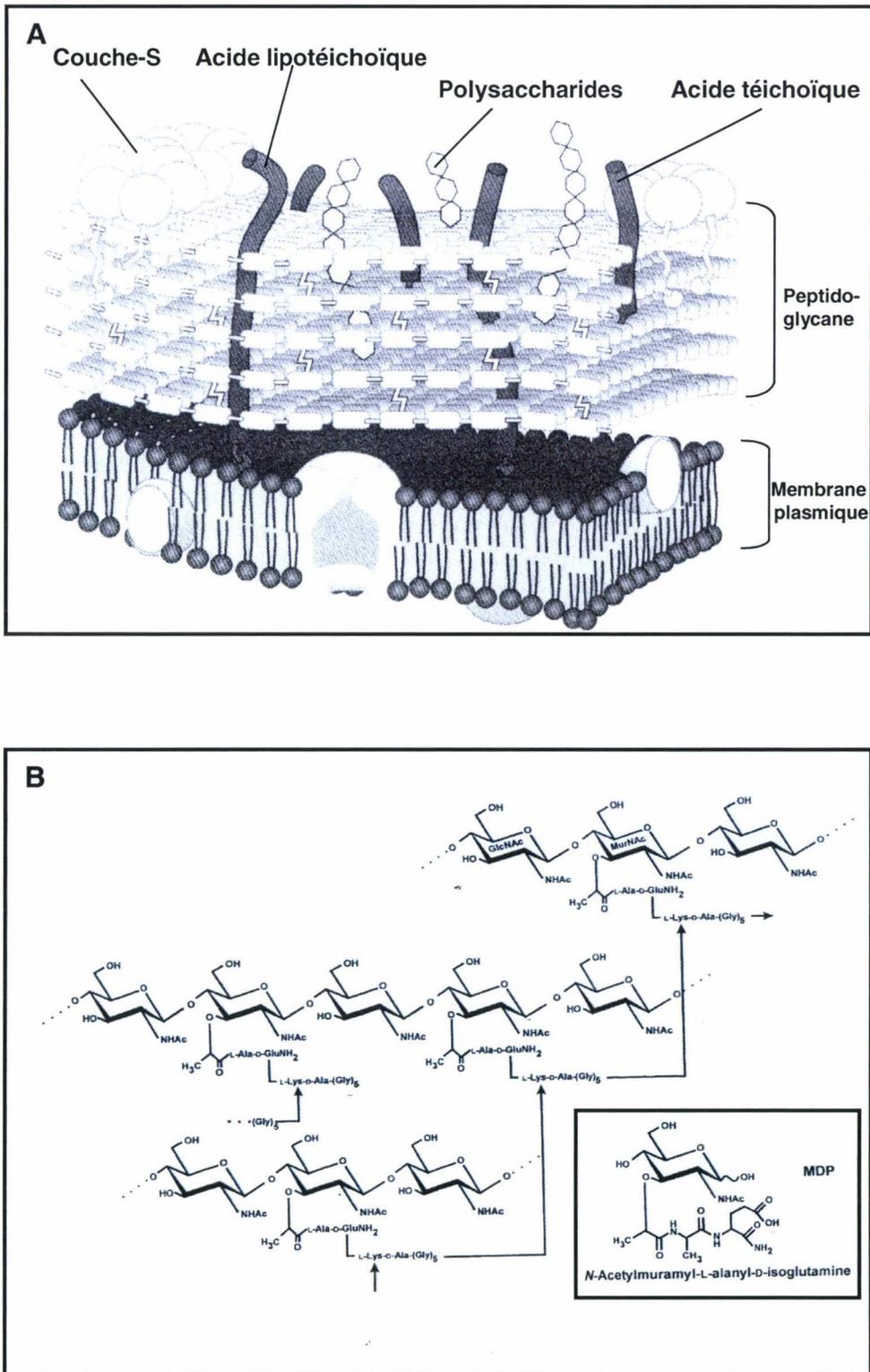
Le rôle probiotique des bactéries lactiques présente un intérêt grandissant dans les domaines de la nutrition humaine, de l'alimentation animale mais également dans le domaine de la santé en raison de leurs potentialités prophylactiques et thérapeutiques. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés tels que l'amélioration de la digestion du lactose (de Vrese et al., 2001), le traitement des désordres diarrhéiques (Marteau et al., 2001), la protection du tractus urogénital contre les infections (Reid, 2001), la réduction de la formation de tumeurs du colon (Wolowski et al., 2001) et les propriétés d'immunomodulation impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou dans l'allergie (Isolauri et al., 2001). Les bactéries lactiques ont néanmoins été associées dans quelques cas rares à des situations pathologiques qui concernaient toujours des patients immunodéprimés (Schlegel et al., 1998).

## 2. Effet immunomodulateur

Plusieurs auteurs attribuent un pouvoir immunostimulant aux bactéries lactiques. Des études chez l'homme ou en modèle animal ont montré différents effets tant sur l'immunité systémique que sur l'immunité locale intestinale (Isolauri et al., 2001; Meydani & Ha, 2000). Les composants de paroi des bactéries sont de puissants activateurs du système immunitaire. Ils exercent leur activité à travers l'induction de médiateurs endogènes qui sont dotés d'activités biologiques. La paroi des bactéries Gram positif est une macromolécule essentiellement constituée de peptidoglycane auquel sont attachées des molécules accessoires comme les acides teïchoïques, les acides teïchuroniques, des polyphosphates ou des carbohydrates (pour revue Delcour et al., 1999 ; Navarre & Schneewind, 1999) (Figure 11A). Le peptidoglycane et le MDP (muramyl dipeptide) (Figure 11B) active le système immunitaire de façon indirecte par stimulation des macrophages, des cellules endothéliales et des neutrophiles pour libérer des modulateurs immunitaires (cytokines) (Hamann et al., 1998).

### 2.1. Stimulation de l'immunité innée

Les bactéries lactiques peuvent améliorer certaines fonctions effectrices immunitaires non spécifiques. Une augmentation de la phagocytose a été observée à la fois chez l'homme (Schiffirin et al., 1997) et chez la souris (pour revue Gibson & Roberfroid, 1995). Tout comme les macrophages, qui constituent la première ligne de défense non-spécifique contre l'invasion bactérienne et les tumeurs, les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunité au travers de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Un certain nombre d'études *in vitro* ont pu mettre en évidence l'influence des bactéries lactiques sur la production de cytokines (Miettinen et al., 1998; Haller et al., 2000). La stimulation de cellules mononuclées isolées de sang périphérique humain (PBMC) ou de sous populations lymphocytaires montrent des profils de cytokines variables selon les souches bactériennes utilisées. De façon générale, la plupart des souches stimulent, avec une intensité variable, la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-12, d'IFN- $\gamma$ , d'IL-6 et d'IL-10 à partir de PBMC ou de macrophages, le niveau d'IL-10 étant inférieur à celui induit par des bactéries à Gram négatif (Hessle et al., 1999; Haller et al., 2000). Aucune production de cytokines Th2 n'est observée (Muller-Alouf et al., 1999 ; Maassen et al., 2000). Un nombre restreint d'études *in vivo* en modèles animaux semblent indiquer que l'administration orale de différentes souches de bactéries lactiques conduit à à une stimulation différentielle de cytokines et d'isotypes d'anticorps (IgG1/IgG2a).



**Figure 11.** A. Paroi cellulaire d'une bactérie à Gram positif (d'après Delcour et al., 1999). B. Structure chimique du peptidoglycane et du MDP (muramyl dipeptide) de *Staphylococcus aureus* (d'après Hamann et al., 1998).

En effet, certaines souches semblent induire une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires/Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) accompagnée de taux plus élevés d'IgG2a spécifiques lorsqu'elles sont co-administrées avec un antigène (Muller-Alouf et al, non publié). Ces travaux suggèrent que ces critères devraient être pris en considération lors du choix de souches de bactéries lactiques à des fins vaccinales ou thérapeutiques.

## 2.2. Stimulation de l'immunité spécifique

Un certain nombre de travaux semblent indiquer que l'administration de bactéries lactiques stimule la réponse immunitaire spécifique, notamment la production de sIgA capables d'inhiber la colonisation des microorganismes pathogènes et la pénétration d'antigènes du lumen au niveau du tube digestif. Les travaux de Vitini et al., réalisés chez la souris, indiquent que les lactobacilles (*L. casei* et *L. plantarum*) sont capables d'interagir avec les cellules des plaques de Peyer, d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD4+ dans la lamina propria et le nombre de cellules B sécrétrices d'IgA après administration orale (Vitini et al., 2000).

Chez l'enfant, il a été montré que l'ingestion de bactéries lactiques (*L. rhamnosus* GG) conduit à une augmentation de la réponse immunitaire anti-rotavirus (augmentation de la production d'IgA spécifiques) et à un raccourcissement de la durée des diarrhées observées chez ces patients (Kaila et al., 1992). De même, l'administration de lait fermenté contenant *L. acidophilus* à des sujets humains montre une augmentation significative (4 fois) des titres IgA sériques dirigés contre une souche atténuée de *Salmonella* (*S. typhimurium*) administrée par voie orale (Link-Amster et al., 1994). Ces auteurs suggèrent que les bactéries lactiques administrées oralement pourraient passer à travers le lumen et atteindre les organes lymphoïdes locaux dans l'intestin. La translocation des bactéries lactiques conduirait à l'activation du système immunitaire local résultant en une production de sIgA.

De Simone et al. ont également montré que des souris nourries avec du yaourt contenant *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* pendant 7 jours ont un pourcentage de lymphocytes B plus élevé dans les plaques de Peyer que des souris nourries avec du lait de vache (De Simone et al., 1987). L'administration de ce mélange de bactéries lactiques pendant 4 semaines augmente le taux de survie des animaux à une infection ultérieure par *S. typhimurium* (De Simone et al., 1988). Les auteurs attribuent cet effet à la capacité des bactéries lactiques à augmenter la réponse immunitaire locale et systémique.

## C. Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs de vaccination

La recherche concernant l'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs de vaccination a été initiée il y a 10 ans dans plusieurs laboratoires européens. Le choix d'utiliser les bactéries lactiques pour délivrer des antigènes au niveau des muqueuses d'intérêt, résulte des avantages potentiels qu'elles peuvent offrir. Par exemple, elles peuvent être administrées oralement en grande quantité sans crainte d'effets secondaires du fait de leur statut non pathogène. Certaines d'entre elles ont la capacité de persister de manière transitoire dans les cavités corporelles et possèdent des propriétés probiotiques. Leur résistance aux conditions acides en fait des candidats de choix pour délivrer des antigènes par voie orale. De plus, un savoir-faire technologique a été développé pour leur production à grande échelle. Enfin, la génétique des bactéries lactiques a progressé considérablement durant ces 20 dernières années facilitant la construction de souches recombinantes produisant des molécules hétérologues.

Aujourd'hui, plusieurs équipes de recherche visent à utiliser ces bactéries comme vecteurs de fonctions bénéfiques (protéines immunogènes, molécules biologiquement actives) à des fins vaccinales ou thérapeutiques. Cette stratégie requiert d'étudier la capacité des souches à persister au niveau des muqueuses comme celles du tube digestif. Elle nécessite également l'élaboration de systèmes génétiques compatibles avec l'administration à l'homme ou à l'animal et qui permettent l'expression stable de protéines hétérologues.

### 1. Microbiologie et devenir *in vivo*

#### 1.1. *Lactococcus lactis*

Des expériences d'administration orale ont montré que *Lc. lactis* persistait moins de 24 heures dans l'intestin de souris conventionnelles. Au contraire, cette bactérie peut coloniser le tractus digestif de souris axéniques (Gruzza et al., 1992); mais l'introduction d'autres microorganismes entraîne l'élimination sélective de *Lc. lactis* (Gruzza et al., 1994). L'administration de *Lc. lactis* recombinants, exprimant le gène de la « Green Fluorescent Protein » (GFP) comme gène rapporteur, à des rats, a montré que les lactocoques étaient hautement résistants à l'acidité gastrique (90 à 98% de survie) quand ils étaient inclus dans la nourriture. Par contre, seulement 10 à 30% des bactéries survivaient dans le duodénum (Drouault et al., 1999). Les facteurs pouvant affecter la survie des lactocoques dans le

duodénum sont multiples : sels biliaires, sécrétions entériques et pancréatiques. Ces mêmes auteurs ont montré, grâce à l'utilisation de souches exprimant le gène de la luciférase (*luxA-luxB* de *Vibrio harveyi*), que des lactocoques métaboliquement actifs étaient cependant présents dans chaque compartiment du tractus digestif (Drouault et al., 1999).

Peu d'expériences ont permis d'analyser le transit de *Lc. lactis* chez l'homme. Il a été montré qu'après avoir alimenté des volontaires sains avec  $10^{11}$  UFC pendant 4 jours consécutifs, une faible proportion de bactéries viables étaient retrouvées dans les fécès. Le suivi de bactéries a été réalisé grâce à l'amplification par PCR d'un marqueur spécifique de la souche (*nisA*). Ces résultats indiquent que le passage à travers l'intestin est transitoire et similaire à celui de spores de *Bacillus* utilisées comme marqueur passif de transit (Klijn et al., 1995). Plus récemment, Vesa et al. ont rapporté que *L. lactis* MG1363 est nettement plus sensible aux conditions drastiques rencontrées dans les voies digestives hautes que certains lactobacilles (Vesa et al., 2000). Du fait de sa courte persistance dans le tractus gastro-intestinal, *Lc. lactis* est supposé avoir une capacité de réplication limitée *in vivo*.

### 1.2. *Streptococcus gordonii*

*Streptococcus gordonii* est un constituant normal de la cavité buccale de l'homme (Pozzi et al., 1994). Une simple dose de  $10^9$  UFC de la souche Challis est capable de coloniser les cavités orale et vaginale mais pas le tractus gastro-intestinal de la souris (Mercenier, 1996 ; Medaglini et al., 1997b; Pozzi et al., 1997). Le nombre de souris colonisées et le pourcentage d'animaux qui restent colonisés au cours du temps dépend de la souche de souris. Par exemple, après une administration orale unique de *S. gordonii* Challis, 83 % des souris Swiss CD1 restent colonisées après 2 mois, alors que le pourcentage de souris Balb/c est plus bas, soit environ 20% (Pozzi et al., 1997). La souche Challis est capable de coloniser les surfaces muqueuses du vagin de souris BALB/c pendant près de trois semaines sans qu'un traitement hormonal préalable soit nécessaire comme décrit pour les lactobacilles (Medaglini et al., 1997b; Medaglini et al., 1998).

### 1.3. *Lactobacillus*

Chez la souris, différentes souches de lactobacilles telles que *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus paracasei* (LbTGS1.4 ; isolat vaginal de souris), *Lactobacillus fermentum* (KLD, isolat humain) et *Lactobacillus plantarum* (NCIMB 8826 ; isolé de salive humaine)

sont capables de persister dans le tractus gastro-intestinal et le vagin de la souris pendant plus d'une semaine. Le temps de transit dans tous les cas est plus long que celui observé pour *Lc. lactis* (Mercenier, 1996). Une comparaison du taux de survie et du temps de transit dans l'intestin de trois souches de bactéries lactiques non-recombinantes marquées à la rifampicine et à la streptomycine a été effectuée chez des adultes volontaires. *L. fermentum* (KLD), *L. plantarum* (NCIMB 8826) et *Lc. lactis* (MG1363) ont été administrées oralement dans 150g de produit laitier fermenté et le fluide iléal a été collecté par intubation intestinale. *L. plantarum* (7%) survit mieux dans l'estomac que *Lc. lactis* et *L. fermentum* (0.5 et 1% respectivement) et est retrouvé en grand nombre dans les fécès pendant sept jours après la période d'ingestion. Cependant, aucune des souches ne colonise le tractus gastro-intestinal de façon permanente. Les auteurs considèrent que *L. plantarum* présente un profil de survie prometteur pour une utilisation comme vecteur vaccinal (Vesa et al., 2000). Les profils pharmacocinétiques de ces trois souches chez l'homme sont similaires à ceux observés chez la souris (voir Wells & Mercenier, sous presse).

## 2. Outils génétiques pour la production de protéines hétérologues

### 2.1. Plasmides

De nombreuses bactéries lactiques contiennent des plasmides endogènes, ainsi, par exemple, 38% des lactobacilles contiennent un ou plusieurs plasmides. Bien que la plupart soient cryptiques, certains sont associés à des fonctions métaboliques comme la fermentation du lactose, le métabolisme des cystéines, le métabolisme du citrate, la production de bactériocines, la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux phages (Wang & Lee, 1997).

Les différents plasmides isolés chez les lactocoques, les streptocoques et les lactobacilles, tout comme chez les autres bactéries à Gram positif, sont classés en deux groupes selon leur mécanisme de répllication :

- plasmides se répliquant selon le mode du cercle roulant appelé « Rolling Circle Replication » ou RCR.
- plasmides se répliquant selon un mécanisme de type  $\theta$  ( $\theta$ ).

Le premier concerne uniquement des plasmides de petite taille, généralement inférieurs à 10 kpb, tandis que le deuxième concerne principalement des plasmides de grande taille, pour la

plupart supérieurs à 10 kpb. Le tableau 5 donne la liste de plasmides isolés et séquencés de *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Biet, 1997; Wang & Lee, 1997).

**Tableau 5 :** Plasmides de type RCR et thêta isolés chez *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (modifié d'après Wang & Lee, 1997).

Plasmides	Taille (Kb)	Hôte	Référence
<b>Type RCR</b>			
pLP1	2,1	<i>L. plantarum</i>	Bouia et al., 1989
pC30il	2,1	<i>L. plantarum</i>	Skaugen 1989
pLAB1000	3,3	<i>L. hilgardii</i>	Josson et al., 1990
pVA380-1	4,2	<i>S. ferus</i>	Leblanc et al., 1992
pMV158 (pLS1)	5,5	<i>S. agalactia</i>	Gruss & Ehrlich 1989
pWV01	3,3	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	Leenhouts et al., 1991
pSH71	2,1	<i>Lc. lactis</i>	Gruss & Ehrlich 1989
pFX2	2,5	<i>Lc. lactis</i>	Yougman 1987
pLB4	3,5	<i>L. plantarum</i>	Baum et al., 1990
pA1	2,8	<i>L. plantarum</i>	Vujcic et al., 1993
pLC2	2,5	<i>L. curvatus</i>	Klein et al., 1993
pLH2	5,7	<i>L. helveticus</i>	Pridmore et al., 1994
pLH3	3,4	<i>L. helveticus</i>	Pridmore et al., 1994
pLH4	2,5	<i>L. helveticus</i>	Pridmore et al., 1994
pLJ1	3,3	<i>L. helveticus</i>	Takiguchi et al., 1989
p353-2	2,4	<i>L. pentosus</i>	Leer et al., 1992
p8014-2	1,9	<i>L. plantarum</i>	Leer et al., 1992
<b>Type thêta</b>			
pAM $\beta$ 1	26,5	<i>E. faecalis</i>	Clewell et al., 1974
pIP501	30	<i>S. agalactiae</i>	Horodniceanu, 1976
pAC1	25,5	<i>S. pyogenes</i>	Clewell et al., 1974
pIP612	34	<i>S. agalactiae</i>	El-Solh et al., 1978
pMV103	26,5	<i>S. agalactiae</i>	Horaud et al., 1985
pMV141	25	<i>S. agalactiae</i>	Horaud et al., 1985
pSM19035	27	<i>S. pyogenes</i>	Horaud et al., 1985
pSM10419	27	<i>S. pyogenes</i>	Horaud et al., 1985
pCI305	8,7	<i>Lc. Lactis</i>	Hayes et al., 1990
pSK11L	47,3	<i>Lc. Lactis</i>	Feirtag et al., 1991
pWV02	3,8	<i>Lc. Lactis</i>	Kiewiet et al., 1993
pSL2	7,8	<i>Lc. Lactis</i>	Jahns et al., 1991

De nombreux vecteurs de clonage ont été construits chez les bactéries lactiques à partir de plasmides endogènes de lactocoques, de lactobacilles et de streptocoques. Des vecteurs navettes *E. coli*/bactéries lactiques, contenant les réplicons et les marqueurs de sélection pour chacun des deux organismes, ont souvent été utilisés du fait d'une plus grande facilité de

manipulation génétique et d'amplification de vecteurs chez *E. coli*. Les réplicons RCR utilisés pour construire des vecteurs peuvent être considérés comme vecteurs de seconde génération, souvent à large spectre d'hôte ; néanmoins ils peuvent poser des problèmes de stabilité. Les facteurs responsables de l'instabilité ségrégationnelle ou structurelle sont développés dans la section 2.1.1.b. En revanche, les réplicons  $\theta$  sont plus stables au point de vue ségrégation et structure, pour autant que les régions gouvernant le nombre de copies ne soient pas modifiées.

### **2.1.1. Les plasmides RCR**

#### **2.1.1.a. Description du mécanisme RCR**

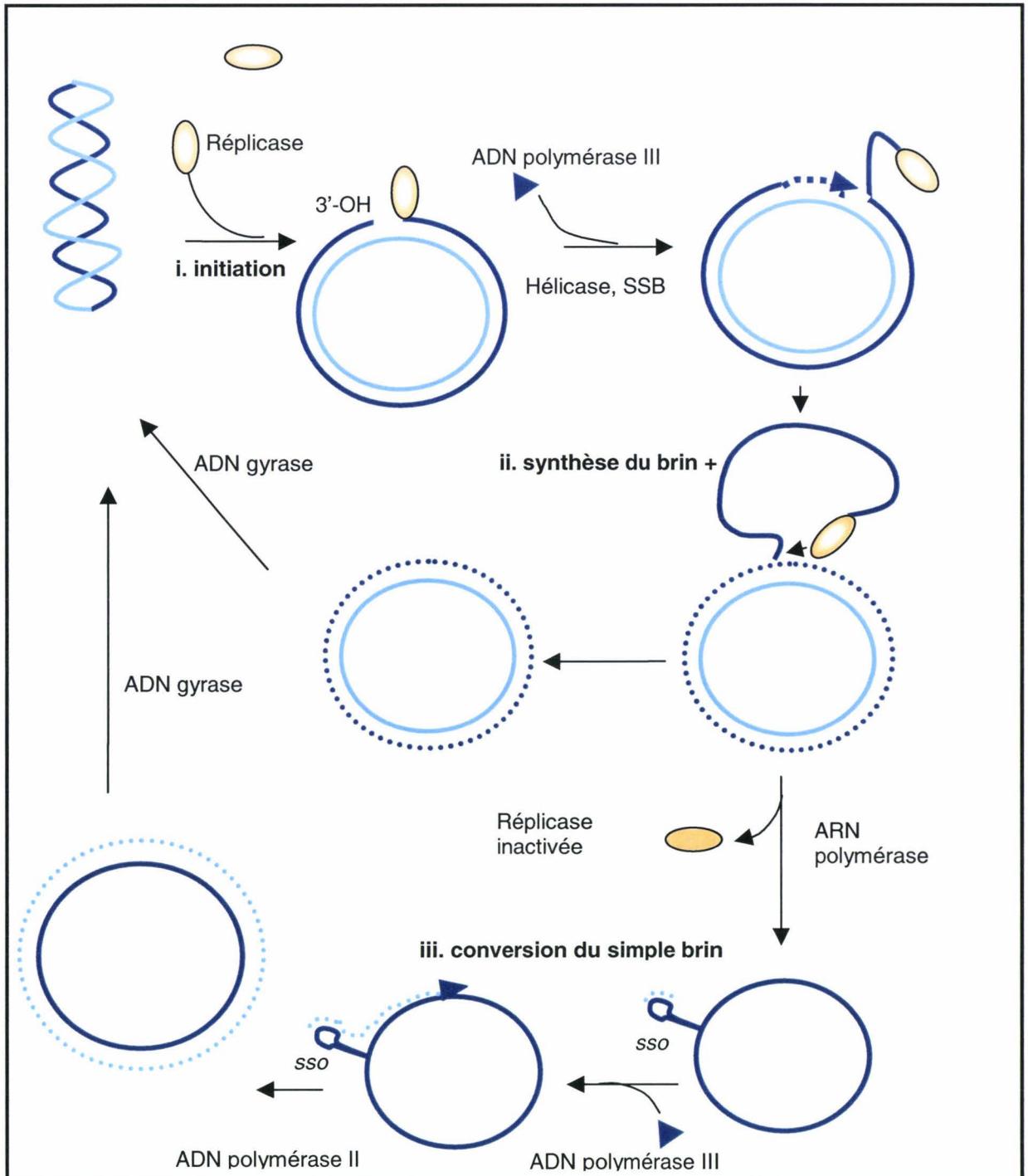
Le mécanisme de réplication RCR est schématisé sur la figure 12. Il peut être décomposé en trois étapes principales.

##### ***i. Initiation de la réplication***

Cette étape correspond à la coupure de la molécule d'ADN (sur le brin défini *plus*) au niveau de l'origine de réplication du plasmide. L'origine de réplication dénommée Ori+ par certains auteurs (Gruss & Ehrlich, 1989; Novick, 1989) a été renommée *dso* (« double strand origin » pour origine de réplication du double brin). Cette étape, réalisée par la réplicase codée par le plasmide, libère un extrémité 3'OH.

##### ***ii. Synthèse du brin plus***

Les hélicases de l'hôte déplacent le brin *plus* pour permettre la synthèse d'un nouveau brin *plus* par l'ADN polymérase III de l'hôte à partir de l'extrémité 3'OH qui sert d'amorce (Novick, 1989). Lorsque la synthèse est terminée, la réplicase clive à nouveau l'ADN



**Figure 12.** Mécanisme de réplication RCR. Le brin plus est représenté en bleu foncé, le brin moins en bleu clair. Les brins parentaux sont en traits pleins et les brins néosynthétisés en pointillés. **SSB** : Stabilisation du Simple Brin ; *SSO* : « single strand origin ».

au niveau de l'origine. Cette seconde coupure de l'ADN est suivie d'une ligation libérant ainsi une copie circulaire double brin du plasmide.

### ***iii. Conversion de la molécule simple brin et terminaison***

La molécule simple brin (brin *plus* parental) est convertie en molécule double brin exclusivement par les facteurs de l'hôte. La réplication de l'ADN est initiée et terminée dans une région du plasmide appelée *ss* (« single strand origin », pour origine de réplication du simple brin) distante de l'origine *dso*. Cette conversion requiert la synthèse d'amorces par l'ARN polymérase, l'ADN polymérase III prenant le relais pour synthétiser un nouveau brin *moins*. L'ADN polymérase I dégrade l'amorce ARN et termine la réplication.

### **2.1.1.b. Facteurs responsables de l'instabilité ségrégationnelle ou structurelle des plasmides RCR**

#### ***Instabilité ségrégationnelle***

L'instabilité ségrégationnelle des plasmides RCR peut être le résultat de l'absence de fonction de partition, c'est à dire de site d'attachement des plasmides à la membrane, permettant leur répartition homogène dans les cellules filles lors de la division cellulaire (Summers, 1991). Les plasmides sont alors distribués aléatoirement parmi la descendance, ce qui augmente la probabilité de leur perte (Gruss & Ehrlich, 1989 ; Pouwels & Leer, 1993). La probabilité de générer des cellules sans plasmide à chaque génération est fonction du nombre de copies : plus le nombre de copies est élevé, plus cette probabilité diminue.

La conversion de la forme simple brin en forme double brin est la source majeure d'instabilité de structure et de ségrégation des plasmides RCR. En effet, si l'origine de réplication du brin *moins* est absente ou non fonctionnelle, le plasmide sous forme monocaténaire s'accumule dans la cellule. L'accumulation de la molécule simple brin, moins stable que le plasmide parental, aurait des effets néfastes sur la croissance des cellules favorisant celles qui ne contiennent pas les plasmides. Ceci aurait pour conséquence la perte du plasmide au cours des générations (Bron et al., 1991b; Pouwels & Leer, 1993).

Le stress métabolique que le plasmide impose à l'hôte (réquisition des ressources pour la réplication, transcription et traduction, toxicité de certains gènes hétérologues ou de leurs

produits) peut également réduire sa vitesse de croissance (Summers, 1991) et entraîner l'accumulation de cellules dépourvues de plasmide.

Un autre facteur augmentant la probabilité de perte d'un plasmide est la formation de multimères par recombinaison homologue (Gruss & Ehrlich, 1988). Les oligomères de plasmides sont moins stables que les monomères car ils sont maintenus à faible nombre de copies (Summers, 1991). De plus, la vitesse de perte du plasmide augmente avec le degré de multimérisation (Boe & Tolker-Nielsen, 1997).

Enfin, l'insertion de séquences d'ADN dans un plasmide de type RCR peut augmenter l'instabilité ségrégationnelle de ce vecteur et ce, d'autant plus que le fragment est grand (Janniere et al., 1990).

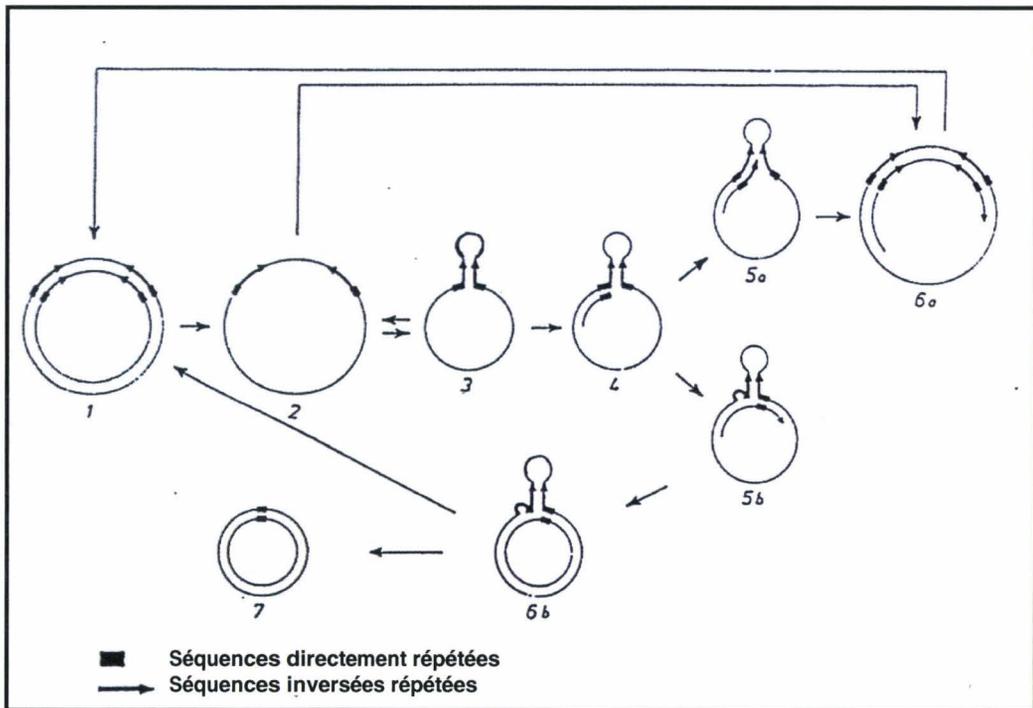
### *Instabilité structurelle*

Les réarrangements structuraux, le plus souvent des délétions, sont également un problème important rencontré chez les plasmides RCR (Bron et al., 1991b). La présence de différents types de séquences d'ADN et la génération d'un intermédiaire simple brin lors de la réplication peuvent expliquer ces délétions. Par exemple, les courtes séquences directement répétées (DR) de 3 à 18 pb, seules ou flanquant des séquences inversées répétées (IR), sont fréquemment impliquées dans la formation de délétions chez *B. subtilis* (Bron et al., 1991a). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ces délétions ; l'un d'eux, proposé par Peeters et al., est présenté dans la figure 13 (Peeters et al., 1988). La fréquence des délétions augmente avec la longueur des DR et la présence de IR. Des événements de recombinaison homologue intramoléculaire entre des régions répétées peuvent également mener à des délétions au sein des plasmides ; il faut cependant que les séquences identiques possèdent une longueur permettant la recombinaison (soit 20 pb au minimum) (Peeters et al., 1988). D'autres séquences telles que les sites cibles des topoisomérases peuvent être impliquées dans les réarrangements de séquences plasmidiques (Peijnenburg et al., 1988 ; Peijnenburg et al., 1989).

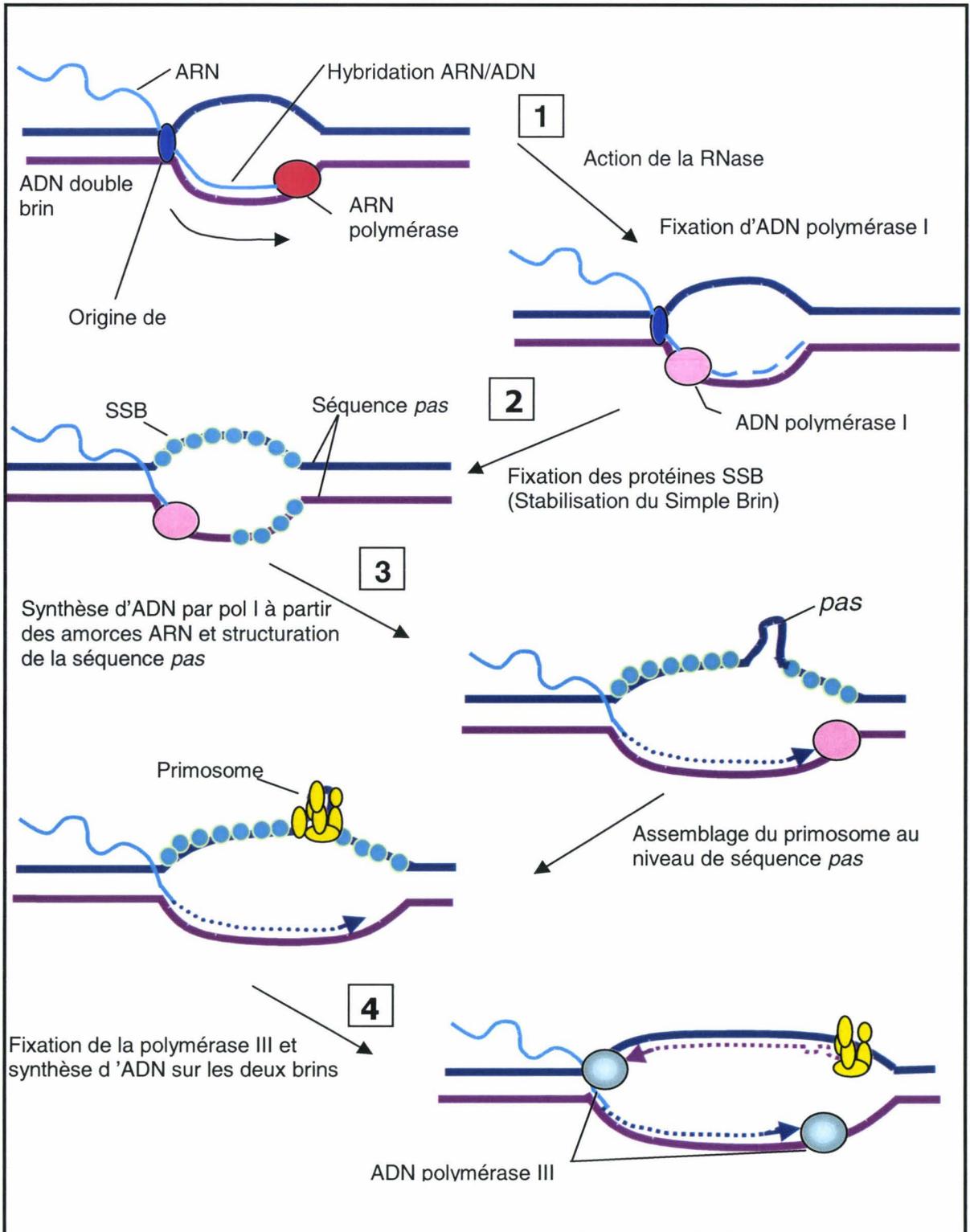
### **2.1.2. Les plasmides de type $\theta$**

Les plasmides de type  $\theta$  présentent souvent un spectre d'hôte étendu. Les plus utilisés chez les bactéries lactiques dérivent d'un plasmide appelé pAM $\beta$ 1, isolé chez *Enterococcus faecalis*

(Clewell et al., 1974). Le mode de répllication  $\theta$ , plus précisément l'initiation de la répllication, des plasmides issus des bactéries à Gram positif ne diffère pas vraiment de celui des plasmides  $\theta$  d' *E. coli* ou du chromosome bactérien. La figure 14 représente le déroulement de l'initiation de la répllication du plasmide ColE1 de *E. coli*.



**Figure 13.** Modèle d'instabilité structurale des plasmides RCR, chez *Bacillus subtilis* (d'après Peeters & al., 1988). **(1)** Plasmide RCR contenant des séquences directement répétées (DR) flanquant des séquences inversées répétées (IR). **(2)** Intermédiaire de répllication monocaténaire. **(3)** Formation d'une épingle à cheveux joignant les séquences IR ou rapprochant les DR. **(4)** Synthèse du brin complémentaire en amont de l'épingle à cheveux. **(5a)** Poursuite de la répllication après désappariement des IR. **(5b)** Glissement du brin naissant sur la seconde DR et poursuite de la synthèse. **(6a)** Génération d'un plasmide identique au plasmide parental. **(6b)** Hétéroduplex formé par un brin parental et un brin complémentaire comportant une délétion. **(7)** Génération d'un plasmide modifié après répllication du brin complémentaire obtenu en **6b**.



**Figure 14.** Mécanisme d'initiation de la réplication du plasmide ColE1. (1) Initiation. (2) Amorçage de l'ADN polymérase I. (3) Elongation. (4) Amorçage de l'ADN polymérase III. *pas* : structure secondaire en boucle.

### 2.1.3. Vecteurs utilisés chez *Lactococcus* et *Lactobacillus*

Les différents plasmides utilisés pour les études immunologiques (sections 3.1 et 3.3) chez les lactocoques et les lactobacilles sont répertoriés dans le tableau 6. A cause de la grande diversité du genre *Lactobacillus*, les outils moléculaires nécessaires à leur manipulation génétique tendent à montrer un haut degré de spécificité d'espèces et parfois même de souches (Hols et al., 1997; Pouwels et al., 1998). Ainsi, il peut être nécessaire d'adapter les méthodes de transformation, les plasmides et les éléments requis pour l'expression de gènes spécifiquement à la souche étudiée (pour revue : Pouwels & Leer, 1993; Klaenhammer, 1995; Rush, 1997; Kullen & Klaenhammer, 1999). Les vecteurs les plus souvent utilisés chez *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont des dérivés de pAM $\beta$ 1 (type  $\theta$ ), ainsi que de pSH71, pLP1 et pLAB1000 (type RCR).

**Tableau 6 :** Vecteurs utilisés pour la production d'antigènes

	Série	Famille	Type de réplication	Référence
<i>Lactococcus</i>	pTREX	pAM $\beta$ 1	$\theta$	(Robinson et al., 1997; Steidler et al., 1998b)
	piL	pAM $\beta$ 1	$\theta$	(Wells et al., 1993a)
	pLET	pSH71	RCR	(Wells et al., 1993b)
<i>Lactobacillus</i>	pTG	pSH71	RCR	(Hols, et al., 1997)
	pLP	pLP1	RCR	(Maassen et al., 1999; Pouwels et al., 1996) (Shaw et al., 2000)
	pGIP/pMEC	pLAB1000	RCR	(Grangette et al., 2001)
	pNZ	pSH71	RCR	(Pavan et al., 2000)

### 2.2. Intégration

La stabilisation ségrégationnelle des gènes clonés par intégration dans le chromosome offre une alternative à l'utilisation de vecteurs plasmidiques réplicatifs, spécialement dans les cas où les vecteurs recombinants sont hautement instables. L'intégration permet une expression stable *in vivo* même en absence de sélection par les antibiotiques. Le principal inconvénient de cette stratégie est que le niveau de production de la protéine recombinante est souvent plus bas que celui atteint au départ d'un plasmide multicopie.

Une variété de systèmes d'intégration permettant d'insérer des gènes étrangers dans le chromosome ont été développés chez les lactocoques (voir Davidson et al., 1996). Chez les lactobacilles plusieurs systèmes sont maintenant disponibles, (Martin et al., 2000; Mercenier et al., 2000). Par exemple, un système d'intégration a été développé utilisant un plasmide non-répliatif comme vecteur suicide et des éléments d'un bactériophage tempéré pour permettre l'intégration du plasmide dans le gène chromosomique du t-RNA sérine (Dupont et al., 1995). De même, Hols et al. (Hols P., communication personnelle) ont développé des vecteurs d'intégration qui s'insèrent soit dans le locus du t-RNA sérine soit dans le locus de la lactate déshydrogénase (*ldh*) de *L. plantarum*. Des excisants dépourvus de séquences plasmidiques contenant les marqueurs de résistance aux antibiotiques peuvent être générés après un second événement de recombinaison, grâce à l'existence de séquences homologues. Ces deux systèmes ont été utilisés pour construire des souches vaccinales de *L. plantarum* (voir (Mercenier, et al., 2000). Chez les streptocoques, la souche Challis (*S. gordonii*) est naturellement compétente ; la recombinaison homologue et l'échange allélique de marqueurs génétiques sont ainsi relativement plus faciles à accomplir chez *S. gordonii* que chez *Lc. lactis* ou chez les lactobacilles (Dobrzanski & Osowiecki, 1967). Des vecteurs d'intégration ont ainsi été développés pour *S. gordonii* afin d'exprimer des gènes hétérologues (Pozzi et al., 1988; Tao et al., 1992).

## 2.3. Promoteurs

### 2.3.1. Description

La première étape dans le processus d'expression d'un gène est l'initiation de la transcription. Ceci nécessite la reconnaissance par l'ARN polymérase de séquences d'ADN spécifiques localisées en 5' du site d'initiation de la traduction. Du fait de son rôle important dans l'efficacité et le contrôle de l'expression des gènes, le processus d'initiation de la transcription a reçu une attention considérable chez les bactéries lactiques, spécialement chez *Lactococcus* et *Lactobacillus* ssp. (Pouwels & Leer, 1993; de Vos & Simons, 1994; Mercenier et al., 1994). Sur base de l'analyse d'un grand nombre de promoteurs, une séquence consensus a pu être déduite. Ainsi, les promoteurs de lactobacilles (Pouwels & Leer, 1993; de Vos, 1999) contiennent les hexamères conservés -35 et -10 trouvés chez *E. coli* et *B. subtilis*. Les hexamères sont séparés idéalement par une séquence de 17 nucléotides contenant un

dinucléotide TG en position -15. Enfin, la région immédiatement en amont de la séquence -35 est riche en AT.

### 2.3.2. Promoteurs utilisés pour l'expression hétérologue chez les bactéries lactiques

Une variété de promoteurs constitutifs de forces différentes ont pu être isolés chez *Lactococcus* et *Lactobacillus* grâce à l'expression de gènes rapporteurs (Koivula et al., 1991; Pouwels & Leer, 1993). Ces dernières années, plusieurs promoteurs inductibles ou répondant à des facteurs environnementaux ont été identifiés (Pouwels & Leer, 1993; de Vos, 1999). Citons à titre d'exemples, les promoteurs de l'opéron lactose, de l'opéron de biosynthèse de la nisine et de gènes phagiques pour *Lc. lactis* ainsi que ceux gouvernant les gènes du métabolisme du xylose chez *Lactobacillus pentosus* et de l' $\alpha$ -amylase de *Lactobacillus amylovorus*. Les systèmes inductibles offrent l'avantage de pouvoir moduler la production des protéines d'intérêt.

Chez *Lc. lactis*, une grande diversité de vecteurs d'expression constitutive a été utilisée pour des études d'immunisation effectuées par Wells et al., Robinson et al. et Steidler et al. (Wells et al., 1995; Robinson et al., 1997; Steidler et al., 1998b). De plus, des systèmes d'expression inductibles sont disponibles pour la production d'antigènes. Parmi eux, le système régulé basé sur l'activation du promoteur *nisA* par induction à la nisine a été largement utilisé pour la synthèse de grandes quantités de protéines hétérologues chez l'hôte. Une alternative à ce système est l'utilisation du promoteur *lac*, inductible au lactose pour la régulation de l'expression de la ARN polymérase du bactériophage T7 de *E. coli*. Le système inductible à la nisine est plus étroitement régulé que le système T7 et est plus approprié pour l'expression de gènes qui peuvent avoir un effet toxique ou ralentir la croissance de *Lc. Lactis* (De Vos, 1999).

Chez les lactobacilles, de nombreux promoteurs constitutifs forts ou de force moyenne ont été utilisés jusqu'à présent pour la production d'antigènes (Pouwels et al., 1996; Hols et al., 1997; Rush, 1997; Pouwels, et al., 1998; Kullen & Klaenhammer, 1999; Maassen et al., 1999; Grangette et al., 2001). Par contre, un nombre limité de systèmes d'expression régulés ont été développés, comme par exemple ceux basés sur le promoteur  $\alpha$ -amylase de *Lactobacillus amylovorus* ou sur le système nisine de *Lc. lactis* (voir Pouwels et al., 1996; Kullen & Klaenhammer, 1999; Pavan et al., 2000). Le système d'expression inductible à la nisine

développé et optimisé chez *L.plantarum* a été utilisé pour produire, entre autres protéines étrangères, la GFP (Geoffroy et al., 2000). Les lactobacilles fluorescents ont été utilisés pour suivre l'interaction des bactéries avec les macrophages et pour initier l'analyse de leur devenir après administration locale chez la souris.

Chez *S. gordonii*, un système hôte-vecteur d'expression de gènes hétérologues a été développé (Pozzi et al., 1992a). Il est basé sur (i) l'intégration chromosomique de l'ADN hétérologue, (ii) l'utilisation de promoteurs présents sur le chromosome de *Streptococcus*, et (iii) l'utilisation du gène *emm6*, codant la protéine de surface M6 (Fischetti, 1989). Grâce à cette méthode, les auteurs ont obtenu des souches recombinantes de *S. gordonii* stables exposant les protéines hétérologues à leur surface. Cette approche a également permis l'identification de promoteurs chromosomiques forts par la sélection de souches de *S. gordonii* productrices de grandes quantités de M6 (Pozzi et al., 1992b).

## 2.4. Localisation de la protéine hétérologue

Une des considérations importantes à prendre en compte dans le développement d'une bactérie lactique comme vecteur, est la localisation de la protéine hétérologue. La meilleure protection immunitaire contre une protéine antigénique est-elle obtenue quand l'antigène exprimé est :

- maintenu à l'intérieur de la cellule ?
- relargué dans le milieu extracellulaire ?
- présenté à la surface de la cellule ?

La présentation cellulaire optimale de l'immunogène peut dépendre de différents facteurs comme le choix de la souche vecteur (persistante ou non-persistante), les effets désirés et le devenir de la bactérie *in vivo*. Par conséquent, plusieurs systèmes d'expression ont été développés pour diriger la synthèse de la protéine hétérologue dans le cytoplasme, dans le milieu extracellulaire ou en surface de la bactérie.

### 2.4.1. Localisation cytoplasmique

La production de protéines hétérologues dans le cytoplasme des bactéries lactiques reste certainement à l'heure actuelle la plus facile à obtenir (par comparaison à la sécrétion et l'ancrage). Le gène codant la protéine hétérologue est cloné en aval d'un promoteur de

bactérie lactique. Ainsi, sous le contrôle d'un promoteur inductible, les protéines hétérologues produites peuvent représenter jusqu'à 20% des protéines cellulaires de la bactérie (Wells et al., 1993a; de Ruyter et al., 1996). Norton et al. ont également montré que, dans le cas de la TTFC par exemple, la production cytoplasmique est 25 fois plus efficace que la sécrétion et 200 fois plus que l'ancrage (Norton et al., 1996). Cependant, la production de la protéine hétérologue en trop grande quantité dans le cytoplasme peut être toxique pour la bactérie, pouvant engendrer un ralentissement de sa croissance et même sa mort (Kurland & Gallant, 1996). La libération de la protéine hétérologue cytoplasmique dans le milieu externe n'est possible que dans des conditions où la bactérie lyse et libère son contenu cytoplasmique.

#### 2.4.2. Sécrétion

Les connaissances actuelles sur les mécanismes de sécrétion des bactéries reposent sur les études menées chez les organismes modèles tels qu'*E. coli* (Pugsley, 1993) et *B. subtilis* (Tjalsma et al., 2000). Très peu de composants protéiques impliqués dans la translocation membranaire ont été caractérisés chez les bactéries lactiques. L'exportation ou la sécrétion de la majorité des protéines nécessite l'intervention d'une machinerie de sécrétion constituant la voie générale d'exportation ou voie de type II. Ce mécanisme permet la translocation énergie-dépendante à travers la membrane cytoplasmique. Les protéines empruntant la voie générale de sécrétion présentent un peptide signal amino-terminal et sont guidées vers un « translocon » localisé dans la membrane cytoplasmique, la machinerie Sec. Au cours de la translocation, le peptide signal est clivé par une peptidase signal comme c'est le cas par exemple de la protéine M6 de *S. pyogenes* (Fischetti, 1989), de la protéase PrtP (de Vos et al., 1989) et Usp45 (van Asseldonk et al., 1990) de *Lc. lactis*. La protéine mature est exportée dans le milieu extracellulaire dans le cas des bactéries à Gram-positif ou dans le périplasma dans le cas des bactéries à Gram-négatif. Certaines protéines ne possédant pas de peptide signal sont sécrétées par le système des ABC transporteurs, correspondant à la voie de sécrétion de type I empruntée par exemple par les bactériocines (Nes et al., 1996).

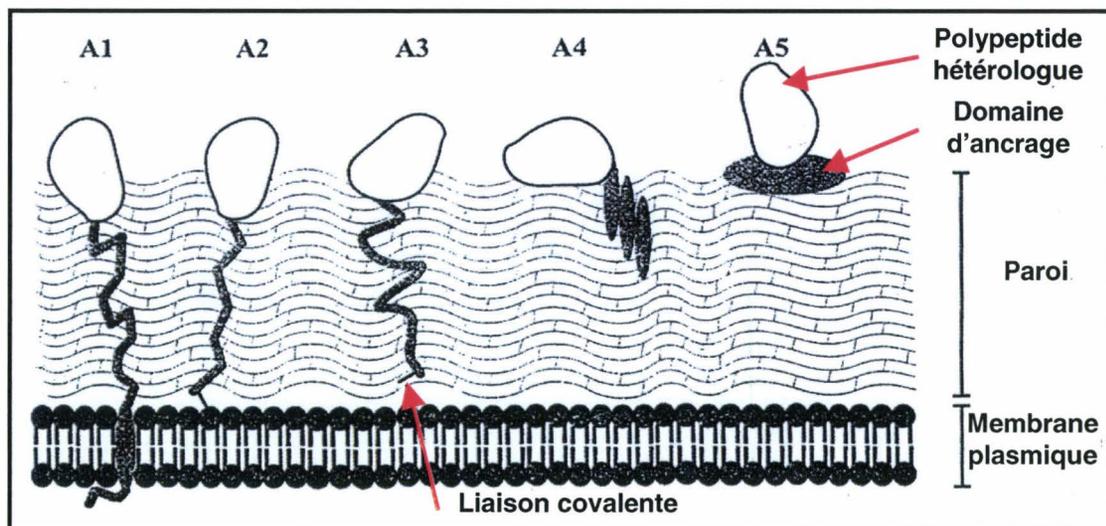
Plusieurs systèmes utilisant des signaux de sécrétion de lactocoque, streptocoque et lactobacille ont été développés pour la sécrétion de protéines hétérologues chez les bactéries lactiques. Les peptides signaux fréquemment utilisés sont celui de Usp45 (Wells et al., 1993b; Arnau et al., 1997; Slos et al., 1998; Steidler et al., 1998b; Drouault et al., 2000;), de PrtP (Simons et al., 1991; Wells et al., 1993a; Slos et al., 1998), et de M6 (Hols et al., 1997;

Beninati et al., 2000; Dieye et al., 2001;). D'autres signaux de sécrétion tels que ceux de l' $\alpha$ -amylase de *S. bovis* et ceux de la couche S de *L. brevis* ont également été exploités pour l'export de protéines chez les bactéries lactiques (Sato et al., 1997; Savijoki et al., 1997).

### 2.4.3. Ancrage

#### 2.4.3.a. Mécanismes d'ancrage

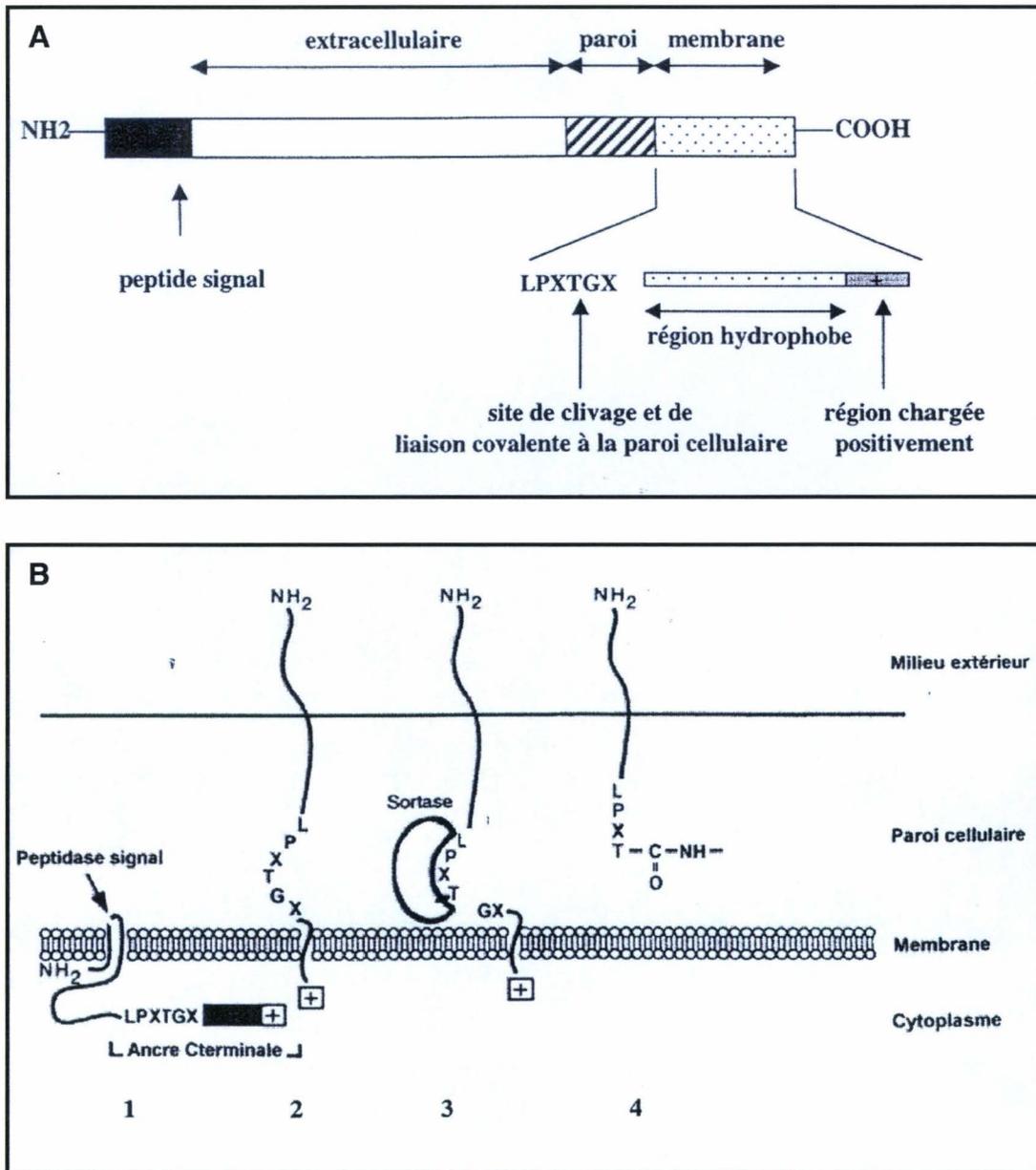
Plus de 60 protéines de surface ont été répertoriées et séquencées chez les bactéries à Gram positif (Navarre & Schneewind, 1999). Toutes possèdent un peptide signal et empruntent la voie générale de sécrétion. Il existe 5 modes d'ancrage différents schématisés sur la figure 15. Les modes A1 et A2 lient la protéine de surface à la membrane. Le mode A3 lie de façon covalente la protéine aux composants de paroi. Les modes d'ancrage A4 et A5 interagissent avec la paroi cellulaire de façon inconnue (Leenhouts et al., 1999). Seul le mode A3 sera décrit dans ce chapitre.



**Figure 15.** Modes d'ancrage des protéines chimères à la surface des bactéries lactiques (d'après Leenhouts & al., 1999). **A1.** Région transmembranaire d'ancrage. **A2.** Domaine d'ancrage des lipoprotéines. **A3.** Domaine d'ancrage de type LPTXG. **A4.** Domaine de liaison à la paroi de type « AcmA-repeats ». **A5.** Région d'attachement des couches protéiques de surface.

Le signal d'ancrage de type 3 (A3) situé du côté C-terminal de la protéine contient des séquences hautement conservées. Cette structure d'ancrage varie de 30 à 45 acides aminés selon les protéines (Schneewind et al., 1993) et contient un pentapeptide très conservé LPXTG (Fischetti et al., 1990), suivi d'une longue chaîne hydrophobe terminée par une queue d'ancrage chargée positivement (6 à 7 acides aminés) à l'extrémité C-terminale (Figure 16A). La figure 16B propose un modèle d'ancrage en 4 étapes pour l'ancrage des protéines contenant le motif LPXTG : (i) L'étape initiale correspond à l'export du précurseur de la protéine de surface à travers la membrane par un mécanisme Sec-dépendant. (ii) Au cours de la translocation membranaire, la queue chargée jouerait un rôle de « stop » en interagissant avec les phospholipides chargés négativement du côté cytoplasmique de façon à positionner le motif LPXTG à la surface externe de la membrane plasmique. (iii) Une enzyme, appelée sortase cliverait la protéine entre la thréonine (T) et la glycine (G) du motif LPXTG (Navarre & Schneewind, 1994). La formation d'un intermédiaire acylé entre la sortase et le groupe carboxyl de la thréonine pourrait prévenir le relarguage de la protéine de surface dans le milieu extracellulaire. (iv) Une liaison amide s'établirait ensuite entre le groupe carboxyl de la thréonine et un groupe aminé libre du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Schneewind et al., 1995).

Les signaux d'ancrage semblent pouvoir fonctionner non seulement chez l'hôte d'origine mais également dans d'autres bactéries à Gram positif (Iwaki et al., 1990; Pozzi et al., 1992b ; Schneewind et al., 1993). Piard et al. ont notamment montré que l'expression du gène *emm6*, placé sous le contrôle de promoteurs de lactocoque, conduisait à l'ancrage efficace de la protéine M6 chez plusieurs bactéries lactiques (*Lc. lactis*, *S. thermophilus*, *L. fermentum* et *L. sake*) (Piard et al., 1997).



**Figure 16. A.** Schéma de la structure d'une protéine de surface d'une bactérie à Gram positif. La séquence N-terminale correspond au peptide signal. La séquence C-terminale, nécessaire à l'ancrage de la protéine, comporte un motif LPTXG, une région hydrophobe et un court domaine chargé positivement. **B.** Ancrage en 4 étapes des protéines de surface chez les bactéries à Gram positif (modifié d'après Schneewind & al., 1995).

### **2.4.3.b. Protéines de surface utilisées pour l'ancrage de protéines hétérologues chez les bactéries lactiques**

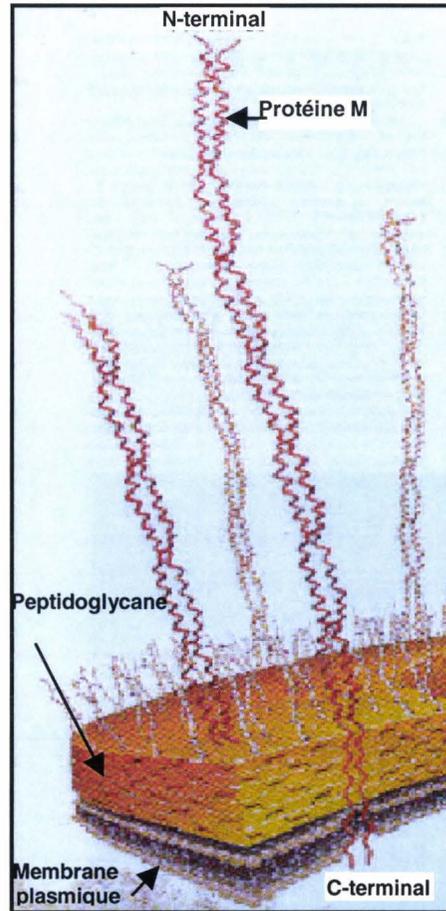
Pendant ces 15 dernières années, des progrès considérables ont été réalisés pour l'ancrage de protéines hétérologues à la surface des bactéries. Les premiers exemples concernaient les bactéries à Gram négatif, notamment *E. coli*, chez lesquelles les protéines LamB ou PhoE, par exemple, étaient employées (Agterberg et al., 1987; Charbit et al., 1987). Depuis, de nombreux systèmes d'ancrage de protéines hétérologues chez les bactéries à Gram positif ont été développés comme par exemple chez *S. xylosus* et *S. carnosus* ainsi que chez les bactéries lactiques (Tableau 7).

Pozzi et al. ont été les premiers à ancrer une protéine de fusion à la surface de *S. gordonii* grâce aux signaux d'ancrage de la protéine M6 de *S. pyogenes* (Pozzi et al., 1992b). M6 est un dimère d'hélices  $\alpha$  allongées et enroulées entre elles (« coiled-coil »), formant des filaments à la surface externe de la bactérie (Figures 17, Fischetti, 1991). C'est une protéine de 49 kDa, possédant un peptide signal de 42 acides aminés (Hollingshead et al., 1986) et un motif d'ancrage de type A3 (Leenhouts et al., 1999). Environ 80% de la séquence peptidique est constituée de séquences répétées (Figure 18). L'utilisation de M6 pour exposer des protéines hétérologues consiste à supprimer la partie centrale (environ 180 acides aminés) responsable de réactions croisées avec certains tissus de mammifères (Robinson & Kehoe, 1992). Ce fragment interne est remplacé par une séquence protéique hétérologue. Le plasmide recombinant correspondant, construit chez *E. coli*, est ensuite intégré dans le chromosome de *S. gordonii*. Grâce à cette méthode, plusieurs antigènes et épitopes ont été exposés en surface de *S. gordonii* à des niveaux de plus de 10000 molécules par cellule (Pozzi et al., 1997). Des antigènes polypeptidiques comprenant entre 15 et 441 acides aminés, d'origine virale, bactérienne ou eucaryote ont été produits en paroi par utilisation de ce système (Tableau 7). Cette méthode permet d'obtenir des souches recombinantes de *S. gordonii* stables, capables de présenter des protéines hétérologues à leur surface. Cependant ces souches recombinantes portent encore les gènes codant les marqueurs de résistance aux antibiotiques. Récemment, ce système a permis d'exposer le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) de *Clostridium tetanii* en surface de *S. gordonii*. L'analyse par cytométrie de flux a révélé que 78% des cellules étaient positives pour l'exposition de la TTFC en surface (Medagliani et al., 2001). L'utilisation du domaine d'ancrage de la M6, pour exposer une nucléase de staphylocoque (Nuc) à la surface de *Lc. Lactis*, *L. sakei*, *L. plantarum* et *L. casei*, a conduit à l'ancrage de 40% de la protéine Nuc ; des quantités importantes de protéines hétérologues restant associées

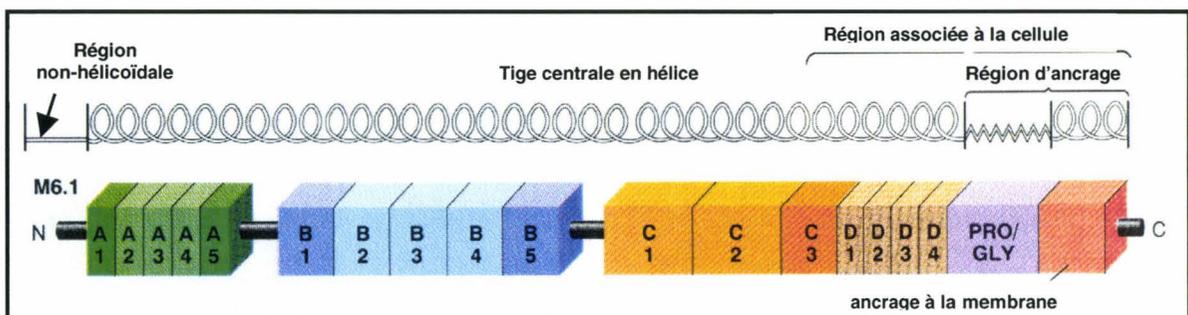
**Tableau 7.** Domaines d'ancrage utilisés pour immobiliser des protéines hybrides dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif (d'après Leenhouts & al., 1999).

Souche bactérienne	Domaine d'ancrage <sup>type</sup>	Origine	Proteine	Origine	Références
<i>Staphylococcus carnosus et xylosus</i>	ProtA <sup>A3</sup>	<i>S. aureus</i>	CTB	<i>V. cholerae</i>	Liljeqvist et al., 1997
			ABP	<i>Streptococcus</i>	Andréoni et al., 1997
			ScFv anti-hIgE GpG (épitope 101 aa) M3 (Pf155/RESA)	Souris hRSV	Gunneriusson et al., 1996 Nguyen et al., 1993, 1995 ; Robert et al., 1996
	FnBPB <sup>A3</sup>	<i>S. aureus</i>	Lipase	<i>P. falciparum</i>	Samuelson et al., 1995; Hansson et al., 1992
			β-lactamase	<i>S. hyicus</i> <i>E. coli</i>	Strauss & Götz, 1996 Strauss & Götz, 1996
<i>Streptococcus gordonii</i>	M6 <sup>A3</sup>	<i>S. pyogenes</i>	M6	<i>S. pyogenes</i>	Pozzi et al., 1992b ; Oggioni et Pozzi, 1996
			E7	HPV	Pozzi et al., 1992a ; Oggioni et al., 1995 ; Medagliani et al., 1997 Pozzi et al., 1994
			gp120 (épitope T) gp120/E7 (épitope V3) Ag5.2 HA	HIV HIV/HPV	Di Fabio et al., 1998 ; Medagliani et al., 1998
			LTB	Venin de frelon Virus rougeole	Medagliani et al., 1995 Medagliani et al., 1998 ; Pozzi et al., 1997 Pozzi et al., 1997
			gp120/LTB (épitope V3)	<i>E. coli</i> HIV/ <i>E. coli</i>	Medagliani et al., 1998 ; Pozzi et al., 1997
<i>Lactococcus lactis</i>	ProtA <sup>A3</sup>	<i>S. aureus</i>	streptavidine	<i>Sm. avidinii</i>	Steidler et al., 1998b
	M6 <sup>A3</sup>	<i>S. pyogenes</i>	nuclease	<i>S. aureus</i>	Piard et al., 1997
	Tmp1-7 <sup>A1</sup>	<i>Lc. lactis</i>	nuclease	<i>S. aureus</i>	Poquet et al., 1998
	Nlp1-4 <sup>A2</sup>	<i>Lc. lactis</i>	nuclease	<i>S. aureus</i>	Poquet et al., 1998
	PrtP <sup>A3</sup>	<i>Lc. lactis</i>	TTFC	<i>C. tetanii</i>	Norton et al., 1995 ; Norton et al., 1996
<i>Lactobacillus ssp.</i>	M6 <sup>A3</sup>	<i>S. pyogenes</i>	LTB	<i>E. coli</i>	Rush et al., 1997
			gp41E (épitope de Katinger) HA (épitope de Hackett) TTFC	HIV Virus grippe	Mercenier et al., 1996 Pouwels et al., 1996
			VP7 et VP8 Urease A et B	<i>C. tetanii</i> Rotavirus <i>H. pylori</i>	Maassen et al., 1999 Pouwels et al., 1998 Pouwels et al., 1998

à la membrane. Le nombre de molécules de Nuc exposées à la surface des bactéries est estimé à  $10^4$  par cellule (Dieye et al., 2001).



**Figure 17.** Structure de la protéine M6 en filaments étendus à la surface de la bactérie (d'après Fischetti, 1991).



**Figure 18.** Séquence de la protéine M6 (d'après Fischetti, 1991). Environ 80 % de la protéine consiste en des blocs de séquences répétées (A, B, C et D). La région riche en prolines et glycines aide la protéine à traverser la paroi cellulaire. Les acides aminés proches de l'extrémité C-terminale permettent l'attachement à la membrane cellulaire.

La partie C-terminale des protéinases PrtP de *Lc. lactis* et de *L. paracasei* a également été utilisée pour tenter d'ancrer des protéines hétérologues à la surface des bactéries lactiques (Tableau 7). La fusion du domaine d'ancrage de PrtP à la TTFC n'a pas permis d'ancrer correctement la protéine hybride à la surface de *Lc. lactis*. En effet, un traitement lysozyme/lysostaphine a révélé que la TTFC était présente dans la membrane cellulaire et non dans la paroi (Norton et al., 1995; Norton et al., 1996).

La protéine PrtP de *L. paracasei* semble avoir rencontré plus de succès pour l'exposition de la TTFC en surface de *L. casei*. L'analyse en cytométrie de flux indique que *L. casei* expose approximativement  $4 \times 10^3$  molécules de TTFC par cellule (Maassen et al., 1999; Shaw et al., 2000).

Le domaine d'ancrage de la protéine A de *Staphylococcus aureus* a également été utilisé avec succès pour exposer la streptavidine à la surface de *Lc. Lactis* (Steidler et al., 1998b).

### **3. Réponse immunitaire induite par les bactéries recombinantes**

#### **3.1. *Lactococcus lactis***

Iwaki et al. (1990) ont été les premiers à utiliser les lactocoques recombinants comme vecteurs vaccinaux (Iwaki et al., 1990). Dans cette étude, l'administration orale de lactocoques tués produisant un antigène de *Streptococcus mutans* à leur surface, a permis d'induire une réponse systémique et locale contre l'antigène. Depuis, la plupart des études immunologiques ont été menées avec des souches de *Lc. lactis* produisant le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) comme antigène modèle. La TTFC est un polypeptide non-toxique de 50 kDa capable d'induire une réponse protectrice (Fairweather et al., 1987). L'administration de souches de *Lc. lactis* produisant la TTFC par voie sous-cutanée induit la production d'anticorps sériques anti-TTFC (Wells et al., 1993a). Une étude comparant l'immunogénicité de souches de *Lc. lactis* produisant la TTFC dans le cytoplasme, en surface ou dans le milieu de culture, a été effectuée en utilisant le domaine de sécrétion de Usp45 et le domaine d'ancrage de la protéinase PrtP de lactocoque en fusion avec la TTFC (Norton et al., 1995; Norton et al., 1996). L'immunisation avec différentes quantités de bactéries indique que la réponse en anticorps sériques contre la TTFC est dépendante de la dose d'antigène. La forme de TTFC associée à la surface cellulaire est 10 à 20 fois plus immunogénique que les formes alternatives de TTFC (Norton et al., 1996). Malheureusement, les souches synthétisant

l'antigène dans différentes localisations cellulaires n'ont pas été comparées par voie muqueuse.

L'administration nasale de lactocoques synthétisant de grandes quantités de TTFC (utilisant pLET1 et le système T7) dans le cytoplasme induit des taux significatifs d'IgG sériques (Norton et al., 1997). Les souris étaient inoculées avec  $5 \times 10^8$  ou  $5 \times 10^9$  UFC de souches productrices ou de la souche contrôle aux jours 1, 7 et 29, avec ou sans toxine cholérique (10 $\mu$ g) comme adjuvant. La réponse anticorps moyenne induite par  $5 \times 10^8$  UFC de la souche productrice de TTFC (contenant une quantité estimée à 6 $\mu$ g de TTFC) est plus importante que celle induite par inoculation de 60  $\mu$ g de TTFC purifiée. L'utilisation de la toxine cholérique comme adjuvant muqueux augmente significativement la réponse à la TTFC purifiée mais pas à la TTFC délivrée par le lactocoque. Les anticorps sériques induits par les deux doses de bactéries sont capables de protéger les souris contre un challenge sous-cutané réalisé avec 20 fois la LD50 de toxine tétanique. L'induction d'une réponse anticorps locale contre la TTFC a été étudiée par ELISPOT pour dénombrer les lymphocytes producteurs d'anticorps spécifiques (IgA) de l'antigène. Une inoculation nasale de  $5 \times 10^9$  UFC de lactocoques exprimant la TTFC induit des lymphocytes producteurs d'IgA anti-TTFC dans les poumons et dans la muqueuse nasale. La co-administration de toxine cholérique augmente de façon remarquable la quantité de lymphocytes produisant des sIgA dans les muqueuses bronchique et nasale mais n'a aucun effet sur le niveau d'anticorps sériques anti-TTFC (Norton et al., 1997). D'autres études ont été conduites avec des lactocoques produisant de façon constitutive la TTFC dans le cytoplasme à des niveaux relativement modérés (estimés à 1% de protéine total, utilisant le système pTREX1 (Robinson et al., 1997). Ces souches induisent des réponses anticorps sériques protectrices contre la TTFC par voies intra-nasale et orale (intra-gastrique). Il a également été établi, pour l'administration intra-nasale, que les titres d'anticorps étaient similaires si les bactéries étaient données vivantes ou inactivées par la mitomycine C ou la formaline. Aucune comparaison n'a été effectuée par voie orale, et la différence de protection n'a pas été évaluée. Les isotypes d'anticorps anti-TTFC comprenaient des IgG1 et des IgG2a comme dans le cas d'immunisation par voie intra-nasale (Norton et al., 1997). Des anticorps anti-TTFC muqueux ont également été détectés dans les fécès des souris immunisées. Après administration intra-nasale, la réponse IgA fécale contre la TTFC atteint de hauts niveaux aux jours 35 et 41 après immunisation. Chez les souris vaccinées par voie intra-gastrique avec les lactocoques exprimant la TTFC, la réponse IgA atteint déjà un niveau significatif 15 jours après vaccination, mais retombe au même niveau que le groupe contrôle au jour 38.

Des réponses anticorps contre des antigènes de *Lc. lactis* ont également été détectées dans le sérum de souris immunisées par voie intra-nasale ou intra-gastrique avec des lactocoques recombinants (Robinson et al., 1997). Les réponses anticorps anti-lactocoques étaient néanmoins environ 10 fois plus faibles que les réponses spécifiques contre la TTFC. Des essais de prolifération de cellules T avec des splénocytes de souris immunisées avec des lactocoques recombinants ont également démontré la présence d'une réponse cellulaire contre des antigènes de lactocoque (Wells & Mercenier, sous presse).

Des études similaires ont été décrites utilisant la glutathion S-transférase (Sm28GST) de *Schistosoma mansoni* comme antigène modèle. L'antigène était exprimé à un bon niveau (estimé à 5-10% des protéines totales) chez *Lc. lactis* utilisant le système T7 ; toutefois, cette protéine s'est avérée moins immunogène que la TTFC par voies systémique et muqueuse (Chamberlain et al., 1997).

Un autre antigène modèle a été étudié : il s'agit d'une glycoprotéine (gp50) du virus responsable de la maladie d'Aujesky. Ce virus infecte les porcs par le tractus respiratoire, les jeunes porcs étant plus sensibles à la maladie. Il a été démontré que la stimulation des réponses immunitaires muqueuses contre le virus correspond à une stratégie efficace pour inhiber la réplication du virus au site primaire d'infection et que la gp50 est un antigène vaccinal protecteur (Ishii et al., 1988; Mukamoto et al., 1991; Takada et al., 1994). Le gène codant la gp50, très riche en GC (>70%), a été exprimé chez *E. coli* et *Lc. Lactis*. Pour des raisons d'instabilité structurelle, un gène synthétique dont l'usage des codons était plus adapté aux bactéries lactiques, a dû être construit. De hauts niveaux d'expression ont ainsi été obtenus (5%) et la souche recombinante de *Lc. lactis* s'est révélée être immunogénique par voie systémique. De plus, l'immunisation intra-nasale chez la souris induit des réponses anticorps et cellulaires contre l'antigène natif (Rush & Wells, résultats non-publiés).

*Lc. lactis* a également été utilisé pour produire un polysaccharide capsulaire de type 3 de *Streptococcus pneumoniae*. L'administration de la souche recombinante par voie intrapéritonéale a permis d'induire une réponse contre la capsule, identique à celle obtenue par immunisation avec des quantités comparables d'antigène purifié (Gilbert et al., 2000).

La possibilité d'utiliser *Lc. lactis* pour délivrer des cytokines au système immunitaire muqueux a été investiguée récemment. Des souches co-produisant la TTFC dans le cytoplasme et une cytokine (IL-2 ou IL-6) dans le milieu extracellulaire ont été administrées par voie intra-nasale chez la souris. Les taux d'anticorps sériques anti- TTFC obtenus chez les

souris immunisées avec les souches produisant les cytokines étaient 10 à 15 fois plus élevés que ceux obtenus après administration des souches produisant la TTFC seule (Steidler et al., 1998a). Ceci démontre que les bactéries lactiques peuvent être utilisées pour délivrer différents types d'immunomodulateurs.

*L. lactis* a également été évalué comme vecteur de délivrance de molécules à visée thérapeutiques. Une étude récente a montré que l'administration intra-gastrique de *L. lactis* sécrétant l'IL10 murine a un effet préventif et thérapeutique dans deux modèles (murins) de colite (Steidler et al., 2000). Cette approche est basée sur le rôle de l'IL10 comme modulateur des cellules T régulatrices qui contrôlent les réponses inflammatoires contre les antigènes intestinaux (Asseman et al., 1999). Une réduction de 50% des symptômes inflammatoires a été observée après administrations répétées de lactocoques recombinants. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec un traitement anti-inflammatoire traditionnel. L'effet observé requiert une synthèse locale (*de novo*) de l'IL10, puisque les lactocoques recombinants tués n'améliorent pas les scores histologiques d'inflammation (Steidler et al., 2000).

Cette approche est en cours d'évaluation pour développer de nouvelles approches thérapeutiques de différentes maladies. Ainsi, Drouault et al. ont décrit la construction d'une souche de *L. lactis* recombinante qui sécrète une lipase de staphylocoque. Le but final de cette étude est d'évaluer l'effet thérapeutique de telles souches dans un modèle porcin d'insuffisance pancréatique (Drouault et al., 2000).

### 3.2. *Streptococcus gordonii*

La première démonstration qu'une bactérie commensale recombinante pouvait être utilisée comme vecteur vivant pour délivrer des antigènes aux surfaces muqueuses a été obtenue avec *S. gordonii* (Medaglini et al., 1995). Les études d'immunisations chez la souris avec des souches de *S. gordonii* recombinantes ont montré qu'une seule dose oro-nasale ( $10^7$  à  $10^9$  UFC) résultait en des taux élevés de colonisation de la cavité nasopharyngée, comparables à ceux obtenus avec la souche sauvage (Medaglini et al., 1995). Les souches recombinantes de *S. gordonii* sont aussi capables de coloniser la muqueuse vaginale après une administration intra-vaginale d'une dose unique de bactéries (Medaglini et al., 1997a). Ceci ouvre la possibilité de vacciner contre les pathogènes sexuellement transmissibles (Medaglini et al., 1997b; Medaglini et al., 1998).

Des souches de *S. gordonii* exprimant l'épitope E7 du virus du papillome humain ou de l'allergène Ag5.2 en fusion avec M6 ont été administrées chez la souris par voie intra-nasale et intra-vaginale (Medaglini et al., 1997a). Dans les deux cas, des anticorps sériques (IgG1 et IgG2a) et locaux (sIgA) spécifiques des antigènes ont été obtenus (Medaglini et al., 1997a; Medaglini et al., 1997b). Dans les études où *S. gordonii* synthétise E7, des IgA spécifiques ont été détectées dans les lavages vaginaux pendant plus de 10 semaines après administration. Il a également été montré que la réponse immunitaire dépendait d'une colonisation efficace : les bactéries mortes n'induisent pas de réponse (Medaglini et al., 1997a; Medaglini et al., 1997b).

Très peu d'immunisations orales ont été rapportées pour ce microorganisme. Cependant des souches recombinantes produisant la LTB en surface ont été utilisées pour induire, après administration intra-gastrique, des IgG sériques et des IgA fécales, même si *S. gordonii* ne persiste pas dans le tube digestif de la souris (Ricci et al., 2000).

Medaglini et al. ont de plus testé la capacité d'une souche recombinante de *S. gordonii* à induire une protection en utilisant la TTFC comme antigène modèle. L'immunisation parentérale ou intra-nasale conduit à un taux de protection de 82% ou 38%, respectivement, des souris immunisées. Les auteurs ont montré qu'il existe une corrélation entre la concentration en IgG anti-TTFC et le temps de survie des animaux non protégés (Medaglini et al., 2001).

Ces études ont été étendues à l'immunisation par voie vaginale de singes avec des souches de *S. gordonii* produisant E7 et VIH-1-V3. Aucune colonisation vaginale n'a été observée mais des administrations répétées de la souche recombinante ont conduit à l'induction d'IgA locales spécifiques et d'IgG sériques (Medaglini et al., 1998). La prolifération de cellules T a été mesurée *in vitro* contre les antigènes E7 et VIH-1-V3 après immunisation des singes avec les souches recombinantes (Di Fabio et al., 1998).

Des études récentes ont montré que les cellules dendritiques de souris sont activées après phagocytose de *S. gordonii*, indiquant qu'elles peuvent remplir la fonction de présentation d'antigène pour cette bactérie. Ainsi, l'ovalbumine (OVA) exposée en surface de *S. gordonii* est « processée » et présentée aux molécules du CMH de classe I 10<sup>6</sup> fois plus efficacement que l'OVA soluble (Rescigno et al., 1998). Ces résultats ont été étendus aux cellules dendritiques humaines générées à partir de monocytes du sang périphérique. Corinti et al. (1999) ont utilisé une souche recombinante de *S. gordonii* synthétisant la TTFC en surface. Ces auteurs ont montré que la souche induit la maturation des cellules dendritiques par augmentation de la synthèse de cytokines et de chémokines. Les cellules dendritiques ainsi

activées par les bactéries produisant la TTFC sont 100 fois plus efficaces pour présenter l'antigène (activation spécifique des cellules T) que celles activées par la TTFC soluble ou conjuguée à des particules inertes (Corinti et al., 1999; Corinti et al., 2000).

De même que *L. lactis*, *S. gordonii* a également été utilisé avec succès pour délivrer une molécule thérapeutique au niveau des surfaces muqueuses. Beninati et al. ont utilisé *S. gordonii* pour sécréter ou ancrer un anticorps recombinant à activité microbicide (H6 ScFv) afin de traiter une vaginite expérimentale causée par *Candida albicans*. Les deux types de souches recombinantes se sont avérées capables de coloniser le vagin de rat et ont conduit à une guérison de l'infection à *C. albicans* chez 75% (sécrétion) et 37,5% (ancrage) des animaux, respectivement (Beninati et al., 2000).

### **3.3. *Lactobacillus* ssp.**

En comparaison avec *Lc. lactis* et *S. gordonii*, le choix initial des lactobacilles comme vecteurs de vaccination est plus complexe du fait de l'existence d'une grande diversité d'espèces qui peuvent différer par leur persistance, leur capacité de survie *in vivo* et leurs propriétés intrinsèques d'immunomodulation (Pouwels et al., 1998; Mercenier et al., 2000;). Comme mentionné plus haut, le genre *Lactobacillus* est très vaste, incluant des isolats de différentes origines qui se sont probablement adaptés à des niches écologiques spécifiques. Il est généralement admis que la capacité de persistance ou de colonisation est hôte-, tissu- et site-spécifique. On peut donc proposer que le vecteur optimal devra être sélectionné pour cibler un hôte ou une muqueuse en particulier. Cependant, les expériences menées jusqu'à présent avec les lactobacilles comme système de vectorisation d'antigène ont été restreintes à la souris, chez laquelle des espèces de lactobacilles d'origines diverses ont été testées. Dans ce modèle, les différences observées en termes d'immunisation semblent être fonction principalement du niveau de production de l'antigène de la souche recombinante et de la capacité de la souche à survivre au passage à travers l'estomac ou à résider temporairement dans le tractus gastro-intestinal. En principe, en fonction des caractéristiques de la souche vaccinale, les lactobacilles peuvent conduire au développement de différents systèmes. L'utilisation de souches incapables de s'établir dans une cavité corporelle pourrait représenter une approche similaire à celle développée avec *Lc. lactis*. Au contraire, une souche appartenant à la microflore endogène et capable de « coloniser » ou persister au niveau des muqueuses pourrait être très proche du système *S. gordonii*. En théorie, deux types de

lactobacilles pourraient être perçus différemment par le MALT et donc conduire à des réponses différentes ; cependant, cette hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

Jusqu'à présent, un nombre très limité de souches de lactobacilles ont été décrites comme hôte d'expression pour la production d'antigènes modèles. Comme dans le cas de *Lc. lactis*, les études d'immunisation les plus détaillées ont été réalisées avec la TTFC comme antigène modèle.

La TTFC a été produite dans le cytoplasme ou en surface chez *L. casei* 393 et *L. plantarum* 256. Cette dernière espèce semble être un meilleur hôte d'expression en terme de niveau de production de l'antigène, ce qui a déjà été montré avec un autre antigène (Hols et al., 1997). Des plasmides réplicatifs ont été construits portant le gène codant la TTFC sous le contrôle du promoteur  $\alpha$ -amylase (inductible) ou du promoteur *ldh* (constitutif). L'exposition en surface a été réalisée grâce à la protéine PrtP et a conduit à exposer à des niveaux de  $10^3$  à  $10^4$  molécules par cellule (Maassen et al., 1999; Shaw et al., 2000). Dans la série de plasmides décrits par ces auteurs, tous les signaux d'expression et la plupart des séquences du vecteur sont d'origine lactobacillaire.

*L. plantarum* 256 synthétisant la TTFC dans le cytoplasme a permis d'induire des réponses IgG sériques après administrations intra-nasale et intra-gastrique chez la souris. L'immunisation avec *L. plantarum* 256/TTFC s'est révélée plus efficace par voie nasale que par voie intra-gastrique conduisant à des titres en IgG sériques de  $10^4$  et  $10^2$ , respectivement. Le protocole d'immunisation, qui incluait l'administration de  $2-5 \times 10^9$  cellules vivantes pendant 3 jours consécutifs pour la primo-administration et le rappel, a conduit à une réponse IgA dans les lavages broncho-alvéolaires et à la présence de cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de la TTFC dans les ganglions et la rate. Des titres élevés en anticorps anti-TTFC ont également été générés en réponse à un protocole simple dose. Par contre, l'immunisation intra-nasale avec *L. plantarum* 256 exposant la TTFC en surface, n'a induit qu'une faible réponse IgG sérique ; cette souche s'est avérée non immunogène que par voie orale, malgré le fait qu'elle ne produise que seulement 5 à 10 fois moins d'antigène que dans le cytoplasme (Shaw et al., 2000).

Les deux types de système d'expression, constitutif et inductible, ont également été testés chez *L. plantarum* NCIMB 8826. Le promoteur *pnis*, inductible à la nisine, a permis d'établir des courbes dose-réponse et de montrer que le niveau d'antigène produit dans le cytoplasme de la souche *L. plantarum* (pMEC46) gouvernait la réponse immunitaire après administration sous-cutanée chez la souris (Pavan et al., 2000). L'expression du gène codant la TTFC a

également été obtenue sous contrôle du promoteur constitutif, *pldh* (lactate déshydrogénase). La construction pMEC4 (*pldh/ttfc*) a été introduite chez *L. plantarum* NCIMB8826, soit en multicopies sur un plasmide dérivé du pLAB1000, soit en simple copie intégrée dans le chromosome au locus *ldh*. Dans le dernier cas, lors d'un événement de double recombinaison, des excisants portant le gène codant la TTFC comme seule séquence hétérologue ont été isolés. La quantité d'antigène produite par les intégrants et excisants est moins importante que lorsque le gène est présent en copies multiples, mais elle est suffisante pour induire une réponse immunitaire après administrations sous-cutanée et intra-nasale (Chagnaud & al., en préparation).

Deux souches recombinantes, synthétisant des quantités différentes de TTFC ont été comparées par voie nasale ; il s'agit des souches *L. plantarum* (pMEC4) et *L. plantarum* (pMEC46). La seconde produit 5 à 10 fois plus d'antigènes que la première. Les souches recombinantes ont été administrées (en simple dose) 3 fois, à trois semaines d'intervalle. La souche *L. plantarum* (pMEC46) produisant la TTFC à plus de 10% des protéines totales (Pavan et al., 2000) a permis d'induire une réponse immunitaire forte dès le premier rappel (titre final de  $10^5$ ). Des titres similaires ont néanmoins été obtenus en fin de protocole d'immunisation pour la souche *L. plantarum* (pMEC4). Ceci souligne que le taux d'antigène produit dans le cytoplasme correspond à un facteur prépondérant dans l'induction d'une réponse immune. (Shaw et al., 2000; Grangette et al., 2001). Les deux types de souches recombinantes (pMEC4 et pMEC46) ont conduit à des réponses IgA spécifiques dans les lavages broncho-alvéolaires et à l'activation des cellules T spécifiques de l'antigène dans les ganglions cervicaux. Aucune réponse cellulaire spécifique n'a été détectée contre le vecteur lui-même, lors de la re-stimulation *in vitro* avec la souche sauvage (*L. plantarum*) ; ceci est en contraste avec les résultats obtenus pour *L. lactis* (voir plus haut).

Comme dans le cas de *L. lactis*, les titres en anticorps sériques ne diffèrent pas si les souches sont administrées vivantes ou inactivées (mytomycine C ou UV) aux souris. Cependant, dans le cas de *L. plantarum* NCIMB8826, les études de protection menées soit par challenge direct, soit par séroneutralisation, ont montré que les bactéries vivantes induisent une meilleure protection que celles qui sont inactivées (Grangette et al., 2001).

### ***Chapitre III : Bordetella pertussis***

## A. Caractéristiques générales de *Bordetella pertussis* et de la coqueluche

### 1. Le genre *Bordetella*

Le genre *Bordetella* a été créé par Lopez en 1952 (Lopez, 1952). Les bordetelles sont des bactéries pathogènes à Gram négatif. Ce sont de petits cocobacilles aérobies, généralement associés à des infections du tractus respiratoire supérieur de l'homme et de l'animal. Le genre *Bordetella* contient actuellement sept espèces. *Bordetella pertussis* est l'agent responsable de la coqueluche et a été isolé pour la première fois chez un patient en 1906 (Bordet & Gengou, 1906a). Cette bactérie infecte uniquement l'homme avec des manifestations cliniques importantes chez l'enfant (Hewlett, 1995). *Bordetella parapertussis* peut provoquer une forme bénigne de la maladie chez l'homme et elle peut également être isolée chez le mouton (Cullinane et al., 1987). *Bordetella bronchiseptica* est responsable d'infections chez le porc, le chien, le lapin et le cochon d'Inde (Thompson et al., 1976). Cette bactérie peut provoquer une infection opportuniste chez l'individu humain immunocompromis (Hewlett, 1995). Ces trois espèces sont génétiquement proches avec un contenu en G+C de 66 à 70%. *Bordetella avium*, plus distante génétiquement (62% G+C), infecte les oiseaux (Kersters et al., 1984) et n'est, tout comme *Bordetella hinzii*, *Bordetella holmesii* et *Bordetella trematum*, que très rarement associée à des infections chez l'homme (Cookson et al., 1994 ; Weyant et al., 1995 ; Vandamme et al., 1996). Cependant, récemment *B. holmesii* a été isolée de patients présentant des symptômes coquelucheux (Mazengia et al., 2000).

### 2. Manifestations cliniques de la coqueluche chez l'homme

La coqueluche est une maladie très contagieuse transmise d'un individu à l'autre par aérosol (Cherry et al., 1988). Elle peut frapper des personnes de tous âges, mais elle est particulièrement grave chez les nourrissons. L'expression clinique des symptômes de l'infection est très variable du fait de l'immunité du sujet vis-à-vis de *B. pertussis* ; ainsi plusieurs formes cliniques peuvent être décrites.

#### 2.1. Forme clinique de l'enfant non vacciné

Après exposition d'un individu sensible, la période d'incubation s'étend sur 5 à 7 jours avant apparition de symptômes. La maladie se caractérise par plusieurs phases (Preston, 1988) :

- la *phase catarrhale* correspond à des symptômes non spécifiques, similaires à ceux d'un rhume, durant 7 jours. Pendant cette période, l'individu est hautement contagieux.

- la *phase paroxystique* est marquée par une production abondante de mucus, et des quintes de toux spasmodiques pouvant provoquer des vomissements et se terminer par une inspiration profonde, sonore et sifflante : le « chant du coq ». Il existe d'autres signes caractéristiques (leucocytose, lymphocytose, perte de poids, hypoglycémie occasionnelle) de cette phase qui dure de 1 à 4 semaines. Des complications peuvent survenir et s'avérer fatales dans les cas les plus graves comprenant des infections bactériennes secondaires (pneumonie ou otite) et plus rarement des encéphalopathies (Hewlett, 1995).

- la *phase de convalescence* peut s'étendre sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Les quintes de toux persistent, mais deviennent progressivement moins intenses et plus espacées. Suite à la maladie, l'immunité vis-à-vis de la coqueluche est très forte, mais elle diminue avec le temps.

## **2.2. Forme clinique du nourrisson non vacciné**

Les anticorps anti-coquelucheux maternels passent la barrière placentaire, mais ne confèrent aucune protection. Avant 6 mois, les nourrissons non immuns sont particulièrement vulnérables et manifestent l'infection par une toux quinteuse prolongée et cyanosante (Cherry, et al., 1988). Les quintes sont dites atypiques par le fait que le « chant du coq » peut manquer à cet âge, mais elles restent caractéristiques par leur caractère spasmodique et sévère. Elles peuvent être responsables d'accès hypoxiques prolongés, d'apnées ou de bradycardies profondes. Les vomissements peuvent compromettre l'alimentation et entraîner une déshydratation ou une dénutrition surtout rencontrées dans les pays en développement.

## **2.3. Forme clinique de l'enfant et de l'adulte immuns**

Ces sujets ont acquis une immunité anti-coquelucheuse, le plus souvent par la vaccination ou à la suite de la maladie. Ils développent des formes moins sévères du fait d'une immunité protectrice résiduelle. Le « chant du coq » manque souvent et les symptômes se réduisent à une toux plus ou moins quinteuse, souvent prolongée au-delà de 8 jours (Cherry, 1996). Cette

forme clinique passe souvent inaperçue et contribue à la dissémination de l'infection et, par conséquence, à la contamination des très jeunes nourrissons qui développent les coqueluches les plus graves (Deville et al., 1995).

### **3. Diagnostic et traitements**

Les méthodes de diagnostics utilisées sont différentes selon l'âge et l'état immun du patient (culture et PCR recommandées pour les nourrissons et les personnes non vaccinées, sérologie recommandée pour les personnes vaccinées).

Le traitement à base d'antibiotiques aide à réduire la durée de la maladie et à prévenir la dissémination des bactéries à d'autres individus. Plusieurs antibiotiques permettent l'élimination du microorganisme du tractus respiratoire : érythromycine, tétracycline, chloramphénicol. L'érythromycine, en particulier l'estolate, est un traitement de choix du fait de sa capacité à atteindre le sérum et les voies respiratoires en grande quantité (Hoppe, 1992). Le traitement antibiotique est recommandé pour prévenir la maladie chez les individus en contact avec les patients coquelucheux (Halperin et al., 1999).

### **4. Epidémiologie**

La coqueluche est une maladie d'importance mondiale. Elle est responsable de 50 millions de cas et cause 350000 morts par an dans le monde (WHO, 1999), principalement parmi les individus non vaccinés dans les pays en voie de développement. Dans la plupart des pays, la maladie évolue selon un mode endémique avec des cycles périodiques survenant tous les 3 à 5 ans. L'incidence de la maladie est la plus basse dans les pays qui ont généralisé la vaccination, sans interruption depuis quarante ans (France, Etats-Unis, Hongrie, Pologne, ex-Allemagne de l'Est...). A l'inverse, dans les pays où les programmes de vaccination ont été arrêtés (Suède), momentanément interrompus (Royaume-Uni) ou insuffisamment développés avec des couvertures vaccinales inférieures à 50% (Russie, Italie, Allemagne, Australie...), l'incidence de la coqueluche est de 10 à 100 fois plus élevée, témoignant indirectement de l'efficacité des programmes de vaccination.

Une nouvelle situation épidémiologique est apparue dans les pays comme la France et les Etats-Unis où les enfants sont correctement vaccinés au cours de la première année, avec un rappel au cours de la seconde. En effet, les taux de couverture vaccinale en France sont très élevés : ils étaient de 96% pour la primo-vaccination et de 87% pour le rappel entre 16 et 18

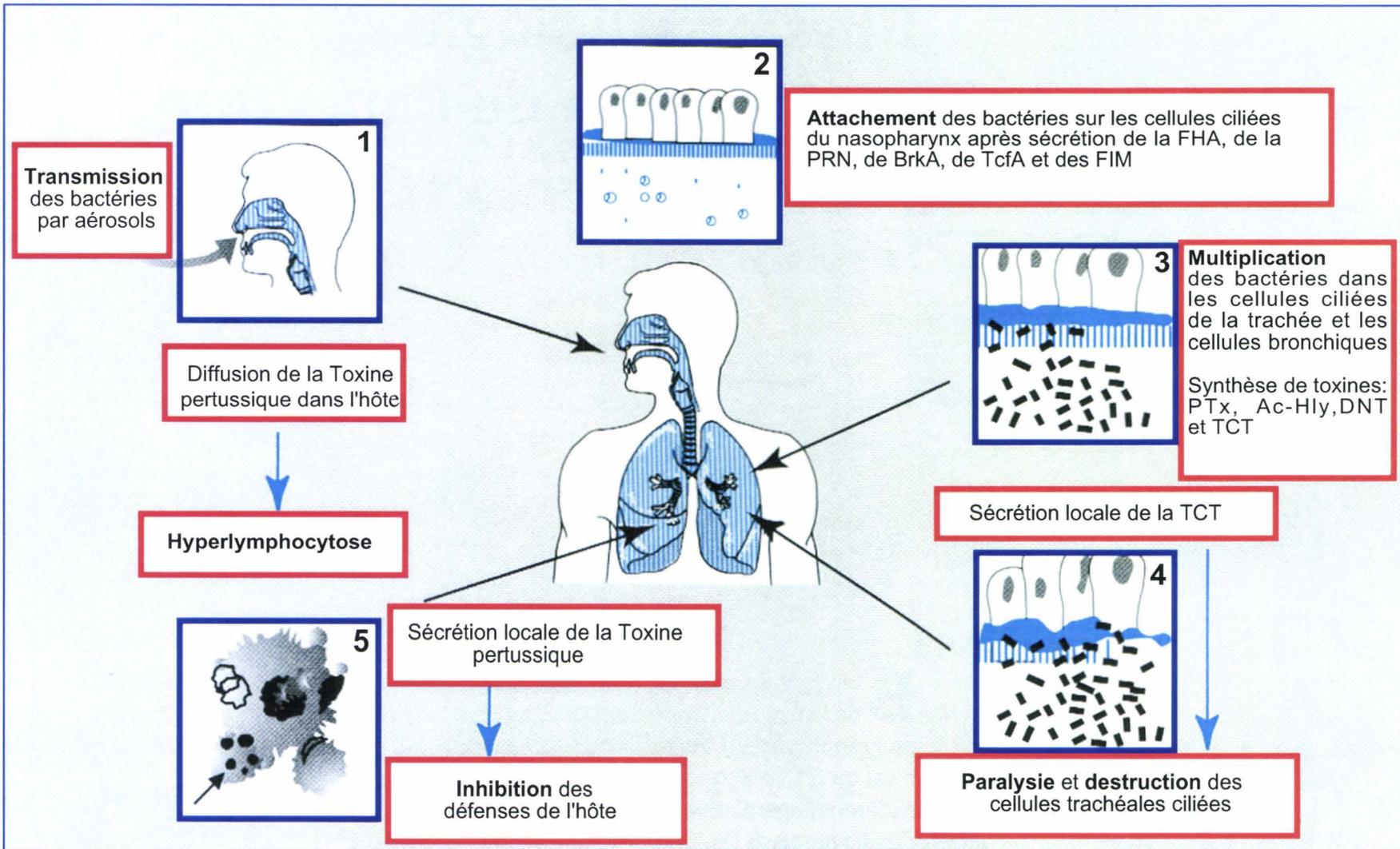
mois en 1995. Toutefois, la perte de l'immunité vaccinale est assez rapide (à partir de 12 ans en France), notamment du fait de la raréfaction des rappels naturels au cours de la circulation de *B. pertussis* (Begue, 1993). Par conséquent un très grand nombre d'adolescents et d'adultes anciennement vaccinés ne sont plus immunisés et développent des coqueluches bénignes. Ces sujets risquent de contaminer les nouveau-nés et les nourrissons non encore protégés par la vaccination. C'est la raison pour laquelle, le nouveau calendrier vaccinal 1998 recommande un rappel du vaccin coquelucheux acellulaire (voir ci-dessous) vers l'âge de 11 à 13 ans (Conseil supérieur d'hygiène publique de France. 1998. Calendrier vaccinal 1998. Bull. Epidemiol. Hebd. 15 : 61-62).

## 5. Les vaccins

Les vaccins contre la coqueluche sont disponibles dans les pays développés depuis plus de 50 ans et ont permis de réduire significativement les taux de mortalité et de morbidité. Deux types de vaccins ont été développés et utilisés à travers le monde.

- le *vaccin à germes entiers* est constitué d'une suspension de *B. pertussis* inactivée par la chaleur et le formaldéhyde est adsorbé sur hydroxyde d'aluminium. Introduit en 1959 en France, il a ensuite (1966) été associé à d'autres antigènes vaccinaux, les anatoxines diphtérique et tétanique, ainsi que le vaccin inactivé contre la poliomyélite pour donner le DCT-Polio ou Tétracoq. En 1997, ce vaccin tétravalent a été associé au vaccin conjugué contre *Haemophilus influenzae* type b (Hib) pour obtenir le Pentacoq (Gold et al., 1994). Dès les années 70, l'attention s'est tournée vers les réactions indésirables localisées (rougeurs, douleurs locales) et systémiques (fièvre, irritabilité) associées aux vaccins anti-coquelucheux à germes entiers (Pollock et al., 1984). La crainte d'éventuels effets indésirables graves (ex : encéphalopathie) a conduit certains pays comme la Suède, le Japon et la Grande-Bretagne à abandonner la vaccination ou développer de nouveaux vaccins.

- les *vaccins acellulaires* sont fabriqués à partir d'antigènes purifiés de *B. pertussis*. Les progrès dans la compréhension de la pathogénie de la coqueluche ont permis d'isoler les principaux composants de *B. pertussis* (voir section B). Brièvement, la bactérie est capable d'adhérer aux cellules de l'épithélium respiratoire bronchique grâce aux adhésines, les fimbriae (Fim), la pertactine (Prn) et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA). Une fois fixée, la bactérie libère des toxines telles que la toxine pertussique (PT), l'adénylate cyclase-



**Figure 19.** Schéma des différentes étapes de l'infection par *B. pertussis* (d'après Guiso, 1999). Suite à leur entrée dans l'hôte (1), les bactéries se fixent sur les cellules ciliées du nasopharynx après sécrétion de plusieurs facteurs de virulence (2). La phase de multiplication s'accompagne de la paralysie et de la destruction des cellules trachéales ciliées (4) puis à l'inhibition des défenses de l'hôte (5).

hémolysine (Ac-Hly), la toxine cytotrachéale (TCT) et la toxine dermonécrotique (DNT) (Locht, 1999). Actuellement, 15 vaccins acellulaires sont commercialement disponibles et contiennent tous la PT détoxifiée associée à un ou plusieurs autres composants (presque toujours la FHA) (Plotkin & Cadoz, 1997). Comme les vaccins à germes entiers, les vaccins anti-coquelucheux acellulaires sont habituellement administrés en association avec d'autres agents déjà cités plus haut. L'efficacité des vaccins acellulaires combinés est d'environ 85% et ils induisent incontestablement une meilleure tolérance comparée à celle des vaccins cellulaires (Decker et al., 1995 ; Edwards, 1993 ; Gustafsson et al., 1996).

## **B. Pathogénicité de *B. pertussis***

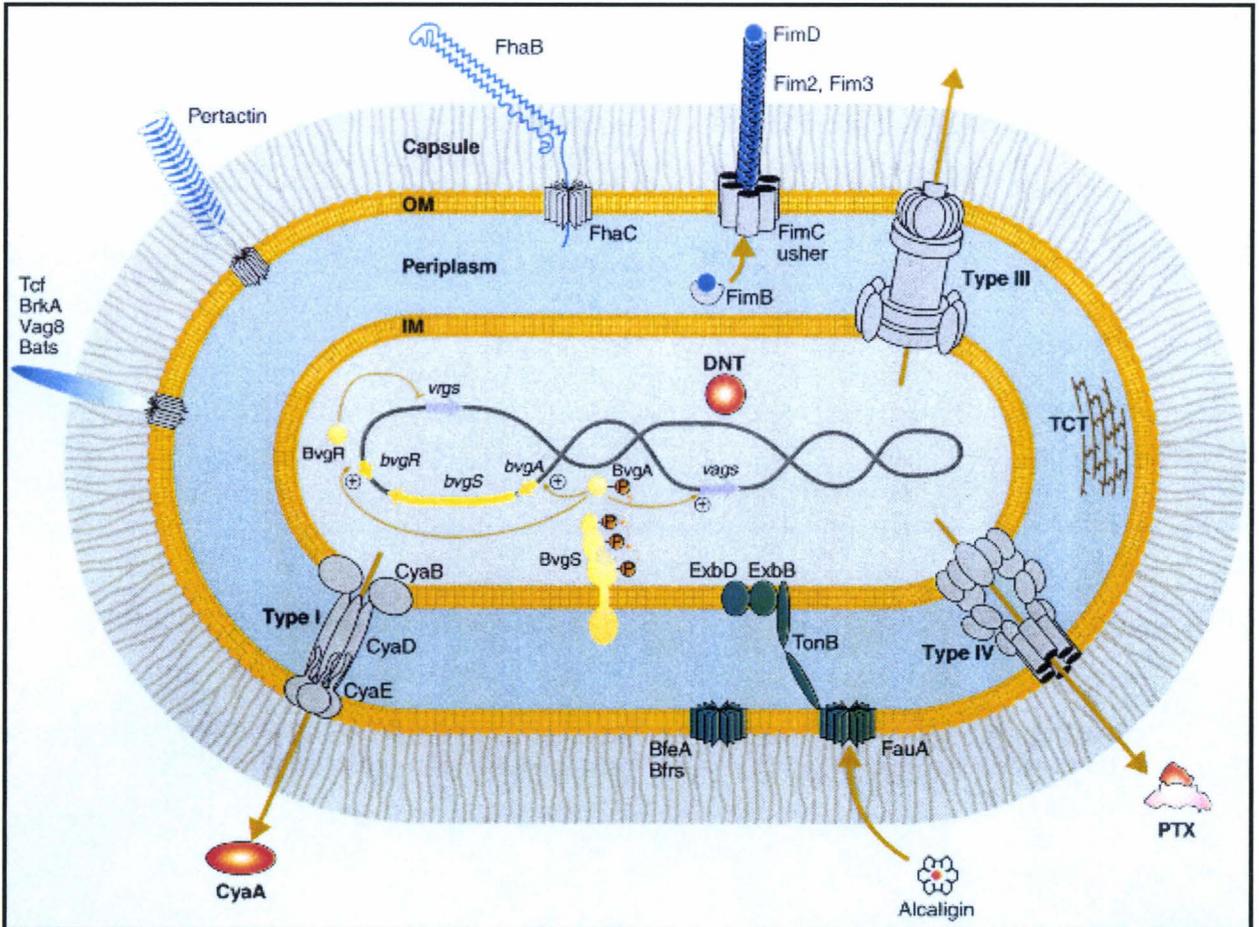
### **1. Infection**

Le cycle infectieux de *B. pertussis* obéit au schéma classique d'infection par une bactérie pathogène : (1) entrée dans l'organisme hôte, (2) colonisation d'une niche écologique, par attachement et multiplication au sein de l'hôte, (3) échappement aux défenses immunitaires de l'hôte, (4) sortie et infection d'un nouvel hôte. Le cycle infectieux de *B. pertussis* chez l'homme est illustré sur la figure 19.

Dès leur entrée dans l'appareil respiratoire, les bactéries synthétisent et sécrètent des adhésines (Fim, FHA, Prn), qui leur permettent de s'attacher fermement aux cellules épithéliales. L'adhésion des bactéries facilite leur prolifération et évite leur élimination par les battements des cils à la surface de l'épithélium. Au cours de la multiplication, les bactéries libèrent plusieurs toxines qui détruisent l'épithélium cilié. Cette phase s'accompagne localement d'une accumulation de mucus par paralysie du système d'épuration ciliaire et d'une réaction inflammatoire. Les effets systémiques se limitent à une hyperlymphocytose du fait de la diffusion de la PT dans l'hôte.

### **2. Facteurs de virulence**

*B. pertussis* synthétise et sécrète une variété de facteurs de virulence, illustrés en figure 20, au cours des différentes étapes de l'infection, décrites ci-dessus. Les approches moléculaires développées depuis environ une quinzaine d'années ont permis d'étudier les principaux acteurs de la virulence sous trois aspects : (i) relation entre structure et fonction, (ii)



**Figure 20.** Facteurs de virulence de *B. pertussis* (d'après Locht et al., 2001).

Les adhésines sont représentées en bleu dont les fimbriae (Fim), l'hémagglutinine filamenteuse (FhaB), la pertactine, la toxine cytotrachéale (Tcf), le facteur de résistance au sérum (BrkA). Les toxines en rouge dont la toxine pertussique (PTX), l'adénylate cyclase (CyaA), la toxine dermonécrotique (DNT). Les protéines accessoires en gris dont FhaC, FimB, FimC. Les systèmes de régulation BvgA, BvgS et BvgR en sont représentés en beige. IM : membrane interne ; OM : membrane externe.

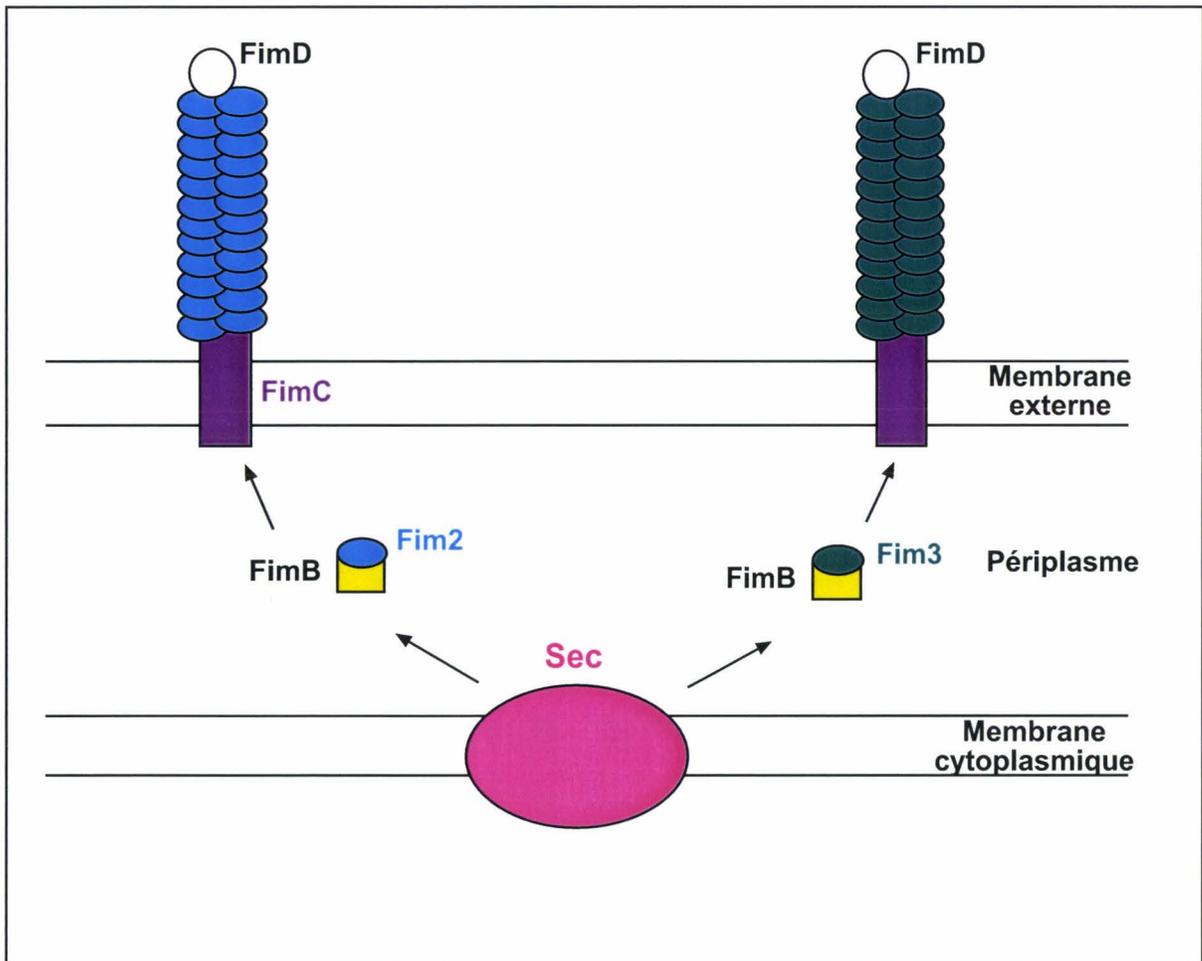
mécanismes de biogenèse et de sécrétion, (iii) régulation génétique de leur production en fonction des signaux de l'environnement. Les facteurs de virulence produits par *B. pertussis* sont principalement divisés en deux grandes catégories : les adhésines et les toxines (Locht, 1999).

## 2.1. Adhésines

Parmi les adhésines produites à la surface de *B. pertussis*, on distingue l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), les fimbriae (Fim), anciennement appelés agglutinogènes, la pertactine (Prn), le facteur de résistance au sérum (BrkA) et le facteur de colonisation trachéale (Tcf). La biogenèse, les activités d'adhérence, la sécrétion et les propriétés immunologiques de la FHA seront développées dans le paragraphe C de ce chapitre.

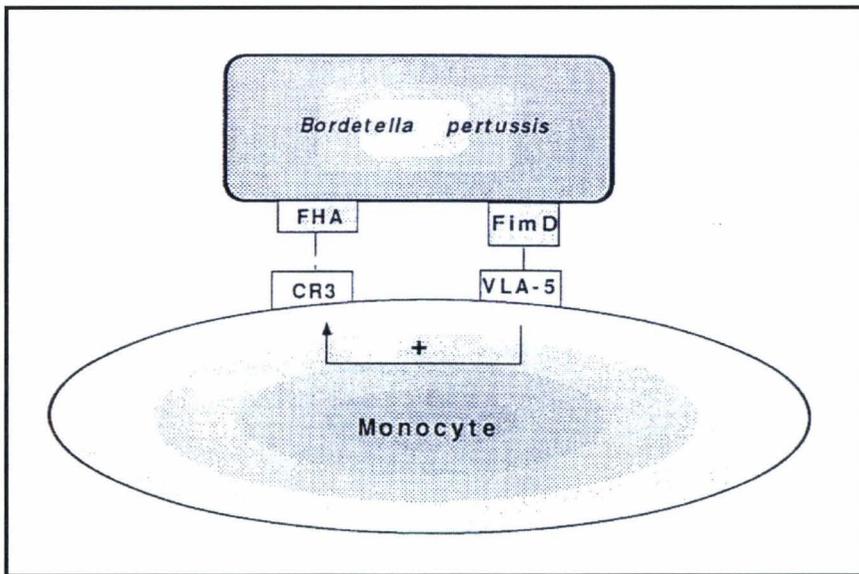
### 2.1.1. Fimbriae

Les fimbriae sont de longs filaments étendus à la surface de la bactérie et impliqués dans ses activités d'adhérence. *B. pertussis* produit des fimbriae de sérotype 2 et/ou 3 composés de sous-unités majeures Fim2 et/ou Fim3, de masse moléculaire de 22,5 et 22 kDa respectivement (Zhang et al., 1985). Ils présentent à leur extrémité une sous-unité mineure, l'adhésine FimD de 40 kDa (Willems et al., 1993). Les fimbriae de *B. pertussis* sont apparentés aux pili de type 1 chez d'autres bactéries à Gram négatif. Le mécanisme d'export et la structure des fimbriae sont illustrés sur la figure 21. L'assemblage des sous-unités fait appel à une chaperone périplasmique, FimB, et à un « placeur » dans la membrane externe, FimC (Locht et al., 1992). Les gènes *fim2* et *fim3* sont dispersés sur le chromosome alors que *fimB*, *fimC* et *fimD* sont regroupés en un opéron (Willems et al., 1992). Cet opéron *fim* est localisé entre les gènes *fhaB* et *fhaC*, qui codent la FHA et la protéine de membrane FhaC impliquée dans l'export de FHA (voir section C).



**Figure 21.** Biosynthèse et structure des fimbriae chez *B. pertussis* (d'après Mooi, 1994). Les sous-unités des fimbriae, Fim2 (en bleu) et Fim3 (en vert) possèdent un peptide signal et traversent la membrane cytoplasmique via la machinerie Sec. Elles s'associent ensuite à un chaperon périplasmique FimB (en jaune) qui prévient une association prématurée des sous-unités. Le placeur FimC (en mauve) est situé dans la membrane externe et est responsable de l'ancrage des sous-unités dans la membrane externe. FimD, la sous-unité mineure des fimbriae, se trouve à l'extrémité distale des fimbriae. Elle exerce des fonctions d'adhésine.

*In vitro*, la sous-unité FimD se fixe sur l'intégrine VLA-5 localisée sur les macrophages. et les sous-unités de chaque fimbriae se fixent sur les sucres sulphatés rencontrés à la surface des cellules épithéliales du tractus respiratoire (Geuijen et al., 1996 ; Geuijen et al., 1998). L'attachement à l'intégrine VLA-5 faciliterait la fixation d'une autre adhésine, la FHA, aux macrophages alvéolaires. En effet, la reconnaissance de VLA-5 active l'intégrine CR3 (« Complement Receptor type 3 »,  $\alpha_M\beta_2$  CD11b/CD18) du macrophage sur laquelle se fixe la FHA (Figure 22) (Hazenbos et al., 1995).



**Figure 22.** Schéma du mécanisme de l'adhérence de *B. pertussis* aux macrophages (d'après Hazenbos et al., 1995). Dans un premier temps, FimD reconnaît VLA-5. Cette interaction active le CR3 du macrophage. *B. pertussis* se fixe alors via FHA au CR3 renforçant l'adhésion de la bactérie au macrophage.

Les propriétés d'adhésion des fimbriae concernent également d'autres types de cellules que les macrophages. Une étude récente montre que les fimbriae sont capables d'adhérer, *in vitro*, aux cellules épithéliales du larynx de l'homme (van den Berg et al., 1999).

*In vivo*, chez la souris, l'étude de mutants de *B. pertussis* dépourvus de fimbriae montre que FimD joue un rôle important dans la colonisation des voies respiratoires (Geuijen et al.,

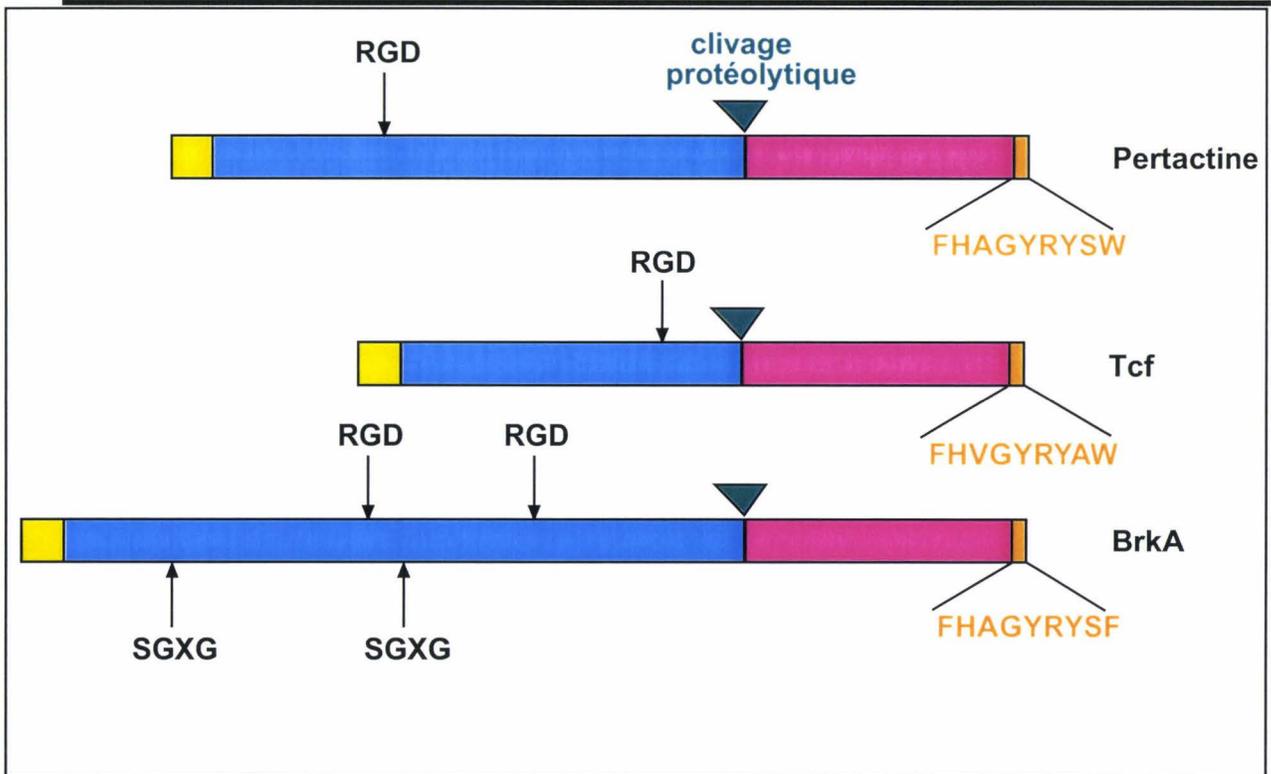
1997). Chez l'enfant, il a été observé que la présence d'anticorps anti-fimbriae était corrélée à la protection contre une infection par *B. pertussis* (Thomas et al., 1989).

Ces différentes observations sont à la base de l'incorporation des fimbriae dans certains vaccins acellulaires.

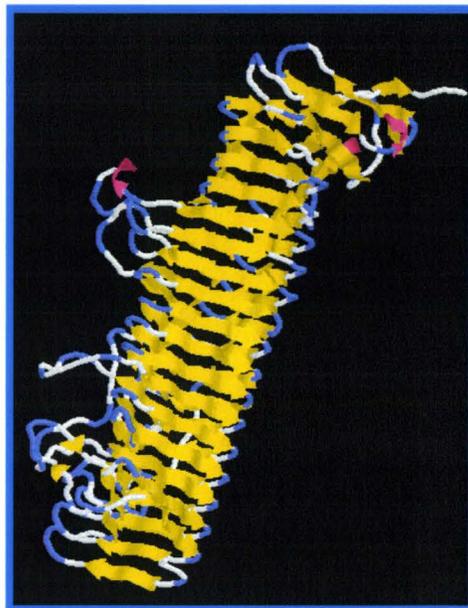
### 2.1.2. Pertactine

La pertactine (Prn), une protéine de la membrane externe de *B. pertussis*, est aussi appelée P.69 en raison de la taille apparente de la molécule mature après analyse par électrophorèse (Charles et al., 1989). Son gène de structure, *prn*, code une protéine d'environ 94 kDa exportée d'abord vers le périplasme par un mécanisme classique dépendant d'un peptide signal. Elle est alors transportée à travers la membrane externe à l'aide de sa portion C-terminale et subit ensuite un clivage protéolytique pour donner la pertactine mature de 69 kDa (Makoff et al., 1990). La portion C-terminale d'environ 30 kDa du précurseur reste associée à la membrane externe (Figure 23). Elle est homologue aux domaines C-terminaux des précurseurs de plusieurs protéines sécrétées dont l'IgA protéase de *Neisseria gonorrhoeae* (Holland, 1998) et SepA de *Shigella flexneri* (Benjelloun-Touimi et al., 1995). Ces domaines C-terminaux forment dans la membrane externe un tonneau- $\beta$  permettant la sécrétion de la partie N-terminale des précurseurs, selon un mécanisme d'autosécrétion (Charles et al., 1994). La structure cristalline de la pertactine mature (Figure 24) montre qu'elle est constituée d'un monomère d'hélices- $\beta$  et de boucles latérales porteuses de son activité d'adhésine (Emsley et al., 1996). Des études *in vitro* ont montré que la pertactine participe, via son motif RGD (Arg-Gly-Asp), à l'adhérence de *B. pertussis* aux cellules de l'hôte (Leininger et al., 1991). La pertactine présente deux régions immunodominantes constituées de séquences répétées. La première, (GGXXP)<sub>5</sub>, est localisée directement après la séquence RGD. La seconde, (PQP)<sub>5</sub>, est située dans la partie C-terminale de la pertactine et constitue l'épitope immunoprotecteur majeur de la protéine (Leininger, et al., 1991). Ces derniers motifs répétés sont présents en nombre différent selon l'espèce de *Bordetella* (Li et al., 1992 ; Boursaux-Eude & Guiso, 2000).

La pertactine confère une immunité protectrice dans les modèles murins (Shahin et al., 1990). En raison de son rôle dans l'adhérence bactérienne, de son absence de toxicité et de sa purification aisée, elle fait maintenant partie de certains vaccins acellulaires (Gustafsson, et al., 1996).



**Figure 23.** Comparaison des structures de la pertactine, BrkA et Tcf de *B. pertussis* (d'après Lambert *et al.*, 1999). Les parties jaunes représentent les peptides signaux, les rectangles bleus les protéines matures, les rectangles roses les régions C-terminales conservées et les oranges les signaux de localisation dans la membrane externe. Les sites de clivage protéolytique, les motifs de liaison aux intégrines (RGD) et les motifs de liaison aux glycosaminoglycanes (SGXG), sont indiqués par des flèches.



**Figure 24.** Structure tridimensionnelle de la pertactine de *B. pertussis* (d'après Emsley *et al.*, 1996). La protéine se replie en hélice bêta. Les motifs d'adhérence de la pertactine sont situés dans des boucles latérales.

### 2.1.3. Facteur de résistance au sérum

Le locus *brk* (« *Bordetella* resistance to killing ») est constitué de deux gènes qui sont transcrits en sens inverse (Fernandez & Weiss, 1994). Ces gènes codent les protéines BrkA et BrkB, responsables de l'inhibition de l'activité bactéricide du complément (Fernandez & Weiss, 1998 ; Barnes & Weiss, 2001).

BrkA dérive d'un précurseur de 103 kDa muni d'un peptide signal. Ce précurseur comprend un site de clivage protéolytique, donnant lieu à deux produits, l'un de 73 kDa et l'autre de 30 kDa. Le fragment de 30 kDa est localisé dans la membrane externe et permet la sécrétion de BrkA (Shannon & Fernandez, 1999). La structure du précurseur et le mécanisme de sécrétion ressemblent donc fortement à ceux de la pertactine (Figure 23). La protéine BrkA présente plusieurs caractéristiques indiquant son rôle possible dans l'adhérence aux cellules eucaryotes. Elle possède deux motifs RGD et deux sites de liaison potentiels aux glycosaminoglycanes sulfatés (Figure 23).

BrkB ne possède pas de séquence signal et serait une protéine de membrane cytoplasmique peut-être impliquée dans la sécrétion de BrkA ou dans le mécanisme direct de défense à l'attaque du complément (Fernandez & Weiss, 1994).

### 2.1.4. Facteur de colonisation trachéale

Le facteur de colonisation trachéale (Tcf) codé par *tcfA* est impliqué dans la colonisation de la trachée (Finn & Stevens, 1995). Cette protéine est exclusivement produite par *B. pertussis*. Sa séquence montre des régions riches en résidus proline, et, comme la FHA, la pertactine et BrkA, une séquence RGD (Figure 23). Le Tcf existe sous deux formes : un précurseur associé aux cellules bactériennes et une forme sécrétée plus courte. Son domaine C-terminal est homologue à ceux de la pertactine et de BrkA, ce qui suggère qu'il est autosécrété.

## 2.2. Toxines

*B. pertussis* produit plusieurs toxines qui participent à la pathogenèse mais aussi à l'acquisition d'une immunité protectrice contre la maladie (Locht & Antoine, 1999). Les trois toxines majeures de *B. pertussis*, la toxine pertussique (PT), l'adénylate cyclase-hémolysine (Ac-Hly), la toxine dermonécrotique (DNT), sont de nature protéique. Il existe deux autres toxines, non protéiques, le lipopolysaccharide (LPS), aussi appelé endotoxine, et la toxine

cytotrachéale (TCT). Cette dernière est un fragment du peptidoglycane relargué par *B. pertussis*.

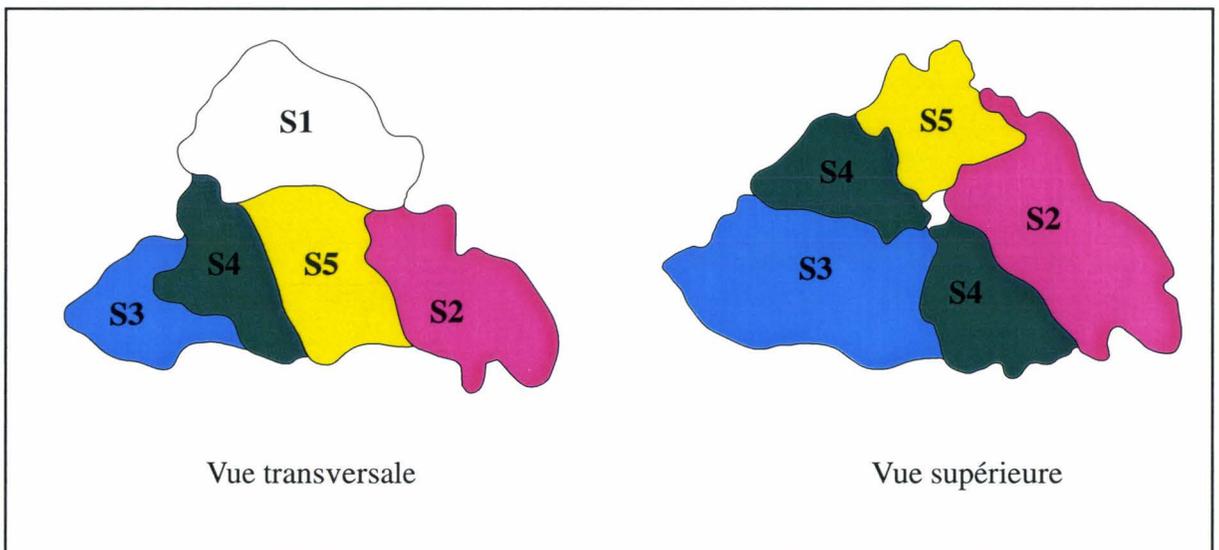
### 2.2.1. Toxine pertussique

#### *Structure protéique*

La toxine pertussique (PT) fait partie de la famille des toxines de type A-B qui inclut aussi la toxine cholérique et l'entérotoxine de *E. coli* (Tamura et al., 1982). C'est une protéine hexamérique de 105 kDa constituée de 5 sous-unités différentes, appelées S1 (26 kDa), S2 (22 kDa), S3 (22kDa), S4 (12 kDa) et S5 (11 k Da) (Figure 25). Les sous-unités S2 à S5 forment l'oligomère B, responsable de l'interaction de la toxine avec les cellules cibles. La sous-unité S1 représente le protomère A, responsable de la majorité des effets toxiques par expression de son activité enzymatique.

La structure cristalline de la toxine montre le site actif dans lequel le NAD peut se nicher (Stein et al., 1994). Cette structure indique que la PT adopte une forme de pyramide à base triangulaire, formée de l'oligomère B. La sous-unité S1 se niche au sommet de la pyramide et plonge sa région C-terminale dans l'ouverture centrale de la base. Le triangle de base est formé d'un exemplaire des sous-unités S2, S3 et S5, et de deux sous-unités S4 (Figure 25).

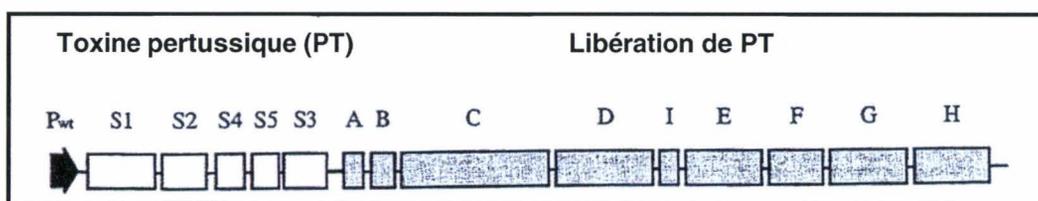
Les différentes sous-unités de la toxine sont exportées individuellement à travers la membrane interne à l'aide de la machinerie Sec. Après le clivage des peptides signaux, les sous-unités sont assemblées dans le périplasma et la toxine est sécrétée à travers la membrane externe par un mode de sécrétion de type IV (Burns, 1999). Cette étape de sécrétion nécessite l'action de neuf protéines auxiliaires (Ptl) qui ressemblent fortement aux protéines nécessaires au transport du plasmide T d'*Agrobacterium tumefaciens* (Weiss et al., 1993). Des études récentes montrent qu'il est nécessaire que l'holotoxine soit assemblée pour être sécrétée par le système Ptl (Farizo et al., 2000).



**Figure 25.** Structure tridimensionnelle de la toxine de *B. pertussis* (d'après Stein *et al.*, 1994). Par souci de clarté, la S1 n'est pas représentée dans la vue supérieure.

*Locus pt*

Les gènes de structure, *ptx*, codant les différentes sous-unités de la toxine (Locht et al., 1986) ainsi que les gènes *ptl* sont groupés en un opéron et co-transcrits au départ du même promoteur qui se trouve en amont du gène codant S1 (Figure 26). L'ensemble des gènes *ptx* et *ptl* sont également présents chez *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*. Cependant, chez ces deux espèces, les gènes ne sont pas exprimés, en raison des différences importantes dans la région promotrice.



**Figure 26.** Schéma de l'opéron *ptx/ptl* (d'après Smith et al., 2001). S1-S5 : gènes codant les sous-unités de la toxine pertussique (PT). A-I : gènes de libération de la PT. *Pwt* : promoteur *ptx/ptl*.

*Fonctions biologiques*

La PT présente à la fois des activités adhésives et toxiques. Son action s'effectue en trois étapes : (i) liaison de la toxine aux récepteurs des cellules cibles via l'oligomère B, (ii) translocation membranaire de la sous-unité S1 dans le cytosol, et (iii) activité ADP-ribosyltransférase par la sous-unité S1 transloquée.

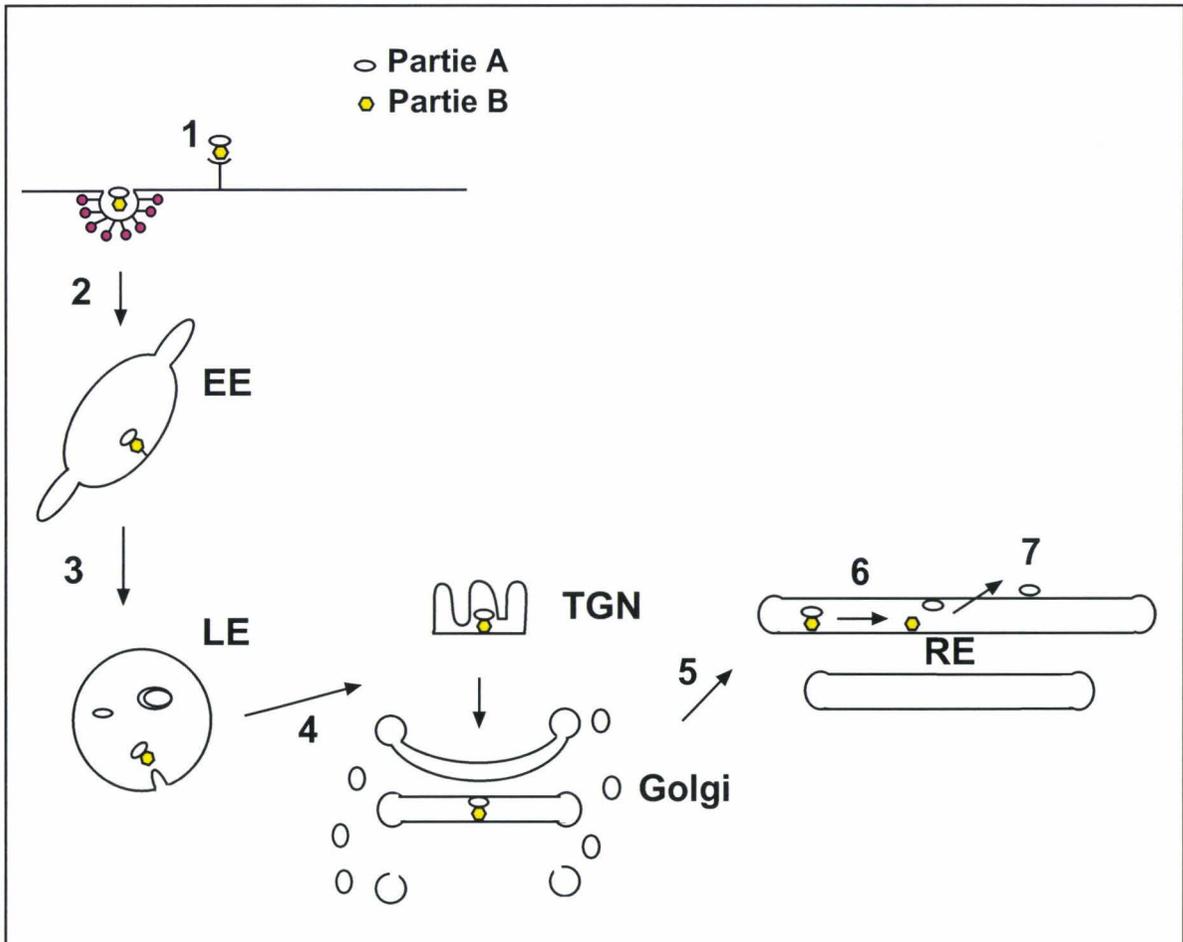
La PT présente de multiples sites de liaisons pouvant permettre l'attachement de la bactérie à différents types de cellules comme les cellules épithéliales ciliées et les macrophages alvéolaires. Les sous-unités S2 et S3, présentant des structures communes aux sélectines

eucaryotes, permettraient à la PT d'activer l'intégrine CR3 des macrophages qui fonctionne comme récepteur de la FHA lors de l'étape d'adhérence. Cependant, ces deux sous-unités se distinguent par leur spécificité d'interaction avec leurs récepteurs (Lobet et al., 1993).

Après fixation sur les récepteurs des cellules cibles, la PT est internalisée par endocytose dans la cellule de l'hôte. Elle effectue alors un transport rétrograde vers le réticulum endoplasmique, puis passe dans le cytosol où la sous-unité S1 exerce son activité enzymatique (Veithen et al., 2000) (Figure 27). L'activité enzymatique de S1 correspond à une activité d'ADP-ribosylation. Elle utilise le NAD comme substrat donneur du groupement ADP-ribose et les protéines Gi, impliquées dans la transduction de signal chez les cellules supérieures, comme accepteurs (Locht & Antoine, 1995). L'ADP-ribosylation des protéines G entraîne leur inactivation et conduit à la perturbation des voies de régulation intracellulaires des cellules de l'hôte. En plus d'un effet paralysant et destructeur des cellules ciliées, elle a un rôle dans l'induction des lésions pulmonaires observées lors de l'infection par *B. pertussis* (Khelef et al., 1994). La variété de types cellulaires touchés et le nombre de systèmes de transmission inhibés expliquent la diversité des activités biologiques de cette toxine : sensibilisation à l'histamine, augmentation de la sécrétion d'insuline provoquant une hypoglycémie, modification de la perméabilité membranaire, lymphocytose sanguine, ou encore inhibition de la migration des macrophages (Munoz, 1985).

### *Antigène vaccinal*

La PT induit la synthèse d'anticorps après infection ou vaccination et confère une immunité protectrice dans les modèles murins (Thomas, et al., 1989). Pour ces raisons, la PT est incluse dans tous les vaccins acellulaires après détoxification chimique ou génétique.



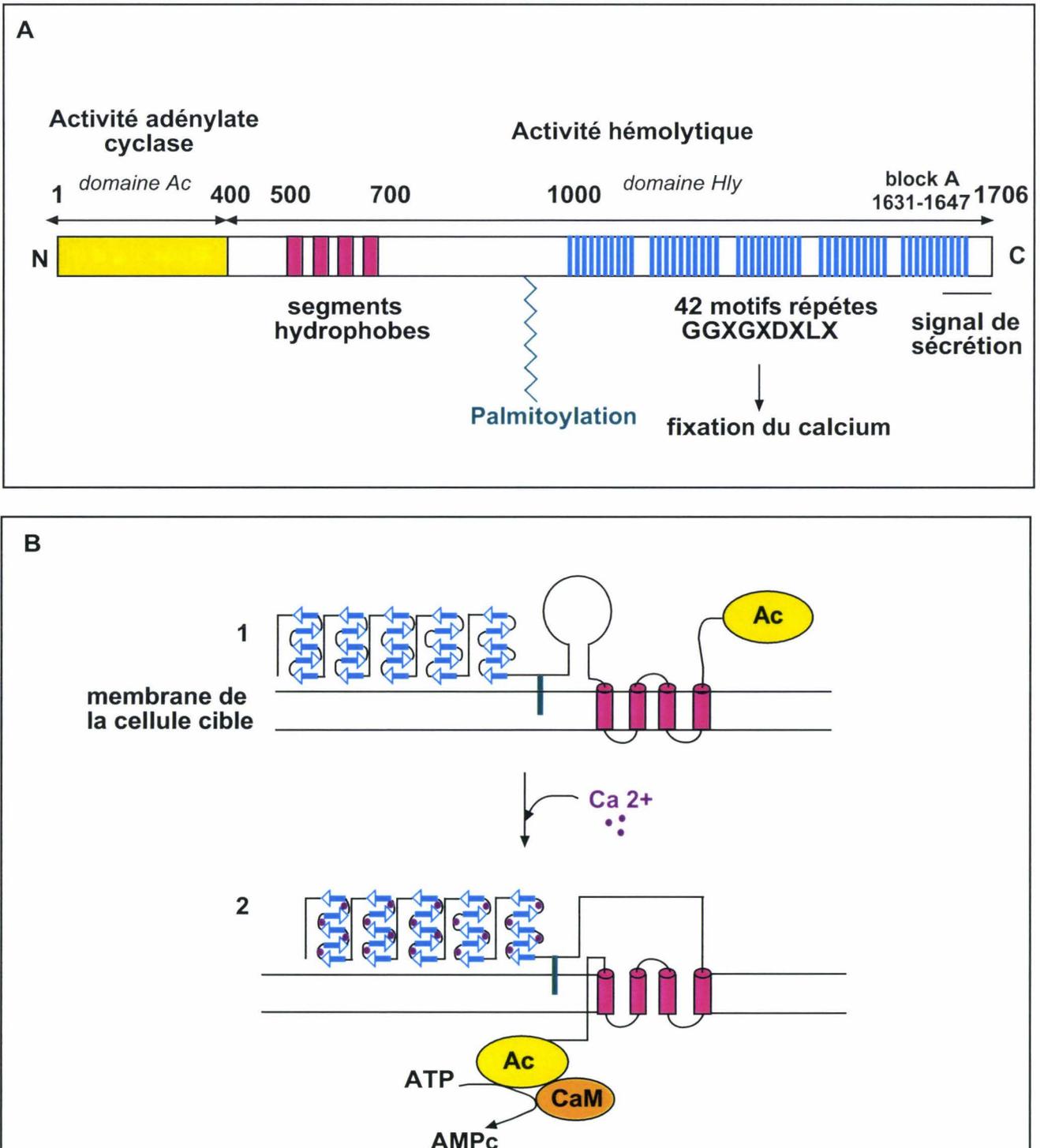
**Figure 27.** Modèle de trafic intracellulaire de la toxine pertussis et de sa translocation membranaire (d'après Locht et al., 2000).

La toxine se fixe sur un récepteur à la surface de la cellule (1) et est internalisée par endocytose du récepteur (2). La toxine est alors transférée dans les endosomes précoces (EE) puis tardifs (LE) (3) et se dirige vers le système trans-Golgien (TGN) (4). La toxine subirait ensuite un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi avant d'arriver dans le réticulum endoplasmique (RE) (5). Dans ce compartiment, les protomères A et B se dissocieraient sous l'effet de l'adénosine triphosphate (6). Le protomère A pourrait alors traverser la membrane par un mécanisme encore mal compris pour rejoindre le cytoplasme.

### 2.2.2. Adénylate cyclase-hémolysine

L'adénylate cyclase-hémolysine (Ac-Hly) de *B. pertussis* est une protéine bifonctionnelle appartenant à la famille RTX (« Repeat in Toxin »), du fait de la présence de motifs répétés GGXGXDXLX dans sa partie C-terminale (pour revue Ladant & Ullmann, 1999). Cette famille inclut également l'hémolysine de *E. coli* et les leucotoxines de plusieurs bactéries à Gram négatif. Les toxines RTX subissent une modification post-traductionnelle (addition d'un acide gras) nécessaire à leur activation (Coote, 1992). Les deux activités, adénylate cyclase et hémolysine, sont essentielles à l'initiation de l'infection (Khelef et al., 1992). L'Ac-Hly est une protéine sécrétée comportant 1706 acides aminés et dont la taille apparente est comprise entre 175 kDa et 220 kDa selon les auteurs (Gentile et al., 1990 ; Leusch et al., 1990 ; Rogel et al., 1989).

L'Ac-Hly est constituée de deux domaines fonctionnellement distincts (Mock & Ullmann, 1993) (Figure 28A). Le premier domaine, appelé domaine catalytique (Ac), correspond aux 400 acides aminés N-terminaux de la protéine et porte l'activité d'adénylate cyclase. Le second est un grand domaine C-terminal portant l'activité d'hémolysine (HlyA) et grâce auquel la toxine s'insère dans la membrane des cellules cibles. Plusieurs régions de ce domaine sont importantes pour sa fixation à la membrane des cellules : une région hydrophobe (Osicka et al., 2000), un résidu palmitoyl et enfin, une région d'une quinzaine d'acides aminés ou « block A » (Bejerano et al., 1999). La fixation de plusieurs molécules de calcium sur les régions répétées du domaine Hly est nécessaire pour provoquer un changement de conformation, ce qui permet le transport du domaine Ac à travers la membrane de la cellule cible (Figure 28B) (Rose et al., 1995). Le domaine Ac est ensuite activé après interaction avec la calmoduline présente dans les cellules eucaryotes (Mock & Ullmann, 1993), ce qui conduit à une synthèse démesurée d'AMP cyclique à l'origine du dérèglement de la physiologie de la cellule eucaryote. L'Ac-Hly est responsable de la mort cellulaire par apoptose des macrophages alvéolaires *in vitro* (Khelef et al., 1993) et *in vivo* (Gueirard et al., 1998).



**Figure 28.** L'adénylate cyclase de *B. pertussis* (d'après Ladant et Ullman, 1999).  
**A.** Organisation génétique de l'Ac-Hly de *B. pertussis*. Les nombres représentent les acides aminés.  
**B.** Schéma hypothétique du mécanisme de translocation de l'adénylate cyclase de *B. pertussis*.  
 A des faibles concentrations en calcium, les domaines hydrophobes (rose) et la chaîne palmitoyle (vert) sont ancrées les premières dans le membrane de la cellule hôte (1). Lorsque le calcium est plus abondant (mauve), il se fixe sur les motifs répétés, ce qui provoque une translocation du domaine Ac (jaune) dans le cytosol et une production d'AMPC suite à la fixation de calmoduline (orange) (2).

L'Ac-Hly est synthétisée sous-forme d'une pro-toxine inactive qui est convertie en protéine active par une modification post-traductionnelle (addition d'un résidu palmitoyl) dépendante du produit d'un gène accessoire *cyaC* (Barry et al., 1991). Elle est ensuite sécrétée grâce à l'intervention de trois protéines accessoires, CyaB, D, et E dont les gènes sont localisés en aval du gène de structure *cya* codant l'Ac-Hly (Glaser et al., 1988). Ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs ABC impliqués dans la machinerie de sécrétion de type I.

L'Ac-Hly induit la synthèse d'anticorps au cours de l'infection ou après vaccination (Grimpel et al., 1996). Elle induit également une immunité protectrice en modèle murin (Betsou et al., 1995). Cette protéine n'a pas encore été incorporée dans un vaccin acellulaire.

L'Ac-Hly a été utilisée comme véhicule pour délivrer des polypeptides dans les cellules eucaryotes. Ainsi, une forme détoxifiée de la toxine portant un épitope CTL est capable d'induire une protection antivirale (Saron et al., 1997) et une immunité antitumorale (Fayolle et al., 1999).

### 2.2.3. Toxine dermonécrotique

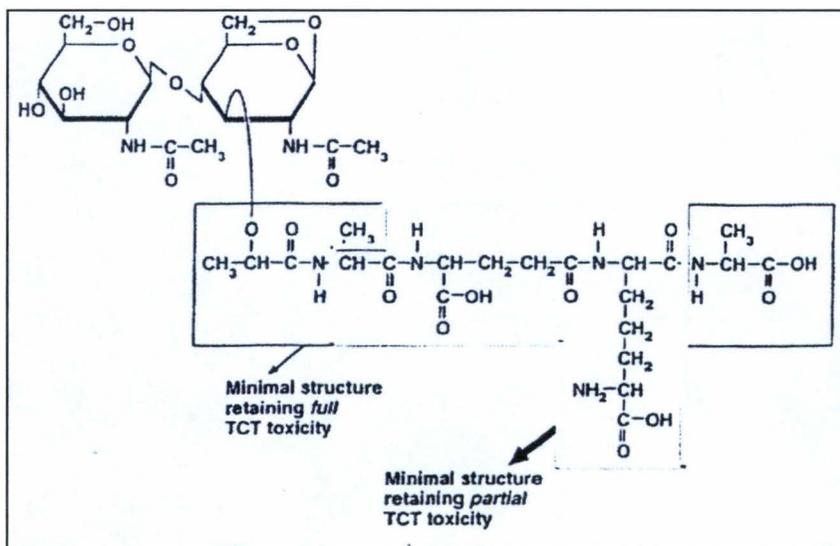
Bien qu'elle soit connue depuis longtemps comme l'endotoxine coquelucheuse (Bordet & Gengou, 1906b), la toxine dermonécrotique (DNT) n'a pas été beaucoup étudiée en tant que déterminant de la virulence chez *B. pertussis*. Elle est qualifiée de toxine thermolabile car elle est inactive à 56°C. Son nom vient du fait qu'elle cause des lésions nécrotiques au niveau de la peau quand elle est injectée par voie sous-cutanée chez la souris (Livey & Wardlaw, 1984). Son injection par voie intraveineuse est létale. Cette toxine de 140 kDa n'est pas sécrétée, mais elle est localisée dans le cytoplasme (Cowell et al., 1979), son activité pourrait donc dépendre de la lyse de la bactérie.

La cible de la DNT est une protéine G (Rho), une GTPase qui contrôle les réarrangements du cytosquelette dans les cellules eucaryotes. La perturbation de l'activité enzymatique de Rho aboutit à la formation de fibres de stress (Schmidt et al., 1999). Le rôle de la DNT dans la pathogenèse de *B. pertussis* est encore inconnu.

### 2.2.4. Cytotoxine trachéale

La cytotoxine trachéale (TCT) est un peptide constitutivement sécrété par la bactérie. C'est un fragment du peptidoglycane de la bactérie, un muramyl peptide (Figure 29), qui agit sur l'épithélium respiratoire en détruisant le mécanisme de clairance ciliaire et en empêchant de façon durable sa réparation (Lucker et al., 1995). La TCT induirait la synthèse d'IL1 qui induirait la synthèse de NO composé particulièrement toxique pour les cellules (Heiss et al., 1993 ; Heiss et al., 1994).

Malgré son rôle central dans la pathogénicité de la maladie, la TCT n'est pas incluse dans les nouveaux vaccins à cause de son manque d'immunogénicité.



**Figure 29.** Structure de la cytotoxine trachéale de *B. pertussis* (d'après Lucker et al., 1995).

### 2.2.5. Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS), présent dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est une endotoxine qui possède des propriétés adjuvantes et immunomodulantes. Chez *B. pertussis*, cette toxine agirait en synergie avec la TCT dans l'induction de la synthèse et de la libération de NO par les cellules trachéales pour l'empoisonnement des cellules (Flak & Goldman, 1999). Elle serait nécessaire pour une colonisation efficace de la muqueuse nasale (Harvill et al., 2000).

Bien que toutes les espèces de *Bordetella* produisent du LPS, sa structure diffère d'une espèce à l'autre (Middendorf & Gross, 1999). Ceci pourrait refléter les différences observées dans l'intensité des activités biologiques de chaque espèce.

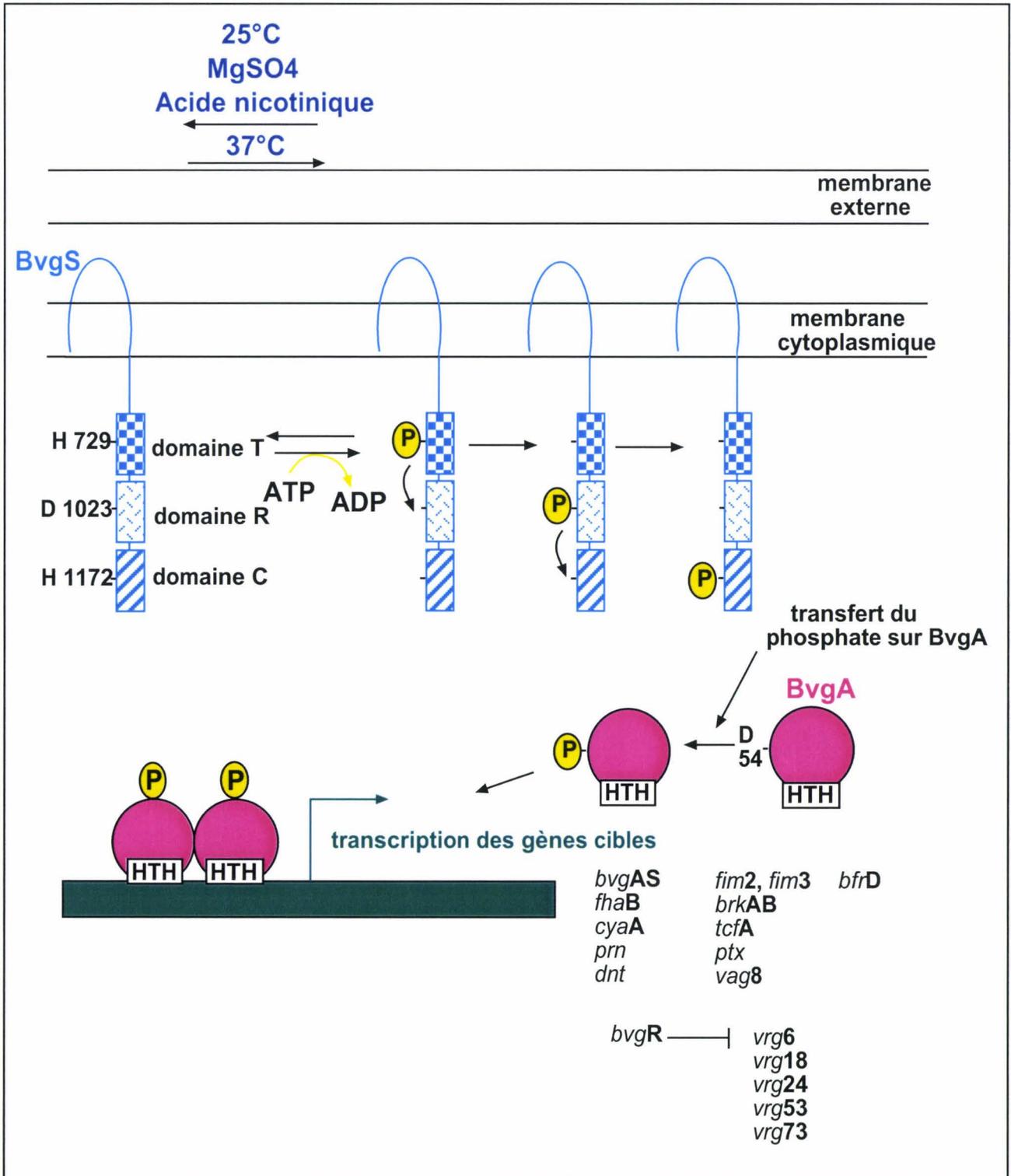
### 3. Régulation de la virulence de *B. pertussis* (pour revue Smith et al., 2000)

La production des facteurs de virulence de *B. pertussis* peut être modulée par des changements dans l'environnement. La régulation coordonnée des facteurs de virulence en réponse à des signaux environnementaux est une stratégie souvent utilisée par les bactéries pathogènes (Mekalanos, 1992). Chez *Bordetella*, les gènes de virulence ne sont pas exprimés dans des conditions de basse température ou en présence de MgSO<sub>4</sub> ou d'acide nicotinique (Lacey, 1960). Ce phénomène, appelé modulation phénotypique, est réversible dès que les bactéries sont incubées à 37°C et que la concentration en MgSO<sub>4</sub> ou en acide nicotinique est abaissée. De plus, une souche virulente de *B. pertussis* peut devenir spontanément avirulente et perdre la production de ses facteurs de virulence (Stibitz et al., 1989). Ce phénomène est irréversible et est appelé « variation de phase ».

Le locus responsable de la modulation phénotypique et de la variation de phase, anciennement appelé *vir* (Weiss & Falkow, 1984), porte le nom de «*Bordetella* virulence gene » ou *bvg*. Le locus *bvg* code deux protéines qui permettent à la bactérie de percevoir les conditions environnementales et d'agir en conséquence en contrôlant l'expression de certains gènes. La protéine capteur est appelée BvgS et l'activateur est appelé BvgA. Ensemble, elles constituent un système de transduction de signal à deux composants (Uhl & Miller, 1995). Ce type de systèmes est utilisé par d'autres organismes procaryotes et a été décrit récemment chez les eucaryotes (Choi & Greenberg, 1991 ; Chang et al., 1993).

BvgA est un régulateur transcriptionnel typique, avec un domaine receveur N-terminal et un motif hélice-coude-hélice C-terminal. Le capteur BvgS est situé dans la membrane cytoplasmique et possède un large domaine périplasmique, connecté par une séquence de liaison à une région cytoplasmique. BvgS se distingue des capteurs d'autres systèmes à deux composants par la structure de sa région cytoplasmique. En effet, en plus du domaine transmetteur classique, celle-ci possède un domaine receveur et un domaine C-terminal qui contient une histidine conservée et un site de liaison à l'ATP (Stibitz & Yang, 1991).

La transduction du signal par le système BvgA/S se fait grâce à une succession de phosphotransferts (Figure 30). BvgS s'autophosphoryle sur l'histidine conservée de son domaine transmetteur. Le groupement phosphate est transféré sur le domaine receveur, puis



**Figure 30.** Modèle de régulation par BvgA/S (d'après Akerley et Miller, 1996). En réponse à un signal environnemental, le senseur BvgS situé dans la membrane cytoplasmique s'autophosphoryle sur l'histidine H 729 de son domaine transmetteur T. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur l'aspartate D 1023 de son domaine receveur R, puis sur l'histidine H 1172 de son domaine C-terminal C et, enfin, sur l'aspartate D 54 du régulateur BvgA. BvgA phosphorylé se fixe alors par l'intermédiaire de son domaine C-terminal comportant un motif hélice-tour-hélice (HTH) sur les promoteurs de ses gènes cibles et induit leur transcription.

sur le domaine C-terminal de BvgS, et enfin sur BvgA (Uhl & Miller, 1994). La protéine BvgA ainsi phosphorylée a une affinité pour les promoteurs des gènes cibles appelés *vags*, pour « virulence activated genes », sur lesquels elle se fixe par son motif hélice-coude-hélice (Boucher et al., 1994). Le signal est amplifié grâce à une autoactivation de la transcription du locus *bvgA/S* par BvgA phosphorylée.

Les gènes cibles de BvgA sont classés en trois groupes (Zu et al., 1996). Le premier groupe comporte les gènes qui sont immédiatement activés après le signal extérieur perçu par la bactérie (10 min). Ces gènes codent les protéines qui sont impliquées dans les étapes précoces de l'infection, c'est-à-dire certaines adhésines comme la FHA par exemple (Scarlatto et al., 1991 ; Boucher et al., 1997). Le second groupe correspond aux gènes transcrits plus tardivement après perception du signal (2-4h), comme le gène *ptx* codant la toxine pertussique. Le troisième groupe est constitué de gènes transcrits de façon intermédiaire, tel que *prn* (pour la pertactine), c'est-à-dire entre 10 min et 2 h après le signal environnemental (Kinnear et al., 1999).

Le système BvgA/S peut également exercer un contrôle négatif sur une série de gènes, appelés *vrgs* (pour « virulence repressed genes »). En phase de virulence, les gènes de virulence sont exprimés grâce à l'activation du système BvgA/S et BvgA active la transcription du gène *bvgR*. Ce dernier code pour la protéine BvgR qui régule négativement l'expression des *vrgs* (Beattie et al., 1993 ; Merkel & Stibitz, 1995). Plusieurs *vrgs* ont été isolés (Beattie, et al., 1993 ; Antoine et al., 2000), mais leur fonction n'est pas toujours connue. Ils pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité, car la persistance de *B. pertussis* dans les poumons et la trachée chez la souris est réduite suite à l'inactivation de l'un d'entre eux, *vrg6* (Beattie et al., 1992). De même, il a été montré chez la souris, qu'un mutant *bvgR*<sup>-</sup> de *B. pertussis* colonisait moins efficacement les poumons que la souche sauvage. Ceci démontre que la régulation par BvgR des gènes *vrgs* contribue à l'infection chez la souris (Merkel et al., 1998).

## C. L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *B. pertussis*

### 1. Activités d'adhésion

L'étape critique de l'infection par *B. pertussis* est son attachement aux cellules de l'hôte. La FHA est considérée comme l'adhésine majeure de *B. pertussis* (Locht et al., 1993). Elle est présente en grande quantité à la surface de la bactérie et est également retrouvée en abondance dans les surnageants de culture. La FHA est produite dès le début de l'infection, facilitant l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire et initiant ainsi le cycle de pathogénicité. Elle peut également servir de pont adhésif pour d'autres microorganismes, ce qui pourrait éventuellement expliquer les sur-infections dans les cas cliniques de coqueluche (Tuomanen, 1986).

La FHA est dotée de diverses activités d'adhérence : (i) attachement aux intégrines des phagocytes, (ii) liaison aux sucres sulfatés à la surface des cellules épithéliales ou dans la matrice extracellulaire, (iii) attachement aux cellules ciliées de l'épithélium respiratoire via son domaine de reconnaissance aux carbohydrates. Ce dernier est médié par un domaine de la FHA possédant une affinité pour les glycolipides (résidus lactosylcéramide), présents sur les cellules ciliées (Tuomanen et al., 1988) et les macrophages (Relman et al., 1990). Cette activité lectinique est portée par un domaine de reconnaissance des sucres ou CRD ("Carbohydrate Recognition Domain") (Prasad et al., 1993). Cette portion de la FHA est un candidat intéressant pour la confection d'un vaccin acellulaire. En effet, des anticorps monoclonaux dirigés contre cette région sont capables d'inhiber la colonisation de l'épithélium cilié par *B. pertussis* (Liu et al., 1997).

L'activité de liaison de la FHA aux sucres sulfatés, peut permettre à *B. pertussis* de se lier à différents types de cellules non ciliées (cellules WiDR, Hela ou Vero) (Sato et al., 1981 ; Urisu et al., 1986). Elle peut également faciliter les interactions avec la matrice extracellulaire (Kjellen & Lindhal, 1991 ; Yanagishita & Hascall, 1992). *In vitro*, la FHA se lie entre autres à l'héparine (Menozzi et al., 1994b) via une région amino-terminale de 400 résidus (Hannah et al., 1994). Cette interaction est d'ailleurs utilisée pour purifier la FHA sur colonne d'héparine-Sépharose (Menozzi et al., 1991).

En plus d'adhérer aux cellules épithéliales, la FHA adhère au récepteur CR3 présent à la surface des macrophages (Relman, et al., 1990). FHA contient un motif RGD en position 1097-1099, qui est présent dans beaucoup d'autres adhésines bactériennes et qui facilite la

liaison aux intégrines eucaryotes. Ce motif permet à la FHA de se lier au complexe LRI/IAP ("Leucocyte-Response-Integrin/Integrin-Associated-Protein"). Ce complexe, impliqué dans la transduction des signaux chez les monocytes, est capable d'activer le CR3 en réponse à différents signaux. *B. pertussis* détourne donc une voie de signalisation propre à la cellule pour augmenter à son avantage sa liaison au CR3 (Ishibashi et al., 1994). La coopérativité FimD/FHA (voir paragraphe B.2.1.1) ainsi que la coopérativité PT/FHA (voir paragraphe B.2.2.1) augmenteraient la fixation de FHA au CR3 (Hazenbos, et al., 1995 ; van't Wout et al., 1992).

La fixation de FHA au CR3 conduit à l'entrée de *B. pertussis* dans les macrophages *in vitro* et *in vivo* par une voie n'engendrant pas de catabolisme oxydatif. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la survie et de la persistance de *B. pertussis* dans les macrophages alvéolaires (Saukkonen et al., 1991 ; Friedman et al., 1992), lui permettant d'échapper ainsi au système immunitaire. Ce réservoir intracellulaire pourrait être à l'origine de l'infection d'autres hôtes. Le motif RGD de la FHA a également un rôle dans la persistance bactérienne dans les poumons (Khelef, et al., 1994) et dans l'invasion des cellules épithéliales bronchiques *in vitro* (Ishibashi et al., 2001).

*B. pertussis* se lie aussi par l'intermédiaire de la FHA au régulateur C4BP ("C4b-Binding Protein") du complément (Khelef, et al., 1994). Comme la fonction de ce régulateur est d'inhiber l'activation de la voie classique du complément, il a été proposé que *B. pertussis* utilise le C4BP pour se protéger contre l'attaque par le complément.

Enfin, des interactions FHA-FHA causent l'auto-agglutination des bordetelles (Menozzi et al., 1994a). Ceci peut servir au recrutement des bordetelles: la FHA sécrétée se fixe sur des cellules épithéliales voisines du site de l'infection et sert de récepteur pour d'autres bordetelles portant la FHA à leur surface. Il s'agirait là encore d'une stratégie pour favoriser l'implantation de la bactérie dans l'hôte.

La FHA a longtemps été considérée comme l'adhésine majeure de *B. pertussis* ; elle est, en effet, importante dans l'initiation de la colonisation des voies respiratoires hautes (Kimura et al., 1990). Cependant, elle fonctionne en collaboration avec d'autres adhésines telles que les fimbriae et la pertactine. Certaines de ces adhésines peuvent même se substituer à la FHA spécialement chez les souches de *B. pertussis* déficientes en FHA.

## 2. Structure et biogénèse

### 2.1. Structure primaire

Le gène codant la FHA, *fhaB*, est localisé derrière les gènes *bvg* et en amont des gènes *fim* (Locht, et al., 1993) (Figure 31A). Le gène structural *fhaB* code une protéine de 367 kDa (Domenighini et al., 1990 ; Delisse-Gathoye et al., 1990). Ce précurseur subit ensuite une maturation protéolytique C-terminale au cours de sa sécrétion (Domenighini, et al., 1990) (Arico et al., 1993) et une maturation N-terminale (Jacob-Dubuisson et al., 1996; Lambert-Buisine et al., 1998) pour donner une protéine de 220 kDa (Figure 31B).

Le précurseur de la FHA se divise en trois grandes parties: une région N-terminale clivée (résidus 1 à 71), une région mature (du résidu 72 au site de maturation C-terminal) et une région C-terminale (du site de maturation C-terminal aux environs du résidu 3590).

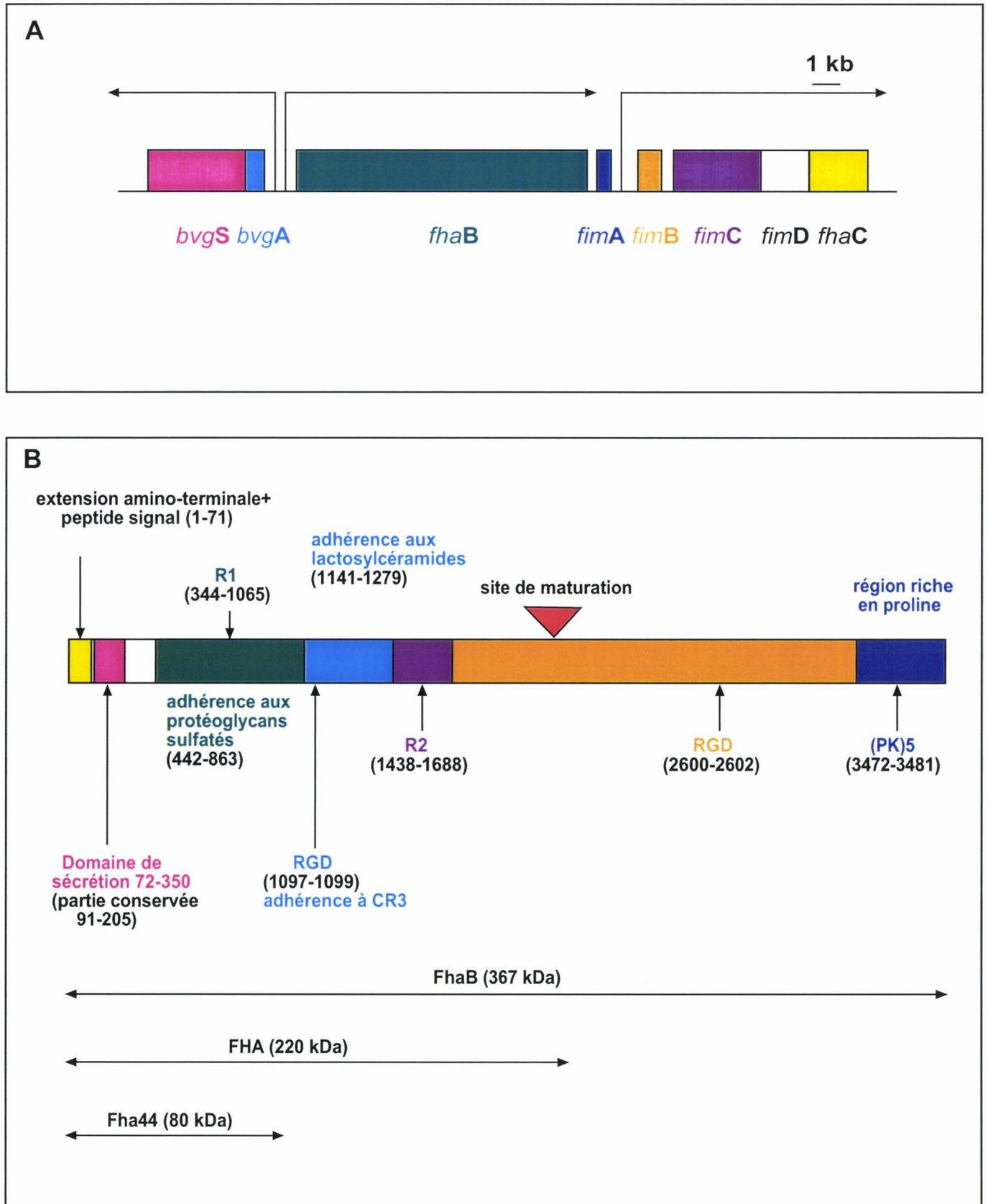
#### *Région N-terminale*

L'analyse de sa séquence primaire montre en N-terminal une région de 71 résidus correspondant à un peptide signal nettement plus long que les peptides signaux classiques (Jacob-Dubuisson, et al., 1996). Cette séquence signal comporte une extension amino-terminale de 22 résidus devant les régions N, H, et C typiques des peptides signaux (Lambert-Buisine, et al., 1998). D'autres protéines, comme par exemple SepA, la protéine extracellulaire majeure de *Shigella flexneri* (Benjelloun-Touimi, et al., 1995) et HMWA d'*Haemophilus influenzae* (Barenkamp & St Geme, 1996) comportent également une extension N-terminale similaire à leur extrémité amino-terminale, dont la fonction reste inconnue.

La région N-terminale contient également le domaine de sécrétion (voir section C.2.3)

#### *Région mature* (Figure 31B)

La portion mature de FhaB comprend la région R1 (Makhov et al., 1994) qui s'étend des résidus 344 à 1065. Elle contient 38 répétitions d'une séquence de 19 résidus. Une seconde région répétée R2 (1438-1688) contient 13 répétitions d'une autre séquence de 19 résidus. En position 1097-99 est présente la séquence RGD grâce à laquelle la FHA se lie aux



**Figure 31. A.** Schéma du locus *bvg/fha/fim*. Les flèches indiquent le sens et le site d'initiation de la transcription des différents gènes. **B.** Représentation schématique de la structure primaire de Fha B et activités d'adhérence R1 et R2 représentent les régions répétées, RGD la séquence arginine-glycine-aspartate, et (PK)5 les répétitions prolines-lysine.

macrophages. Enfin, le site de maturation C-terminal se situe environ 1000 résidus en aval du motif RGD.

### *Région C-terminale*

La région C-terminale de FhaB située au-delà du site de clivage du précurseur possède également un motif RGD en position 2600-02. L'extrémité C-terminale de FhaB contient aussi une région riche en prolines. Le rôle exact de la région C-terminale du précurseur n'est pas encore clairement défini. Elle s'avère nécessaire pour la sécrétion efficace de la portion mature (Renauld-Mongenie et al., 1996a).

## **2.2. Structure tertiaire**

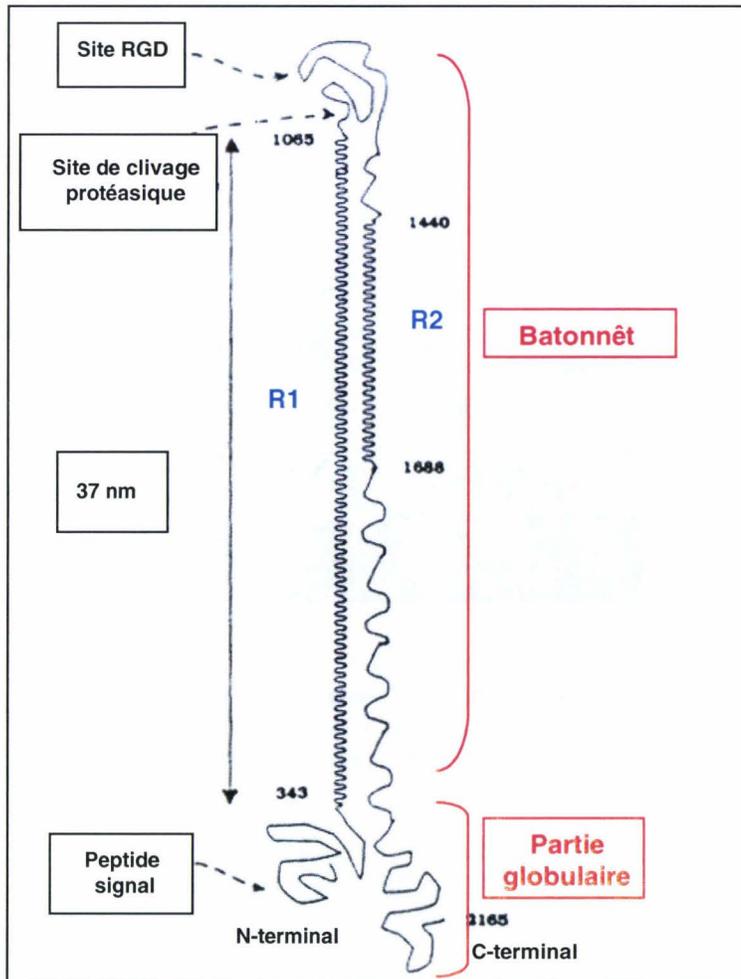
Sur base de mesures de dichroïsme circulaire, de microscopie électronique à haute résolution et d'analyses de sa séquence primaire, un modèle de la structure de la FHA a été établi (Makhov, et al., 1994). Il présente la FHA comme une molécule filamenteuse monomérique de 50 nm repliée en épingle à cheveux et large de 4 nm (Figure 32). Elle serait constituée d'une partie globulaire où se trouvent les extrémités N- et C-terminales, d'un corps en bâtonnet constitué des régions R1 et R2 repliées en feuillet  $\beta$  amphipatiques, et d'une tête portant le motif RGD.

## **2.3. Sécrétion**

### *Maturation N- et C-terminales de la FhaB*

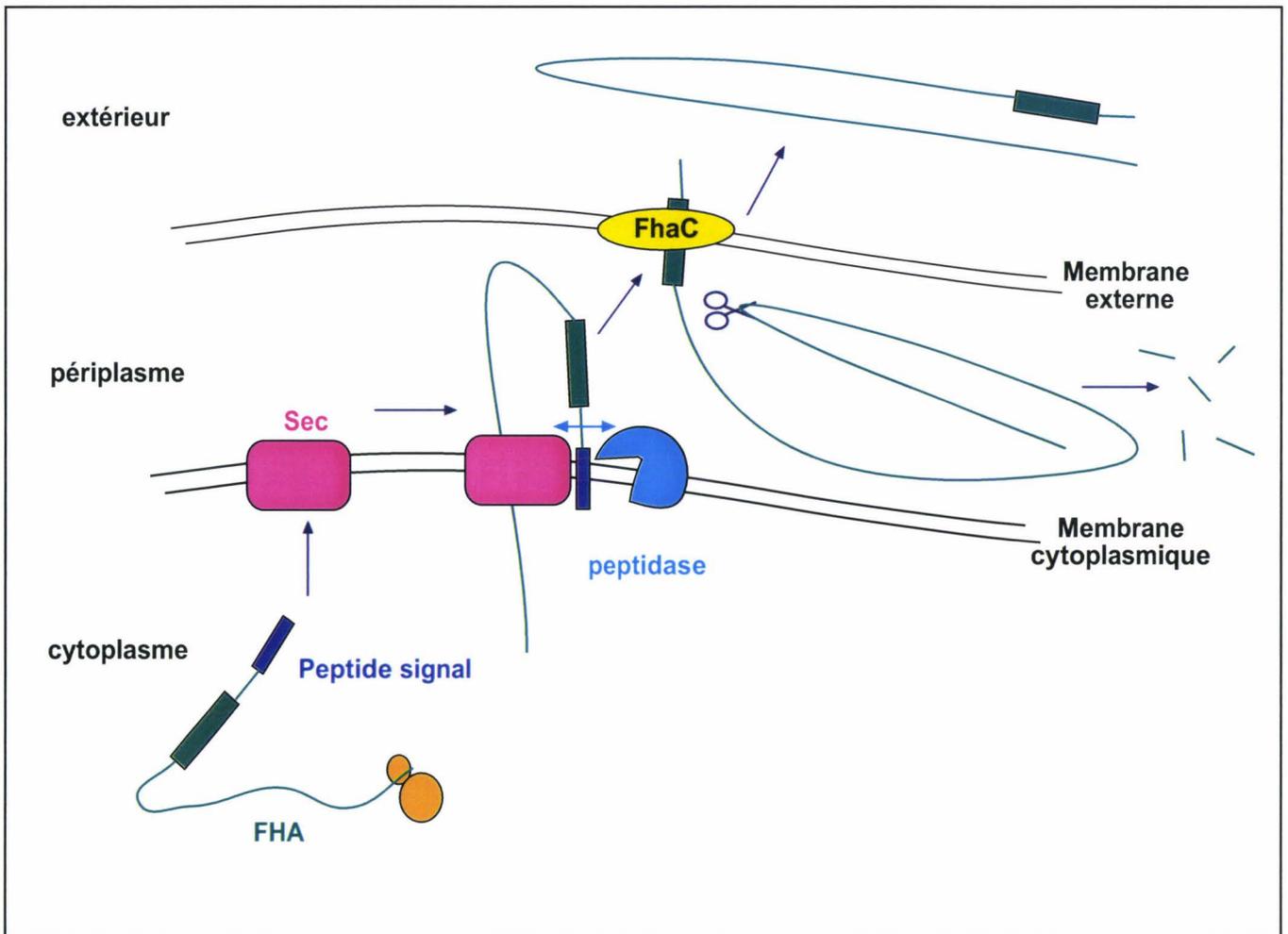
La préprotéine FHA est synthétisée dans le cytoplasme avec un peptide signal original (Lambert-Buisine, et al., 1998 ; Jacob-Dubuisson, et al., 1996). La présence de cette séquence signal suggère que la FHA traverse la membrane cytoplasmique par la machinerie Sec (Figure 33).

Le domaine C-terminal de la FHA est également clivé au cours de la sécrétion et joue un rôle important dans le passage de la FHA à travers l'enveloppe (Renauld-Mongenie, et al., 1996a). Cependant, il n'est pas requis pour la sécrétion de fragments N-terminaux tronqués de la FHA (Renauld-Mongenie, et al., 1996a). Le rôle exact du domaine C-terminal dans le processus de sécrétion de la FHA est en cours d'étude. L'hypothèse actuelle est que cette région jouerait le



**Figure 32.** Modèle de la structure tertiaire de la FHA (d'après Makhov et al., 1994).

Les régions R1 et R2 contiennent des répétitions imparfaites de séquences de 19 résidus. Le motif RGD est impliqué dans la liaison au CR3 des macrophages.



**Figure 33.** Modèle de sécrétion de la FHA de *B. pertussis* (d'après Jacob-Dubuisson et al., 1996). La FHA est synthétisée sous forme d'un précurseur dans le cytoplasme. La protéine traverse la membrane cytoplasmique où son peptide signal (bleu foncé) est clivé par une peptidase signal (bleu clair) ce qui suggère qu'elle traverse la membrane cytoplasmique via la machinerie Sec (rase). La FHA traverse ensuite la membrane externe via une protéine auxiliaire spécifique, FhaC (jaune). Il est probable que la FHA interagisse avec la FhaC par l'intermédiaire de son domaine de sécrétion (rectangle vert).

La protéine est ensuite relarguée à l'extérieur de la bactérie. Une maturation carboxy-terminale s'effectue au cours de la sécrétion. Le rôle exact du domaine C-terminal et du précurseur sont méconnus.

rôle de chaperon intramoléculaire pour la FHA au cours de sa sécrétion. Une protéase responsable de la maturation carboxy-terminale de la FHA, a récemment été identifiée et appelée SphB1 ("Serine protease homologous of *B. pertussis*") (Coutte et al., 2001). Cette protéase est associée à la membrane externe.

#### *Le domaine de sécrétion de la FHA*

La région N-terminale de la FHA, contenant le domaine de sécrétion, est homologue à un domaine trouvé chez d'autres adhésines ou chez plusieurs hémolysines de bactéries pathogènes à Gram négatif. Un domaine de 120 résidus est essentiel pour la translocation de FHA à travers la membrane externe. Il contient des motifs très conservés, AN(P/S)NL et NPNGI, dans lesquels les asparagines joueraient un rôle important pour l'export de FHA (Jacob-Dubuisson et al., 1997). La sécrétion de FHA requiert une protéine accessoire, FhaC, localisée dans la membrane externe (Willems et al., 1994 ; Jacob-Dubuisson, et al., 1996).

#### *FhaC*

Cette protéine de 62 kDa forme un canal (Jacob-Dubuisson et al., 1999) permettant à la FHA de traverser la membrane externe certainement sous forme étendue (Guedin et al., 1998). Les interactions, via le domaine de sécrétion de FHA, entre le précurseur de la FHA et FhaC sont hautement spécifiques. FhaC est homologue à des protéines accessoires impliquées dans la sécrétion d'hémolysines et adhésines d'autres microorganismes qui utilisent un système de sécrétion à deux partenaires (TPS, « Two-Partner Secretion ») (Jacob-Dubuisson et al., 2001). Le gène *fhaC* codant FhaC appartient à l'opéron polycistronique contenant les gènes *fim*. Comme *fhaB*, cet opéron est régulé positivement par le système BvgA/S. Un couplage traductionnel de *fimC*, *fimD* et *fhaC* permettrait de co-réguler la production de FHA à celles des fimbriae (Willems, et al., 1994).

### **3. Propriétés immunologiques**

En plus de ses multiples capacités d'adhésion, la FHA est un excellent immunogène qui est associé à la toxine pertussique (voire aussi à d'autres antigènes) dans plusieurs vaccins acellulaires anti-coquelucheux (Greco et al., 1996).

La FHA est à l'origine de réponses immunitaires muqueuses et systémiques fortes et de longue durée lors d'une infection naturelle par *B. pertussis* ou lors d'une infection expérimentale chez la souris (Thomas, et al., 1989). Plusieurs études ont montré qu'une administration intra-nasale de la FHA purifiée induit chez la souris une importante production d'IgG et d'IgA anti-FHA dans les poumons et une protection lors d'une épreuve ultérieure d'infection intra-nasale par *B. pertussis* (Shahin et al., 1992 ; Roberts et al., 1993 ; Cahill et al., 1993 ; Shahin et al., 1995). La possibilité d'une vaccination orale a également été testée chez la souris : l'administration de liposomes recouverts de FHA, d'une souche de *S. typhimurium* atténuée exprimant la FHA, ou d'une souche d'*E. coli* invasive exprimant la FHA, suscite la production dans les poumons d'IgG et d'IgA anti-FHA (Guzman et al., 1993). De plus, il a été montré que l'administration orale de FHA et de PT encapsulées dans des microparticules biodégradables confère un haut niveau de protection contre une épreuve d'infection par *B. pertussis* (Conway et al., 2001).

Par ailleurs, plusieurs équipes se sont intéressées à la localisation des épitopes B et T potentiellement protecteurs sur la FHA. Elles ont mis en évidence un domaine immunodominant dans la région C-terminale de la FHA mature, reconnue par les cellules B murines (Delisse-Gathoye, et al., 1990 ; Leininger et al., 1997 ; Piatti, 1999) et par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains (Di Tommaso et al., 1991).

La FHA possède également des propriétés adjuvantes. En effet, l'administration intra-nasale de liposomes dans lesquels sont incorporés la FHA ainsi qu'un antigène de *Schistosoma mansoni*, induit une réponse immunitaire contre l'antigène parasitaire dont l'intensité croît en fonction de la dose de FHA incorporée (Poulain-Godefroy et al., 1998).

Enfin, la FHA purifiée stimule la libération d'IL10 et d'IL6 et à plus faible taux, de TNF $\alpha$ . Elle supprime la sécrétion d'IL12 médiée par l'IL10 dans les macrophages murins J774 (McGuirk & Mills, 2000). Ces observations suggèrent que la FHA pourrait faciliter la persistance de *B. pertussis* dans le tractus respiratoire en retardant le développement de l'immunité à médiation cellulaire. Abramson et al adhèrent à cette hypothèse et suggèrent de plus que la FHA pourrait interférer dans les réponses immunitaires en favorisant l'apoptose de certaines cellules immunitaires (Abramson et al., 2001).

Les nombreuses propriétés immunologiques de la FHA, décrites ci-dessus, ainsi que sa capacité à être exportée efficacement chez *B. pertussis* peuvent être exploitées pour développer des systèmes de présentation d'antigènes hétérologues au système immunitaire muqueux (voir section D).

## D. Utilisation de *B. pertussis* comme vecteur vivant de vaccination

*B. pertussis* est un excellent colonisateur du tractus respiratoire de l'homme et induit une forte réponse protectrice après infection naturelle chez l'homme. Bien que la colonisation soit moins efficace chez la souris, cette dernière peut être utilisée comme modèle d'étude des mécanismes de l'immunité vis-à-vis de *B. pertussis*. En effet, il existe une corrélation entre la protection contre une épreuve intra-nasale chez la souris et l'efficacité du vaccin chez l'enfant (Mills et al., 1998). La colonisation efficace des voies respiratoires par *B. pertussis* dépend de la production des différentes adhésines et toxines citées plus haut. Ainsi, l'administration intra-nasale d'une dose unique de  $5 \times 10^6$  UFC permet à la bactérie de persister pendant 4 semaines dans les poumons de souris (Renauld-Mongenie et al., 1996b).

L'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur recombinant vivant pour délivrer des antigènes hétérologues au niveau des muqueuses, est basée sur l'exploitation des propriétés de la FHA : (i) production en grande quantité à la surface de la bactérie ou dans le milieu extracellulaire, (ii) adhésion à trois types de cellules différents (cellules épithéliales ciliées et non ciliées, macrophages alvéolaires), (iii) immunogénicité (réponse humorale systémique et muqueuse de longue durée), (iii) adjuvantité. La FHA a été utilisée pour exposer à la surface de la bactérie ou pour sécréter dans le milieu extracellulaire des antigènes bactériens (Coppens et al., 2001) ou parasite (Renauld-Mongenie, et al., 1996b). Ainsi, l'incorporation du gène codant la Sm28GST de *S. mansoni* dans le chromosome, au sein du gène *phaB* permet à la bactérie d'exposer une quantité significative de l'antigène parasite à sa surface. Par contre, la chimère FHA-Sm28GST n'est détectée qu'en très faibles quantités dans le surnageant de culture (Renauld-Mongenie, et al., 1996b). Ce faible niveau de sécrétion est relié aux propriétés intrinsèques de sécrétion de Sm28GST, généralement difficile à sécréter dans les systèmes d'expression hétérologue (Renauld-Mongenie, et al., 1996b ; Kremer et al., 1995).

Après une administration unique ( $5 \times 10^6$  UFC) intra-nasale, la souche recombinante produisant la chimère FHA-Sm28GST colonise le tractus respiratoire des souris de façon similaire à la souche sauvage. Ceci implique que les fonctions biologiques de la FHA ne sont pas altérées. Cette administration unique induit la production d'IgG et d'IgA anti-Sm28GST dans les liquides broncho-alvéolaires, alors qu'aucune réponse sérique n'est détectée (Renauld-Mongenie, et al., 1996b). Cependant des taux élevés d'anticorps sériques anti-Sm28GST sont obtenus après un rappel intra-nasal avec l'antigène purifié (Mielcarek et al.,

1997). Ceci suggère que l'administration de *B. pertussis* en dose unique permet d'induire une mémoire systémique contre Sm28GST. De plus, l'utilisation de ce même protocole (souche recombinante + antigène purifié) permet d'obtenir des taux de protection faibles mais significatifs contre une infestation d'épreuve par *S. mansoni* traduits par une réduction du nombre de vers et de la charge en œufs. Une faible augmentation des cytokines inflammatoires locales est observée dans les lavages broncho-alvéolaires, après administration intra-nasale de la souche recombinante de *B. pertussis*. Les cytokines telles que TNF $\alpha$ , IL6 et TGF $\beta$  sont transitoirement produites dans les poumons et disparaissent après une semaine, alors que la persistance des bactéries s'étend sur un mois. Deux semaines après l'inoculation, une sécrétion d'IL10 est détectée au niveau pulmonaire pouvant expliquer l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires (Remoue et al., 1997).

L'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur vivant de vaccination chez l'homme ne peut être réalisée qu'après atténuation de sa virulence. Les premières tentatives d'atténuation génétique de *B. pertussis* consistaient en l'inactivation du gène *aroA*, impliqué dans la biosynthèse des acides aminés. Bien que la délétion de *aroA* résulte en une forte atténuation, la souche mutante perd sa capacité à coloniser les poumons de souris, même si les bactéries produisent toujours les facteurs de virulence importants comme la PT et la FHA (Roberts et al., 1990). Le mutant *aroA* est très peu immunogène, mais il est capable d'amorcer la réponse chez la souris contre une exposition à la souche sauvage.

Une seconde stratégie d'atténuation est maintenant développée du fait de la connaissance grandissante des aspects moléculaires de la pathogénicité de *B. pertussis* (Locht, 1999 ; Locht, 2000). Cette stratégie est basée sur la délétion de gènes codant les facteurs de virulence, et n'entraînant pas de modification de la colonisation et de l'immunogénicité de la souche. La délétion des gènes codant la PT, facteur de virulence majeur de *B. pertussis* (voir Locht & Antoine, 1999), conduit à une forte réduction de l'inflammation pulmonaire (Khelef, et al., 1994) et de la lymphocytose, observée lors d'une infection naturelle par *B. pertussis*. De plus, l'utilisation du mutant déficient dans la production de la PT, dans un modèle rat de la coqueluche, n'entraîne pas l'établissement d'une toux (Parton et al., 1994). Cette souche hautement atténuée est capable de coloniser le tractus respiratoire de la souris, presque aussi efficacement que la souche sauvage. De plus, une administration unique intra-nasale de la souche atténuée protège contre une infection par la souche sauvage. Cette protection est équivalente à celle obtenue par vaccination avec le vaccin pertussique commercialement disponible (Tetracoq) ou par une infection avec la souche sauvage (Mielcarek et al., 1998).

La délétion des gènes codant la PT résulte en une augmentation de l'immunogénicité contre la FHA avec un taux 5 fois plus élevé en IgG sériques anti-FHA. De même, l'administration intra-nasale de  $5 \times 10^6$  UFC de *B. pertussis* atténuée, exposant la chimère FHA-Sm28GST à sa surface, induit la production d'anticorps sériques spécifiques de l'antigène qui ne sont pas détectés après administration de la souche recombinante non atténuée (Mielcarek, et al., 1997). Une protection significative est obtenue contre une infection par *S. mansoni* réduisant de 60% le nombre de vers (Mielcarek, et al., 1998).

Des réponses spécifiques de longue durée contre la FHA peuvent également être obtenues dans le tractus génital de la souris après administration intra-nasale de *B. pertussis* atténuée (Mielcarek et al., 2000). En effet, des IgA et IgG anti-FHA sont détectées dans les tissus génitaux, 28 jours après l'administration et pendant 14 semaines. Cette étude suggère que *B. pertussis* peut être un vecteur prometteur pour induire une réponse humorale contre un antigène de pathogène sexuellement transmissible fusionné à FHA.

***Objectifs du travail***

L'un des axes prioritaires en vaccinologie est actuellement la mise au point de vaccins administrables par voie muqueuse. L'approche muqueuse a l'avantage de permettre d'induire des réponses immunitaires à la fois locales et systémiques. Elle permettrait ainsi d'établir une première ligne de défense contre les infections au niveau des muqueuses qui constituent la porte d'entrée de la plupart des agents pathogènes.

Plusieurs programmes de recherche visent donc à développer des moyens efficaces pour stimuler le système immunitaire associé aux muqueuses. Ils reposent sur différentes stratégies vaccinales incluant l'utilisation d'adjuvants muqueux, de vecteurs synthétiques, de vaccins ADN, de plantes transgéniques ainsi que de virus ou de bactéries recombinants. Face à la diversité des systèmes développés, il est difficile de choisir le vecteur le mieux adapté à une cible donnée, c'est-à-dire à une maladie ou à une muqueuse particulière. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser deux systèmes bactériens différents comme vecteurs de vaccination qui sont : *Bordetella pertussis*, une bactérie pathogène pour laquelle nous disposons d'un mutant atténué, et *Lactobacillus plantarum*, une bactérie non pathogène.

*B. pertussis*, agent étiologique de la coqueluche, est capable de coloniser très efficacement les voies respiratoires de l'homme en permettant une stimulation prolongée du système immunitaire. Chez la souris, *B. pertussis* colonise les poumons pendant environ 4 semaines après administration intra-nasale. La délétion du gène codant la toxine pertussique a conduit à une souche hautement atténuée capable de coloniser les voies respiratoires de la souris et de protéger l'animal contre une épreuve avec la souche sauvage. Cette souche atténuée a été utilisée avec succès pour délivrer des antigènes vaccinaux au niveau de la muqueuse nasale (voir section D, chapitre III de l'exposé bibliographique).

*L. plantarum*, bactérie non pathogène, appartient à la famille des bactéries lactiques. Certaines d'entre elles constituent une composante essentielle et parfois dominante des microflore naturelles des cavités corporelles de l'homme. Elles sont capables d'exercer des effets bénéfiques en santé humaine : (i) maintien de l'équilibre de la flore endogène (ii), limitation de l'invasion des muqueuses par des microorganismes pathogènes, (iii) activité immunomodulatrice. Leur totale innocuité alliée à leur capacité à persister dans les tractus digestif et urogénital les désignent comme candidats de choix pour délivrer des antigènes au niveau des muqueuses. Ainsi, il a été montré qu'il était possible d'induire une réponse spécifique contre un antigène hétérologue grâce à l'administration de bactéries lactiques recombinantes au niveau des muqueuses (voir section C chapitre II de l'exposé bibliographique). Notre choix s'est porté sur la souche *L. plantarum* NCIMB 8826, isolée chez l'homme (salive). Des études pharmaco-cinétiques ont révélé qu'elle était capable de

survivre jusqu'à l'iléon après administration orale chez l'homme. Chez la souris, elle est persiste pendant au moins une semaine dans l'intestin et le vagin. Cette souche a été utilisée avec succès pour la production de protéines hétérologues dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire.

**L'objectif de notre étude est donc d'étudier deux vecteurs vivants aux propriétés différentes en utilisant le même antigène modèle. Cette étude inclut l'évaluation de la flexibilité des systèmes en terme de manipulation génétique et la mesure de la réponse immunitaire (nature et intensité) induite par chacun des vecteurs.**

L'antigène modèle choisi est le fragment C de la toxine tétanique (TTFC). C'est un polypeptide non toxique de 50 kDa, très immunogénique et capable d'induire une réponse potectrice chez la souris. Utilisée dans de nombreux systèmes de vaccination, la TTFC est un bon point de comparaison pour le développement de nouveaux vecteurs.

Notre travail a consisté, dans un premier temps, en la construction de souches recombinantes de *L. plantarum* produisant la TTFC dans trois localisations différentes (cytoplasme, milieu extracellulaire, paroi) et de souches recombinantes de *B. pertussis* sécrétant la TTFC dans le milieu extracellulaire. Dans un second temps, l'immunogénicité de chaque souche recombinante a été évaluée par administration muqueuse chez la souris.

La partie **Résultats** présentée ci-après est divisée en deux chapitres :

*Chapitre I : Production de TTFC dans trois localisations différentes chez  
Lactobacillus plantarum et mesure de l'immunogénicité.*

*Chapitre II : Sécrétion de TTFC par Bordetella pertussis et mesure de  
l'immunogénicité.*

## *Résultats*

**Chapitre I :**

***Production du fragment C de la toxine tétanique dans  
trois localisations différentes chez *Lactobacillus  
plantarum* et mesure de l'immunogénicité.***

## Introduction

La nature non invasive de *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 et sa capacité à résister au passage gastrique nous a amenés à nous interroger sur la présentation optimale de l'antigène modèle dans le cas de ce vecteur. Il a été montré que l'exposition d'antigènes en surface d'une bactérie était avantageuse pour l'induction de réponses anticorps par rapport à l'expression cytoplasmique ou encore périplasmique (Leclerc et al., 1991 ; Haddad et al., 1995 ; O'Donnell, 1997 ; Norton et al., 1996). Les mécanismes de la réponse immunitaire initiés contre un antigène interne ou exposé en surface pourraient être différents. En effet, en principe, l'exposition en surface est particulièrement adéquate pour induire une réponse humorale du fait de la liaison directe des anticorps présents à la surface des cellules B avec l'antigène présenté par la bactérie. De plus, la paroi des bactéries à Gram positif pourrait exercer un effet immunoadjuvant (Pouwels & Leer, 1993). Nous nous sommes donc intéressés à la comparaison de l'immunogénicité de la TTFC ancrée ou produite dans le cytoplasme. De plus, la sécrétion étant une des étapes du processus d'exposition en surface, nous avons inclus la construction d'une souche sécrétant cet antigène. Pour cela, nous avons choisi comme molécule porteuse la protéine M6 de *S. pyogenes* (Fischetti, 1991). C'est l'une des protéines de paroi les mieux caractérisées chez les bactéries lactiques qui a largement été étudiée dans le cadre du développement de vaccins anti-streptocoque du groupe A (Bessen & Fischetti, 1988). Elle est très immunogène et a déjà été produite chez quelques bactéries lactiques et utilisée pour l'ancrage de différentes protéines hétérologues en paroi de *S. gordonii* (Piard et al., 1997 ; Pozzi et al., 1997). L'utilisation de M6 permet, en conservant ou non les séquences de sécrétion et/ou d'ancrage, de comparer l'expression d'un antigène dans les trois localisations à l'aide de constructions ne différant que par la présence ou l'absence de séquences M6.

Nous avons donc construit des souches recombinantes de *L. plantarum* NCIMB8826 productrices de TTFC dans le cytoplasme, dans le milieu extracellulaire ou en surface de la bactérie. Pour cela, plusieurs stratégies moléculaires ont dû être suivies afin de produire des protéines de fusion non dégradées en quantité suffisante pour l'induction d'une réponse immunitaire (voir section A). L'analyse du comportement *in vitro* de trois souches recombinantes sélectionnées nous a ensuite conduits à la mise au point des conditions de préparation de l'inoculum pour les expérimentations animales (voir section B). Enfin, dans une troisième partie (C), nous avons étudié l'effet de la localisation cellulaire de l'antigène sur l'immunogénicité par administrations muqueuses des souches recombinantes chez la souris.

## A. Stratégies moléculaires visant à produire la TTFC dans trois localisations différentes : cytoplasme, milieu extracellulaire et paroi bactérienne.

Ce travail a débuté par la construction d'un plasmide visant à exposer la TTFC en surface de *L. plantarum* grâce à l'utilisation des parties N-terminale (en abrégé, M6<sup>N</sup> ou M6) et C-terminale (en abrégé, M6<sup>C</sup> ou M6') de la protéine M6. L'analyse des profils protéiques obtenus (chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> entière ou tronquée) nous a amenés à intégrer le gène hybride dans le chromosome bactérien, à modifier la fusion génétique codant M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> et à utiliser un vecteur d'expression différent. Les constructions conduisant au niveau d'expression et aux réponses immunitaires les plus élevées après administration sous-cutanée ont été sélectionnées pour immuniser les souris par voies muqueuses (voir sections B et C).

### 1. Matériels et méthodes

#### 1.1. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

La souche *E. coli* X11Blue a été utilisée comme hôte intermédiaire de clonage. Elle est cultivée sur LB à 37°C (Sambrook et al., 1989). La souche *L. plantarum* NCIMB 8826 (Hols et al., 1996) est cultivée sur MRS à 37°C sans agitation. La sélection des bactéries transformées est réalisée en présence de 250 µg/ml d'érythromycine ou 100 µg/ml d'ampicilline pour *E. coli* et 5 µg/ml d'érythromycine pour *L. plantarum*.

Les différents plasmides utilisés dans ce travail sont repris dans le tableau 1.

#### 1.2. Transformation et extraction d'ADN plasmidique

La transformation d'*E. coli* a été réalisée par électroporation et l'ADN plasmidique extrait par la méthode de lyse alcaline (Sambrook, et al., 1989). La transformation de *L. plantarum* est réalisée selon le protocole d'électroporation adapté de Josson et al. (1989). La préparation des cellules électro-compétentes est effectuée par inoculation de 500 ml de milieu MRS avec 10 ml de préculture fraîche et incubation à 37°C jusqu'à une densité optique (DO<sub>600nm</sub>) comprise entre 0,5 et 0,7. La culture est centrifugée pendant 10 min à 3000 × g à température

**Tableau 1** : Plasmides utilisés dans cette étude

Plasmide	Caractéristiques
pMEC4	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'expression portant une fusion génétique codant LDH::TTFC sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .
pMEC69	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'expression portant le gène codant la chimère LDH::M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup> sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .
pMEC123	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'intégration portant le gène codant la chimère LDH::M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup> sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .
pMEC127	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'expression portant le gène codant la TTFC sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .
pMEC131	Dérivé de pMG36e. Vecteur d'expression portant le gène codant la chimère M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup> sous le contrôle du P32. Em <sup>r</sup> .
pMEC132	Dérivé de pMG36e. Vecteur d'expression portant le gène codant la chimère M6 <sup>N</sup> ::TTFC sous le contrôle du P32. Em <sup>r</sup> .
pMEC139	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'expression portant le gène codant la chimère M6 <sup>N</sup> ::TTFC::M6 <sup>C</sup> sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .
pMEC160	Dérivé de pLAB1000. Vecteur d'expression portant le gène codant la chimère M6 <sup>N</sup> ::TTFC sous le contrôle du promoteur <i>ldh</i> . Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .

ambiante et les cellules sont lavées avec du tampon TEN (0,1 M EDTA pH 8; 0,15 M NaCl). Le culot bactérien est alors lavé trois fois à l'eau distillée stérile et resuspendu dans 2,5 ml de PEG 1000 (30% dans de l'eau) à 4°C. Des aliquots de 100µl sont conservés à -80°C. La quantité d'ADN utilisée pour la transformation est comprise entre 0,1 et 1 µg et les conditions d'électroporation sont les suivantes : 1,7 kV, 200 Ohms et 25 µF (électroporteur BIORAD). L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée selon la méthode décrite par Posno et al. (Posno et al., 1991).

### 1.3. Préparations d'extraits protéiques

Dix ml de MRS (+ antibiotique) sont inoculés avec une préculture de façon à obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,2. Un volume correspondant à 10<sup>9</sup> UFC (unités formant colonie) est collecté en début de phase exponentielle de croissance (DO<sub>600nm</sub> comprise entre 1 et 2) par centrifugation à 3000 × g pendant 10 min à 4°C. Le culot et le surnageant sont séparés et traités comme suit :

### 1.3.1. Extraction des protéines associées aux cellules

#### *Lyse alcaline*

Le culot de bactéries est lavé une fois dans du Tris-HCl 10 mM pH 8 et repris dans 1 ml de ce même tampon contenant du lysosyme à 1mg/ml. Après incubation à 37°C pendant 45 min, la suspension est centrifugée à 2500 × g rpm pendant 5 min. Le culot est lavé en Tris-HCl 10 mM pH 8 et repris dans 100 µl de tampon de lyse (SDS 2%, Glycérol 10%, Tris-HCl 375 mM pH 7,5). Dix microlitres (10<sup>8</sup> UFC) de cette solution sont utilisés pour la séparation des protéines par électrophorèse.

#### *Disruption à la presse de French*

Le culot de bactéries est lavé deux fois dans du Tris-HCl 100mM pH 7,5 et repris dans 1 ml de ce même tampon. L'homogénat de bactéries, conservé sur glace, est ensuite soumis à une pression de 800 psi dans une presse de French (Bioritech, Chamarande, France). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Boehringer, Mannheim, Germany) est immédiatement ajouté aux extraits cellulaires. La quantité de protéines totales est déterminée par la technique de Bradford (Bradford, 1976) avec la gamma globuline bovine comme standard. Dix µg d'extrait total de protéines sont utilisés pour la séparation des protéines par électrophorèse.

### 1.3.2. Précipitation des protéines sécrétées dans le surnageant de culture

Le surnageant de culture est mélangé à 1/40 de désoxycholate de sodium 1% (DOC) et incubé pendant 20 min sur glace. Un volume correspondant à 1/16 d'acide trichloroacétique 100% est ajouté et le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. La suspension est centrifugée à 2500 × g pendant 20 min à 4°C. Le culot de protéines est lavé deux fois avec de l'éthanol froid et repris dans 1 ml de Tris-HCL 1 M pH 8. On utilise 10 µl de cette solution pour les dépôts sur gel d'électrophorèse.

### 1.4. Electrophorèse et immunodétection

Les extraits protéiques sont chauffés à 100°C pendant 5 min dans du tampon de Laemmli (Laemmli, 1970) et sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. La détection des protéines d'intérêt est réalisée à l'aide des anticorps suivants :

*Anticorps primaires*

Sérum polyclonal anti-TTFC de chèvre (Innogenetics, Gand, Belgique) dilué au 1/300<sup>ième</sup>

Sérum polyclonal anti-TTFC de lapin (Innogenetics, Gand, Belgique) dilué au 1/1000<sup>ième</sup>

Sérum polyclonal anti-M6 de lapin (fourni par G. Pozzi, Sienne, Italie) dilué au 1/1000<sup>ième</sup>

*Anticorps secondaires*

Anti-chèvre-péroxydase (Dako A/S, Danemark) dilué au 1/250<sup>ième</sup>

Anti-lapin-phosphatase alcaline (Promega, Madison, WI., USA) dilué au 1/7000<sup>ième</sup>

Anti-lapin-péroxydase (Dako A/S, Danemark) dilué au 1/1000<sup>ième</sup>

## 1.5. Analyse par cytométrie en flux

Les bactéries ( $10^8$  UFC) sont récoltées à une  $DO_{600nm}$  de 1-2 par centrifugation pendant 10 min à  $3000 \times g$ . Les culots sont lavés deux fois en PBS/BSA 1% («Bovine Serum Albumin») et repris dans 1 ml du même tampon. La suspension bactérienne est incubée avec un sérum polyclonal anti-TTFC de lapin dilué au 1/100<sup>ième</sup>, pendant 1h à 37°C. Après deux lavages en PBS/BSA 1%, l'incubation est poursuivie avec l'anticorps anti-lapin-FITC (fluorescein isothiocyanate) dilué au 1/100<sup>ième</sup>, pendant 1h à 37°C. La suspension est centrifugée, le culot lavé deux fois en PBS stérile et repris dans 1 ml du même tampon. La suspension est diluée au 1/10<sup>ième</sup> avant analyse au cytomètre (Coulter EPICS ELITE).

## 1.6. Immunisation sous-cutanée

*Préparation de l'inoculum*

Cinquante ml de MRS (+ antibiotique) sont inoculés au 1/20<sup>ième</sup> avec une préculture de nuit. Les bactéries sont récoltées à  $10^{10}$  UFC quand la densité optique de la culture atteint 1,5 à 2. Après centrifugation pendant 10 min à  $3000 \times g$ , les bactéries sont lavées deux fois avec du PBS stérile (pH 7,5) et le culot est repris dans 1 ml de ce tampon.

*Immunisation*

Un volume de 100 $\mu$ l ( $10^9$  UFC) de cette suspension bactérienne est injecté par voie sous-cutanée à des groupes de 5 souris femelles C57 Bl/6 N CrI BR de 8 semaines (Charles River Laboratories, St Aubin-les-Elbeuf, France). Un groupe de souris contrôles reçoit un volume identique de PBS (tampon phosphate pH 7,5). Trois administrations successives sont réalisées

à 15 jours d'intervalle. La quantité de bactéries administrées ainsi que la production de l'antigène sont vérifiées pour chaque suspension à chaque inoculation. Le sang est prélevé 7 jours après chaque administration et la mesure des anticorps anti-TTFC est réalisée par la technique ELISA décrite dans le manuscrit Reveneau et al., section C.

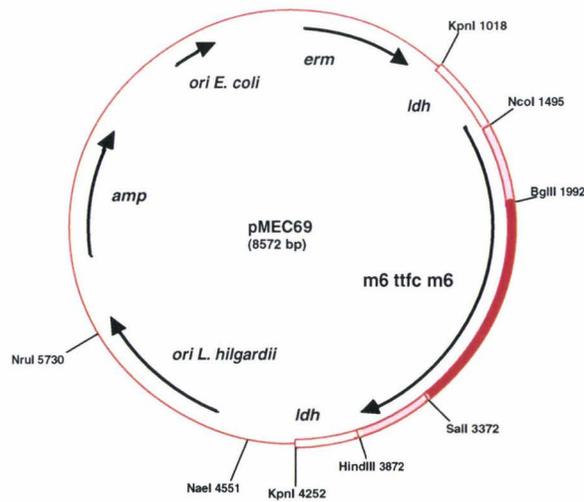
## 2. Résultats

### 2.1. Expression plasmidique pour l'exposition de TTFC en surface de *L. plantarum*

#### 2.1.1. Construction du plasmide pMEC69

Le plasmide pMEC69 est dérivé du pMEC4, une construction permettant l'expression cytoplasmique de TTFC (Chagnaud et al., en préparation). Un fragment d'ADN (2312 pb) codant la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> a été amplifié à partir du pSMB158 (Medaglini et al., 2001) par PCR à l'aide des oligonucléotides 5'-CATGCCATGGCTAAAAATAAC-3' et 5'-CCCAAGCTTTTAGTTTTCTTC-3' contenant un site *Nco*I et un site *Hind*III, respectivement. L'insertion de ce fragment dans pMEC4 digéré par *Nco*I et *Hind*III a conduit au plasmide pMEC69 (Figure 1).

Comme le montre la figure 1, pMEC69 porte une origine de répllication de *Lactobacillus hilgardii* ainsi qu'une origine reconnue par *E. coli*. Le fragment «*ldh*» (lactate déshydrogénase) de 482 pb localisé en amont de la séquence codant la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> contient le promoteur constitutif fort et le RBS («Ribosome Binding Site») du gène *ldhL* de *L. plantarum* DG301 (Ferain et al., 1994). Les signaux de terminaison de la transcription du gène *ldhL* sont présents dans le fragment «*ldh*» de 376 pb situé en aval de la séquence codant la chimère. L'hybride M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> est produit sous la forme d'une protéine de fusion avec les 25 premiers acides aminés de la LDH et contient, en principe, 165 acides aminés (aa) de la séquence N-terminale de M6, dont 42 aa correspondant à la séquence signal, ainsi que la séquence C-terminale (145 aa) de M6 nécessaire à l'ancrage à la paroi bactérienne. La construction plasmidique pMEC69 a été introduite chez *L. plantarum* NCIMB8826 par électrotransformation et six clones résistant à l'érythromycine ont été sélectionnés.

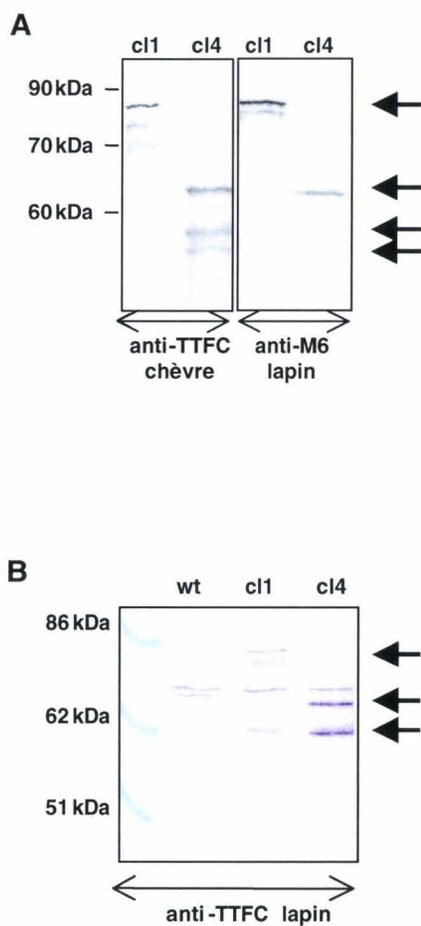


**Figure 1.** Carte de restriction partielle de pMEC69

*amp* : gène de résistance à l'ampicilline ; *erm* : gène de résistance à l'érythromycine ; *ldh* : gène de la lactate déshydrogénase ; **m6ttfcm6** : gène hybride codant la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC :M6<sup>C</sup> ; *ori* : origine de réplication.

### 2.1.2. Production de la protéine chimère

La production de la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> a été analysée par extraction des protéines totales pour les 6 clones transformants de *L. plantarum* portant le pMEC69 (abrégé par *L. plantarum* (pMEC69)). La figure 2A montre la production de la chimère pour les clones 1 et 4 après révélation par un sérum polyclonal anti-TTFC ou un sérum polyclonal anti-M6. On observe une bande immunoréactive aux alentours de 85 kDa pour le clone 1. Les clones 2 et 3 (résultats non présentés) présentent un profil identique. Dans le cas du clone 4, plusieurs bandes immunoréactives sont présentes aux alentours de 60 kDa. Ces bandes sont également retrouvées pour les clones 5 et 6 (résultats non présentés). Ces résultats montrent que seuls trois clones sur six produisent une protéine hybride à la taille attendue (85 kDa) alors que les trois autres produisent une chimère tronquée. Cette dernière semble être produite en plus grande quantité que la chimère entière (Figure 2B), pour des dépôts de protéines totales identiques (1µg).

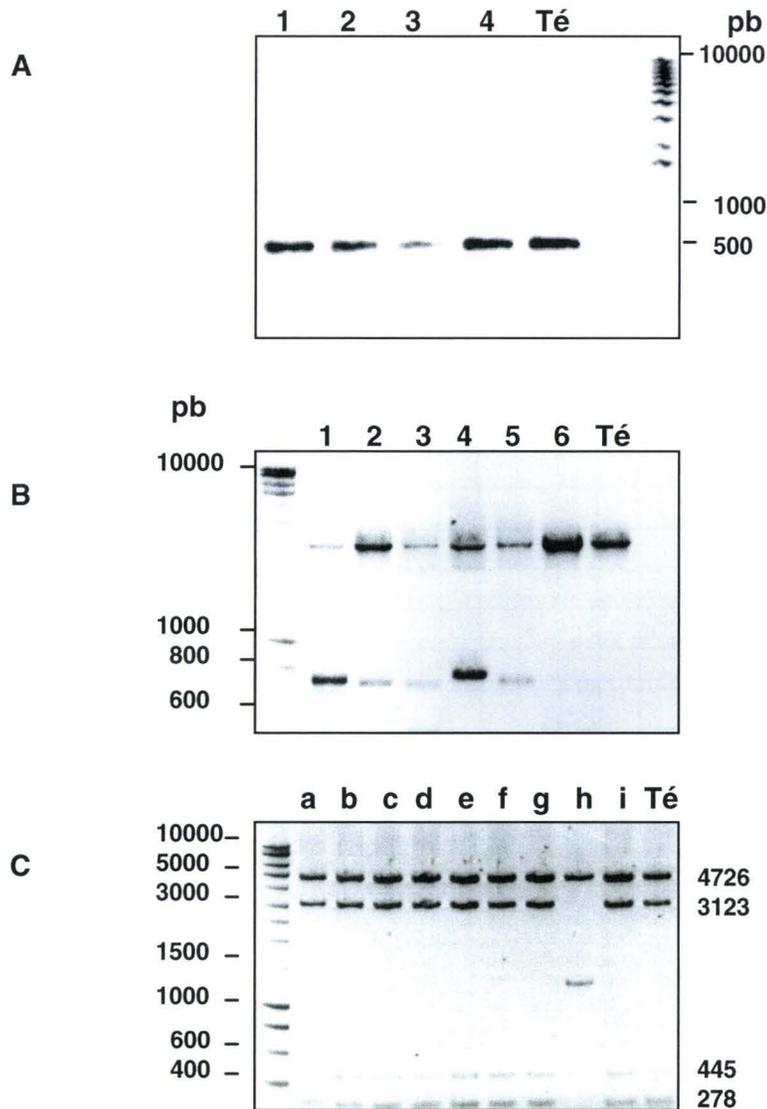


**Figure 2.** Production de l'antigène hétérologue par *L. plantarum* NCIMB8826 (pMEC69) clone 1 (c11) et clone 4 (c14) comparée à *L. plantarum* NCIMB8826 sauvage (wt). Les immunoblots sont réalisés sur des extraits cellulaires totaux.

### 2.1.3. Analyse de l'ADN

L'analyse de l'ADN plasmidique de chaque clone de *L. plantarum* (pMEC69) a été effectuée pour tenter d'expliquer les deux profils protéiques obtenus (chimère entière ou tronquée). L'ADN plasmidique extrait de chaque clone a tout d'abord été vérifié par PCR (Figure 3). Un premier couple d'oligonucléotides, internes au gène codant la TTFC, a permis l'amplification d'un fragment de 500 paires de bases (pb) témoignant de la présence du gène codant la TTFC chez tous les clones (Figure 3A ; clones 5 et 6 non présentés). Un second couple d'oligonucléotides, permettant d'amplifier la totalité de l'insert, c'est-à-dire la fusion codant pour la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup>, conduit à un fragment de 2300 pb correspondant à l'insert total pour les 6 clones, plus un fragment de  $\pm 700$  pb pour plusieurs clones (Figure 3B). Les deux bandes sont présentes en quantités différentes selon le clone étudié. Ces premiers résultats suggèrent la présence de deux populations d'ADN plasmidique pour 5 clones sur 6. L'ADN plasmidique de chaque clone a ensuite été transféré par électroporation chez *E. coli* pour permettre une analyse plus détaillée. Dix colonies résistantes à l'ampicilline (*E. coli* transformants) issues de chaque transformation ont été analysées. Après extraction par lyse alcaline, l'ADN plasmidique a été digéré par *EcoRI* et comparé au pMEC69 d'origine. Alors que l'ADN de 59 colonies sur 60 présente le profil de restriction attendu, une seule colonie contient un plasmide modifié (délétion de 2000 pb) (Voir Figure 3C pour exemples). Cette colonie d'*E. coli* était issue de la transformation avec l'ADN de *L. plantarum* (pMEC69) clone 2 ; or, ce dernier produit une protéine hybride M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> à la taille attendue.

Cette analyse n'a pas permis d'établir une corrélation entre les résultats de PCR, les profils de restriction enzymatique et les profils protéiques (chimère entière ou tronquée) obtenus pour les 6 clones de *L. plantarum* NCIMB8826 (pMEC69). Soupçonnant une instabilité de pMEC69, nous avons entrepris d'intégrer la construction dans le chromosome bactérien.



**Figure 3.** Structure de l'ADN plasmidique extrait des différents clones (1 à 6) de *L. plantarum* (pMEC69). **A.** Analyse PCR à l'aide d'oligonucléotides internes au gène codant TTFC. **B.** Analyse PCR à l'aide d'oligonucléotides s'hybridant aux extrémités 5' et 3' du gène codant la chimère M6<sup>N</sup>::TTFCM6<sup>C</sup>. **C.** Restriction enzymatique (*EcoRI*) sur ADN plasmidique de colonies de *E. coli* (pistes a-i) transformées avec l'ADN de *L. plantarum* (pMEC69) clone 2. L'ADN témoin (Té) correspond au pMEC69 d'origine ; les tailles des fragments *EcoRI* sont données dans la marge droite.

## 2.2. Expression chromosomique pour l'exposition de TTFC en surface de *L. plantarum*

L'intégration de la fusion génétique codant  $M6^N::TTFC::M6^C$  dans le chromosome bactérien a nécessité la construction d'un plasmide suicide, pMEC123, incapable de se répliquer chez *L. plantarum*.

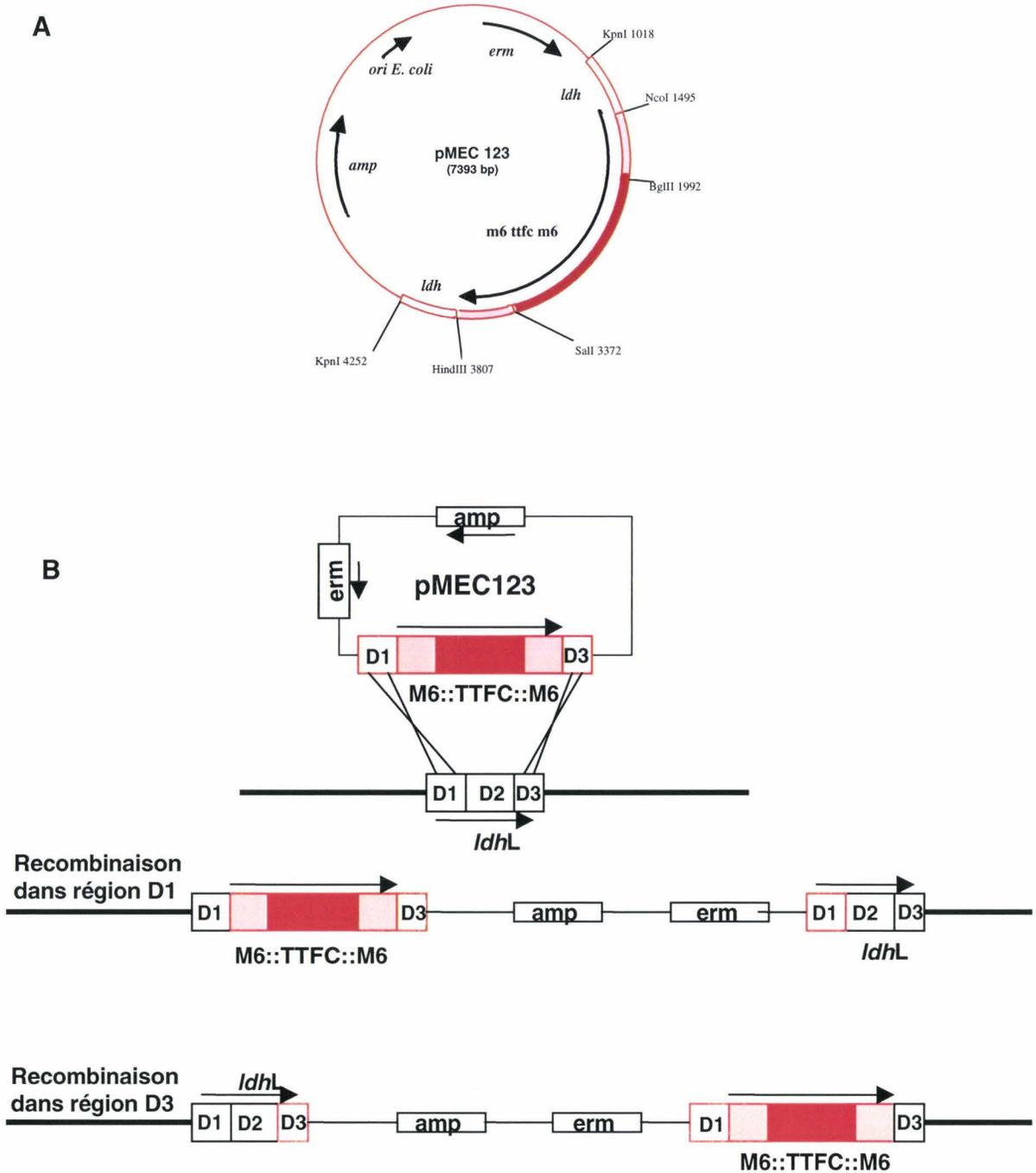
### 2.2.1. Construction de pMEC123 et intégration chromosomique

Le plasmide pMEC 123 (Figure 4A) a été obtenu à partir du pMEC69 par délétion de l'origine de répllication des bactéries lactiques : un fragment de 1179 pb a été éliminé après digestion de pMEC69 par les enzymes de restriction *NaeI* et *NruI* puis religation.

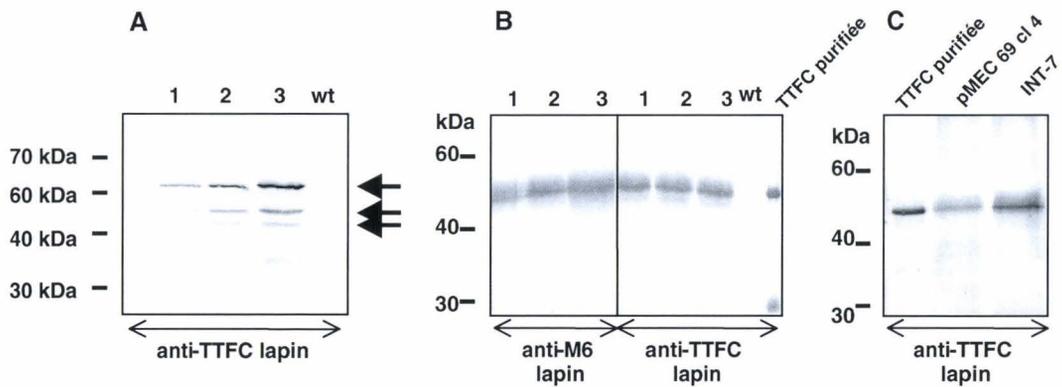
La stratégie d'intégration choisie est basée sur un événement de recombinaison homologue entre l'une des deux séquences *ldh* présentes dans pMEC123 (Figure 4A) et le gène *ldh* du chromosome bactérien (Figure 4B). Le résultat de la recombinaison intermoléculaire entre les séquences D1 ou D3 est l'intégration du plasmide entier dans le génome bactérien.

### 2.2.2. Production

Après introduction de pMEC123 chez *L. plantarum*, 14 colonies résistantes à l'érythromycine, apparues trois à quatre jours après transformation, ont été sélectionnées. Les figures 5A et 5B représentent la production de la chimère  $M6^N::TTFC::M6^C$ , pour 3 des 14 intégrants, dans les extraits cellulaires totaux et dans les surnageants de culture, respectivement. On observe que tous les intégrants présentent le même profil protéique. L'un d'entre eux a été nommé INT-7. Tout comme pour *L. plantarum* (pMEC69) clone 4, plusieurs bandes aux alentours de 60 kDa sont révélées par un sérum polyclonal anti-TTFC dans les extraits totaux (Figure 5A). L'analyse des surnageants de culture concentrés montre la présence d'une seule bande (soit environ 50 kDa) révélée aussi bien par le sérum anti-TTFC que par le sérum anti-M6 (Figure 5B). Cette même bande est retrouvée dans le surnageant de culture de l'intégrant (INT-7) cultivé pendant environ 100 générations sans pression de sélection ainsi que dans le surnageant de culture de *L. plantarum* (pMEC69) clone 4 (Figure 5C). Les 14 intégrants testés produisent donc tous une protéine chimère tronquée.



**Figure 4.** Intégration de la construction codant  $M6^N::TTFC::M6^C$  dans le chromosome de *L. plantarum* NCIMB8826. **A.** Carte de restriction partielle du vecteur suicide pMEC123. **B.** Schéma d'intégration au locus *ldhL* par recombinaison homologue entre les régions *ldh* D1 ou D3. *amp* : gène de résistance à l'ampicilline ; *erm* : gène de résistance à l'érythromycine ; *ldh* : gène de la lactate déshydrogénase ; *m6ttfcm6* : gène hybride codant la chimère  $M6^N::TTFC::M6^C$  ; *ori* : origine de répliation.



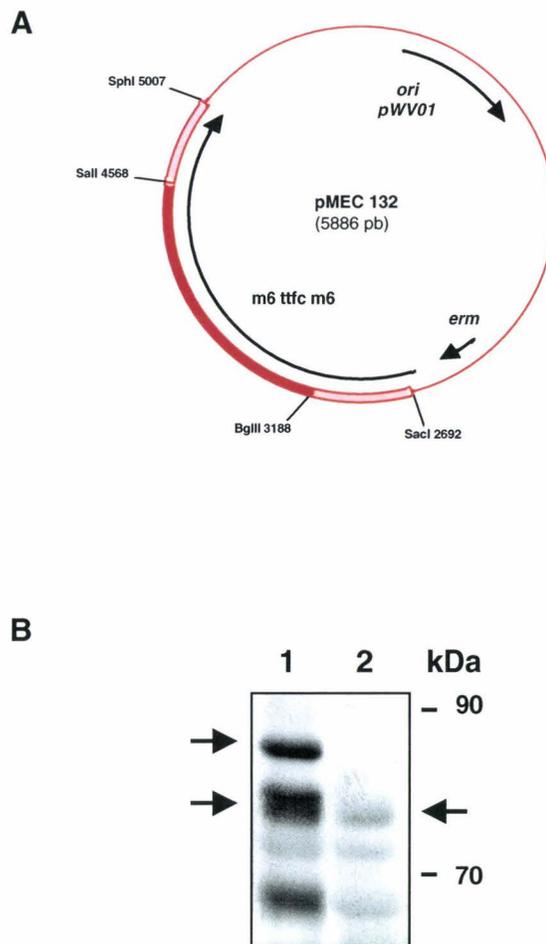
**Figure 5.** Production de l'antigène hétérologue par 3 intégrants (1 à 3) de *L. plantarum* NCIMB8826 comparé à la souche sauvage (wt). Les immunoblots sont réalisés avec des extraits cellulaires totaux (A) et des surnageants de culture concentrés (B et C).

Ces résultats montrent qu'aucune amélioration n'a été obtenue, quant à la production d'une chimère  $M6^N::TTFC::M6^C$  de taille correcte, après intégration du gène hybride dans le chromosome bactérien.

### 2.3. Utilisation d'un autre système d'expression

Afin de vérifier si les problèmes décrits plus hauts étaient liés à l'utilisation d'un plasmide recombinant particulièrement instable, nous avons utilisé un vecteur d'expression dérivé d'un plasmide endogène de *Lactococcus lactis*, le pMG36e (van de Guchte et al., 1989). Le clonage du fragment codant la chimère  $M6^N::TTFC::M6^C$  sous le contrôle du promoteur P32 (promoteur de force moyenne chez *L. lactis*) de pMG36e a conduit à la construction pMEC132 (Figure 6A). Ce plasmide a été introduit chez *L. plantarum* NCIMB8826 et la production de la chimère a été vérifiée par western blot sur extraits cellulaires totaux. La figure 6B montre que la protéine hybride est produite en quantité très faible par la souche recombinante portant pMEC132 comparée à *L. plantarum* (pMEC69) clone1. L'utilisation de pMG36e n'a pas permis, dans ce cas, d'améliorer la production de la chimère  $M6^N::TTFC::M6^C$ .

Ce plasmide (pMG36e) a également été utilisé pour le clonage de la fusion génétique codant  $M6^N::TTFC$  et visant à sécréter la TTFC dans le milieu extracellulaire.

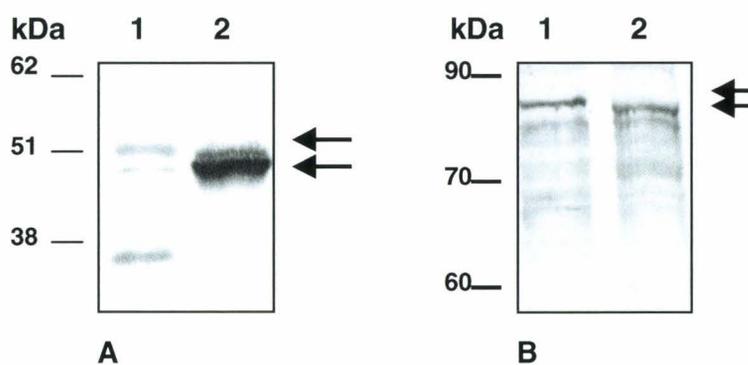


**Figure 6.** **A.** Carte de restriction partielle de pMEC132. **B.** Production de la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> par *L. plantarum* (pMEC69) clone 1 (1) et *L. plantarum* (pMEC132) (2). Les immunoblots sont réalisés avec des extraits cellulaires totaux (révélation anti-TTFC lapin). *erm* : gène de résistance à l'érythromycine ; *m6ttfc6* : gène hybride codant la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC :M6<sup>C</sup> ; *ori* : origine de répllication.

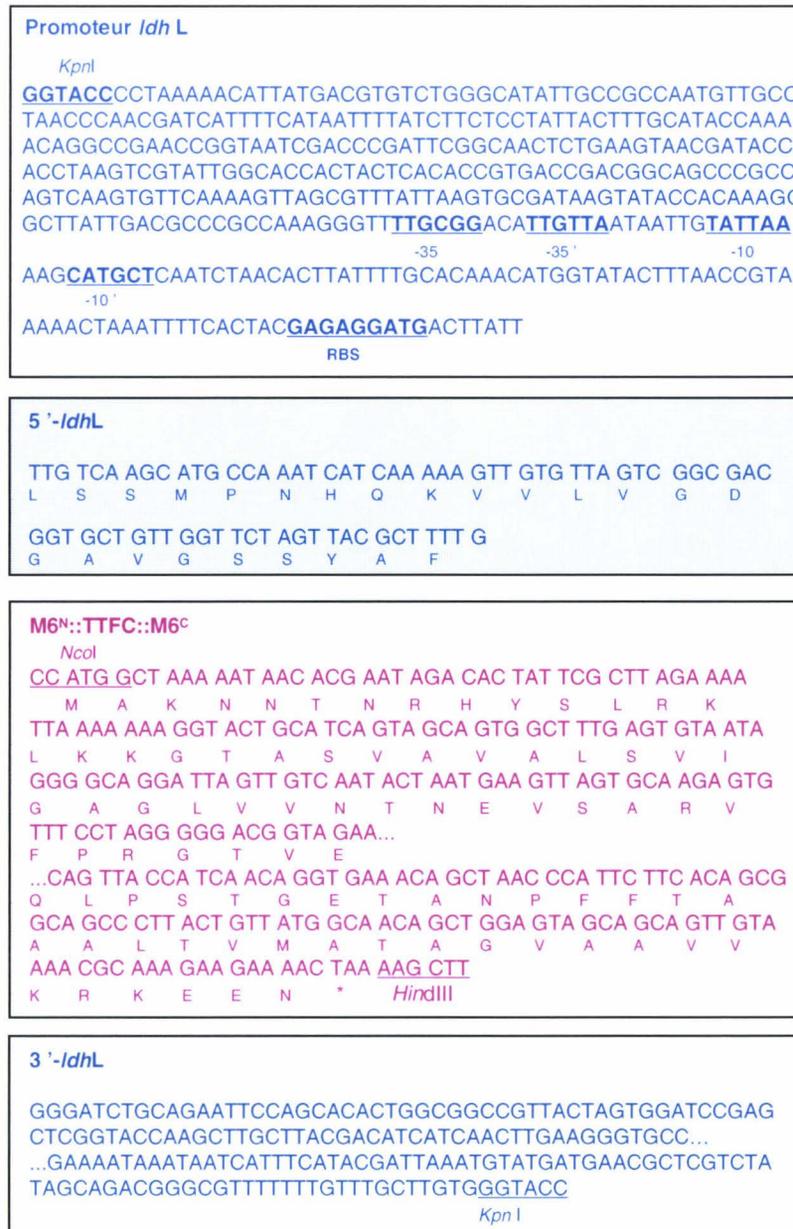
### 2.3. Modification de la région d'initiation de traduction de la fusion codant M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup>

La dernière stratégie employée pour tenter d'améliorer l'expression du gène hybride a été de modifier la région 5' de la séquence codant M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup>. Le détail de la construction plasmidique, pMEC69 (Figure 7), montre la présence d'une séquence *ldh* (cadre bleu, Figure 7) en amont de la séquence codant M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> qui engendre la production d'une protéine de fusion LDH-M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup>. Cette même séquence *ldh*, également présente dans pMEC4, a été supprimée pour obtenir le pMEC127 (voir plus loin) et a conduit à une amélioration considérable de la production de TTFC dans le cytoplasme chez *L. plantarum* (Figure 8A).

Dans le cas de l'exposition de TTFC en surface de *L. plantarum*, la construction du plasmide pMEC139, obtenue par élimination de 73 pb de l'extrémité 5' du gène *ldh* dans pMEC69, n'a pas permis d'améliorer la production de la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> (Figure 8B). Cependant, sur 6 clones de *L. plantarum* (pMEC139) testés, tous produisaient une chimère à la taille attendue (résultats non présentés). Cette dernière stratégie a donc conduit à des résultats encourageants pour la production de TTFC dans le cytoplasme ou encore en surface de *L. plantarum* NCIMB8826. Les cartes des plasmides pMEC127 et pMEC139 sont données dans la figure 10 (section B).



**Figure 8.** **A.** Production de TTFC par *L. plantarum* (pMEC4) (1) et *L. plantarum* (pMEC127) (2). **B.** Production de la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> par *L. plantarum* (pMEC69) clone1 (1) et *L. plantarum* (pMEC139) (2). Les immunoblots sont réalisés avec des extraits cellulaires totaux (révélation anti-TTFC lapin).



**Figure 7.** Organisation du fragment *KpnI-KpnI* dans pMEC69. **RBS** : Ribosome Binding Site ; *ldhL* : L- lactate deshydrogénase ; **-35, -10** : boîtes d'initiation de la transcription.

## 2.5. Comparaison des différentes souches recombinantes produisant la TTFC

### 2.5.1. Mesure de l'exposition de la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> en surface de la bactérie.

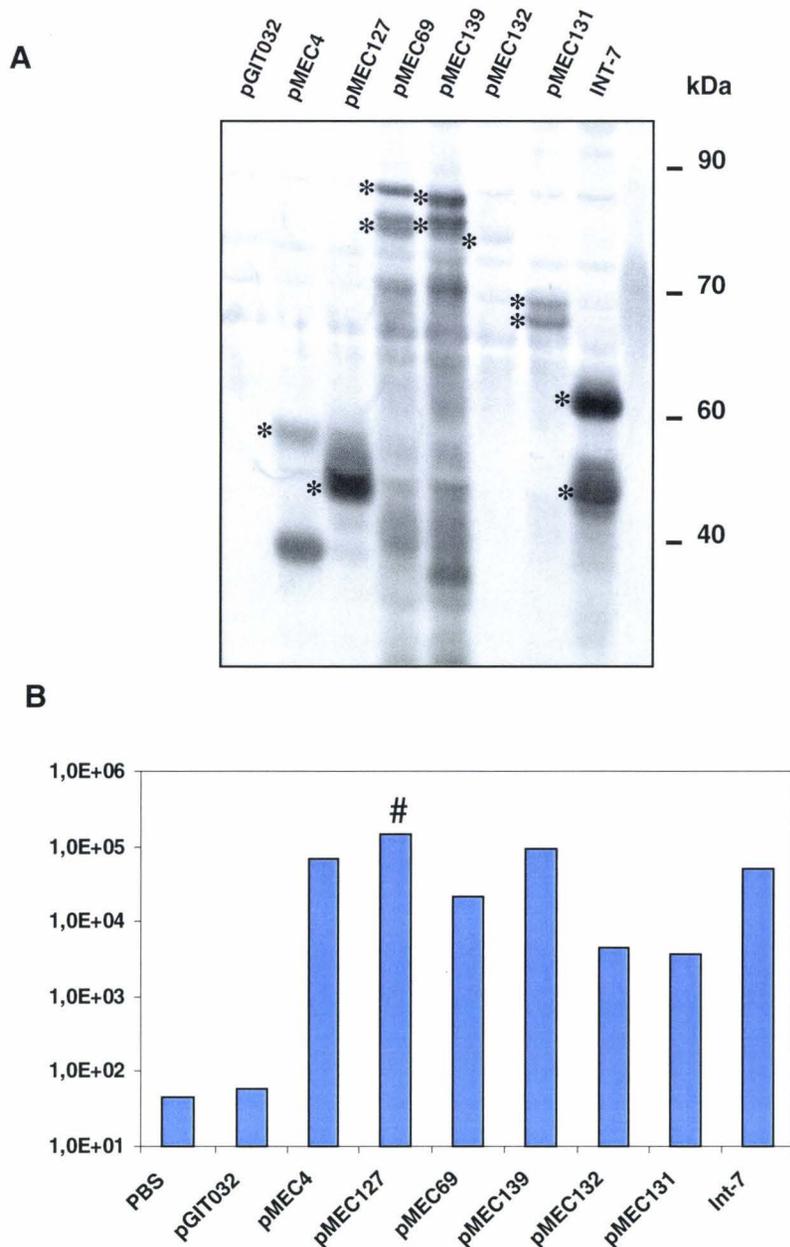
L'exposition de la TTFC en surface de *L. plantarum* a été vérifiée par mesure du pourcentage de bactéries fluorescentes en cytométrie de flux après un marquage avec un sérum anti-TTFC. Le tableau 2 montre que la souche exposant le plus de TTFC à sa surface est *L. plantarum* (pMEC139) avec 15 % de fluorescence, suivie de *L. plantarum* (pMEC69) avec 11 % de fluorescence. Ces pourcentages sont faibles suggérant qu'une proportion réduite de bactéries expose correctement la chimère M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> à leur surface.

**Tableau 2.** Mesure de l'exposition de TTFC en surface de *L. plantarum* NCIMB8826 en cytométrie de flux.

Souches recombinantes	Pourcentage de fluorescence (marquage anti-TTFC)
<i>L. plantarum</i> (pMEC69) clone1	11,0
<i>L. plantarum</i> INT-7	5,3
<i>L. plantarum</i> (pMEC132)	3,9
<i>L. plantarum</i> (pMEC139)	15,0
<i>L. plantarum</i> sauvage	2,7

### 2.5.2. Contrôle de l'immunogénicité des différentes souches recombinantes

Les différentes souches recombinantes construites pour la production de TTFC (i) dans le cytoplasme (*L. plantarum* (pMEC4) et *L. plantarum* (pMEC127)), (ii) en surface de la bactérie (*L. plantarum* (pMEC69), *L. plantarum* (pMEC139), *L. plantarum* (pMEC132) et *L. plantarum* INT-7), (iii) ou dans le milieu extracellulaire (*L. plantarum* (pMEC131)) ont été comparées dans une même expérience d'immunisation systémique. Elles ont été administrées par voie sous-cutanée chez la souris afin de vérifier si le niveau de production des protéines hétérologues était suffisant pour induire une réponse immunitaire. La figure 9A montre la quantité d'antigènes administrés pour chaque souche. Les résultats présentés dans la figure 9B correspondent à la réponse immunitaire mesurée en fin de protocole (après la 3<sup>ème</sup> administration). On observe que toutes les souches productrices de TTFC sont immunogènes



**Figure 9. A.** Production de l'antigène hétérologue par les différentes souches recombinantes de *L. plantarum* NCIMB8826. Western blot réalisé sur des extraits totaux, révélés avec un sérum anti-TTFC. **B.** Réponse anticorps anti-TTFC induite après immunisation sous-cutanée de  $10^9$  UFC des différentes souches recombinantes de *L. plantarum* ; # : saturation de la réponse.

PBS, pGIT032 : contrôles négatifs

pMEC4 et pMEC127 : production intracellulaire

pMEC69, pMEC139, pMEC132 et INT-7 : présentation à la surface

pMEC131 : production dans le milieu extracellulaire

mais induisent des taux d'IgG sériques anti-TTFC variables. En effet, dans le cas de l'expression cytoplasmique, la souche portant pMEC127 induit des taux d'anticorps plus élevés ( $1,5 \times 10^5$ ) que la souche portant pMEC4 ( $7 \times 10^4$ ) (Figure 9B). Cette différence semble être reliée au niveau de production de TTFC respectif de chacune des deux souches (Figure 9A). Dans le cas de l'expression en surface, la souche *L. plantarum* pMEC139 semble être plus immunogénique (titres de  $9 \times 10^4$ ) que *L. plantarum* pMEC69 (titres de  $2 \times 10^4$ ), qui elle-même induit une réponse immunitaire plus élevée que *L. plantarum* pMEC132 ( $4,5 \times 10^3$ ) (Figure 9B). L'administration de la souche *L. plantarum* pMEC131, construite pour la sécrétion de TTFC, induit des taux d'anticorps comparables à ceux induits par *L. plantarum* pMEC132 ( $3,7 \times 10^3$ ). Là encore, le niveau de production de la TTFC est très faible comparé à celui obtenu pour les autres souches recombinantes (Figure 9A). Enfin, la souche *L. plantarum* INT-7, construite pour l'exposition de TTFC en surface de la bactérie, constitue un cas à part puisqu'elle produit une protéine chimère retrouvée en grande quantité dans le cytoplasme (Figure 9A). Cette souche induit une réponse anticorps du même ordre que *L. plantarum* pMEC4 (titres de  $5 \times 10^4$ ) (Figure 9B).

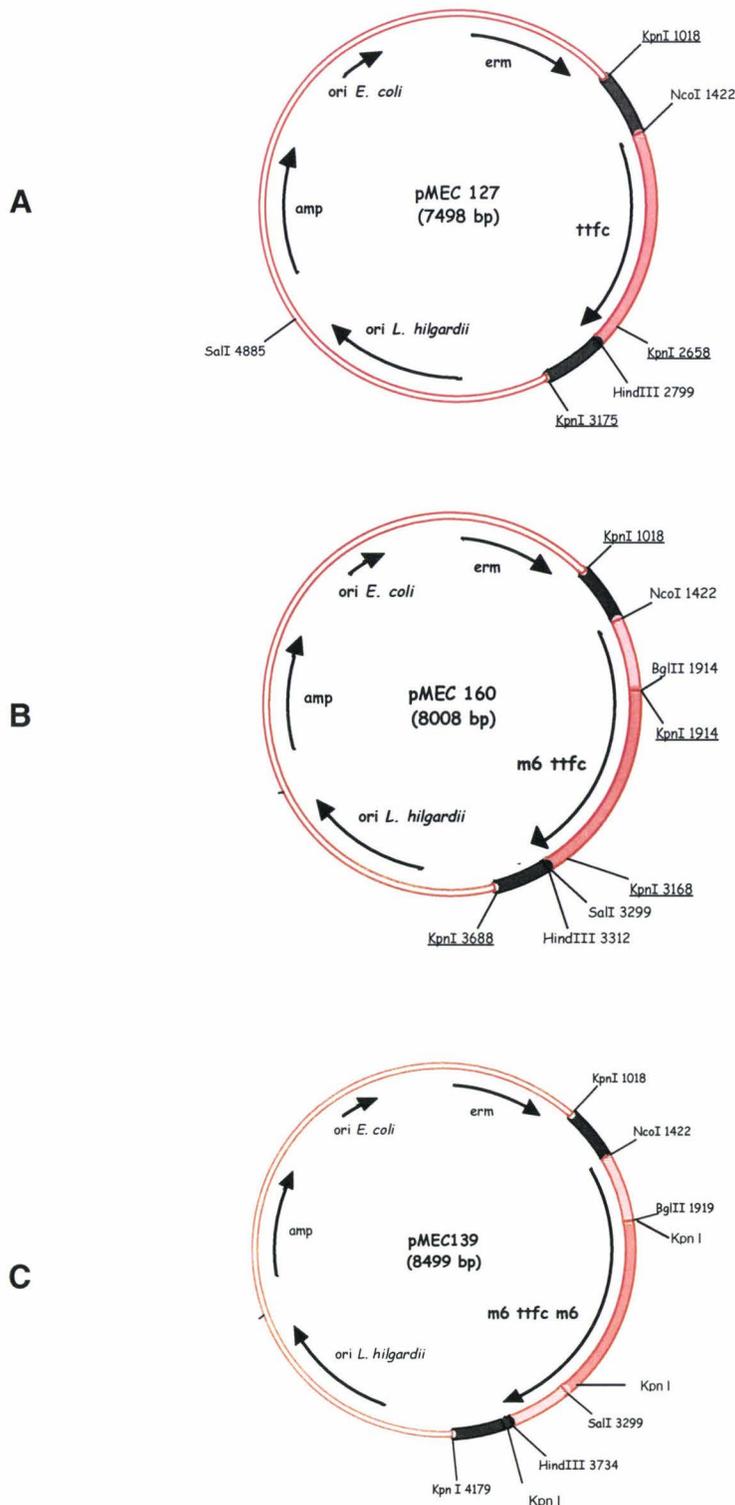
## 2.6. Conclusions

L'ensemble des résultats de cette première partie nous a conduits à sélectionner une souche productrice de TTFC en grande quantité dans le cytoplasme (*L. plantarum* pMEC127) et capable d'induire de forts taux d'anticorps après administration sous-cutanée. Nous avons également choisi de travailler avec la souche *L. plantarum* pMEC139 qui semble exposer plus efficacement la TTFC à sa surface que la souche *L. plantarum* pMEC69 et qui induit une réponse immunitaire plus élevée que cette dernière par administration sous-cutanée. La construction d'une souche sécrétrice de TTFC, *L. plantarum* pMEC131 (promoteur P32), n'ayant pas conduit à des résultats aussi encourageants, nous avons utilisé le contexte génétique de pMEC127 et pMEC139 (promoteur *ldh*) pour réaliser une dernière construction pour la sécrétion de TTFC. Les trois plasmides ainsi utilisés dans le reste de l'étude sont présentés dans la figure 10 (Section B).

**B. Analyse du comportement *in vitro* des souches recombinantes de *L. plantarum* productrices de TTFC dans le cytoplasme, dans le milieu extracellulaire ou en surface de la bactérie.**

Avant de comparer la réponse immunitaire induite par les trois souches recombinantes sélectionnées, il nous est apparu important de contrôler leur comportement par des études *in vitro*. Nous avons tout d'abord comparé les niveaux de production de l'antigène hétérologue selon la localisation ciblée. Puis, la viabilité de chaque souche recombinante a été mesurée. Enfin, nous avons examiné la stabilité de l'expression du gène d'intérêt au cours du temps.

L'ensemble des résultats obtenus pour cette deuxième partie est présenté dans l'article intitulé : **“Study of the structural stability of plasmid constructions aiming at the production of tetanus toxin fragment C in three different locations in *Lactobacillus plantarum*”**. Article en préparation.



**Figure 10.** Cartes de restriction partielle des plasmides pMEC127, pMEC160 et pMEC139.

*amp* : gène de résistance à l'ampicilline ; *erm* : gène de résistance à l'érythromycine ; *ldh* : gène de la lactate déshydrogénase ; *m6ttfcm6* : gène hybride codant la chimère  $M6^N::TTFC:M6^C$  ; *m6ttfc* : gène hybride codant la chimère  $M6^N::TTFC$  ; *ttfc* : gène codant la TTFC ; *ori* : origine de répliation.

**Study of the structural stability of plasmid constructions targeting the production of tetanus toxin fragment C in three different locations in *Lactobacillus plantarum*.**

Nathalie Reveneau<sup>1, 2</sup>, Patrice Chagnaud<sup>1</sup>, Emilie Smal<sup>1</sup>, Camille Locht<sup>2</sup> and Annick Mercenier<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes, INSERM IFR17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France
2. Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM U447 and IFR17, IBL, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

Corresponding author: Dr. Annick Mercenier, Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur. Calmette, B.P. 245, F-59019 Lille Cedex, France

Phone: (+33) 320 87 11 86, Fax: (+33) 320 87 11 92

E-mail: [annick.mercenier@ibl.fr](mailto:annick.mercenier@ibl.fr)

## 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram positive microorganisms, used traditionally since centuries in the manufacturing of fermented food. Some of them are present in natural mucosae of humans and animals, where they exert beneficial effects on the health (Salminen et al., 1996). Their “Generally Recognised as safe” (GRAS) status has recently holded the attention for their use as mucosal carriers of heterologous antigens (Norton et al., 1995 ; Medaglini et al., 1997a ; Pouwels et al., 1998). Studies in animal models have demonstrated that immunization with such vaccines is an effective and safe way to induce the production of mucosal and serum antibodies against the foreign antigen (Mercenier et al., 2000 ; Grangette et al., 2001 ; Medaglini et al., 2001). The use of LAB as vaccine vectors requires to introduce the foreign gene, coding for the relevant protein into the host, usually on recombinant plasmids. Numerous expressing vectors have been constructed for LAB based on endogenous plasmids of Gram positive microorganisms (Leenhouts & Venema, 1993 ; Wang & Lee, 1997). Most of them, replicate via a single-stranded deoxyribonucleic acid (ssDNA) intermediate by rolling-circle replication (RCR) (te Riele et al., 1986a ; te Riele et al., 1986b). Studies on RCR plasmid replication in *Bacillus* have demonstrated that this type of replicon is prone to instability (Gruss & Ehrlich, 1989). Two types of instability can be distinguished: segregational instability leading to the loss of entire plasmid population from the cell (Devine et al., 1989 ; Bron et al., 1991b), and structural instability resulting in plasmid populations carrying rearrangements, most frequently deletions (Bron et al., 1991b ; Ehrlich et al., 1993). A number of expression systems have been developed to target heterologous protein production in the cytoplasm, in the extracellular medium or at the cell surface of LAB. The most frequently used secretion and anchoring signals were those of Usp45 and PrtP of *Lactococcus lactis* and protein A of *Staphylococcus aureus* (Norton et al., 1996 ; Steidler et al., 1998b; Dieye et al., 2001). A well characterized surface protein of *Streptococcus pyogenes*, named M6 protein, was also used to drive secretion and cell wall-anchoring of recombinant fusion proteins in *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gordonii* and *L. lactis* (Hols et al., 1997 ; Beninati et al., 2000 ; Medaglini, et al., 2001 ; Dieye, et al., 2001). M6 is exported across the membrane via a Sec-dependant mechanism. The cell-wall anchoring is mediated by a LPXTG motif present on the C-terminal extremity of the protein (Leenhouts et al., 1999).

Recently, we have constructed a series of expression vectors which aim at targeting tetanus toxin fragment C (TTFC) synthesis to three different locations in *L. plantarum*, in order to

assess the effect of the antigen location on the immunogenicity of the corresponding recombinant strains (Reveneau et al., submitted). All recombinant plasmids were derived from the RCR plasmid pLAB1000 of *Lactobacillus hilgardii* (Josson et al., 1990). Expression of the recombinant genes was controlled by the strong constitutive *pldh* promoter of *L. plantarum* DG301 (Ferain et al., 1994). Secretion and cell surface exposure of TTFC were achieved using the export and/or anchoring signals of M6 protein. Here we investigate the genetic stability of these strains, as this factor may impact considerably on the induced immune response. The results described in the present paper show that cell viability was affected by secretion and cell wall anchoring of TTFC. In addition, the plasmid pLAB1000 carrying the genetic determinants for TTFC secretion and cell wall presentation were structurally highly unstable in *L. plantarum* as compared to the construction leading to cytoplasmic expression of TTFC.

## 1. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

As previously described (Reveneau et al., submitted), pMEC160 and pMEC139 were derived from pMEC127 by replacing the gene encoding TTFC by fusion genes encoding M6::TTFC (pMEC160) and M6::TTFC::M6' (pMEC139), respectively (Fig. 1). *Escherichia coli* XL1-Blue was cultured on Luria-Bertani at 37°C (Sambrook et al., 1989). *L. plantarum* NCIMB8826 was grown at 37°C in MRS medium (Difco laboratories, Detroit, Mich. USA) without shaking. The media were supplemented with 100µg/ml ampicillin (Ap) for *E. coli* and 5µg/ml erythromycin (Em) for *L. plantarum* when necessary.

### 2.2. Determination of the doubling time and measure of cell viability

Cultures of *L. plantarum* containing each of the 3 plasmids were grown in MRS medium containing Em. Growth was followed by measuring the optical density at 600nm (OD<sub>600nm</sub>). At 2 hours intervals, aliquots of the cultures were diluted and spread on MRS agar containing Em to determine the number of colony forming unit (CFU) corresponding to the viable cell number. Doubling- or generation time (g) was determined using the equation

$$g = \ln 2 (t_2 - t_1) / (\ln X_2 - \ln X_1)$$

where *X* is the number of cells and *t* is time (h).

### 2.3. Assay for *in vitro* expression and stability analysis

The different recombinant strains of *L. plantarum* were grown at 37°C in MRS medium with antibiotic. Serial subcultures were performed for 10 consecutive days by inoculating 10 µl of the previous culture in 10 ml of fresh medium containing antibiotic. At each step of the propagation protocol, TTFC production was verified by immunoblotting and the plasmid DNA structure was analyzed.

### 2.4. Protein analysis

TTFC synthesis was examined by Western blotting (Sambrook, et al., 1989). Ten ml of bacteria were harvested at mid-exponential phase ( $OD_{600nm} \approx 1.5$ ) by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was washed twice and resuspended in 1 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5). Total cell extracts were prepared by disruption of bacterial cells with a French pressure cell (Bioritech, Chamarande, France) and immediate addition of an anti-protease cocktail (Complete, Boehringer, Mannheim, Germany). The culture supernatant was supplemented with 1:40 of 1 % sodium deoxycholate (DOC). After 20 min at 4°C, 1:16 of 100 % trichloroacetic acid (TCA) was added and the mixture was incubated for 5 min at room temperature. The suspension was centrifuged at 3500 rpm for 20 min, and the pellet was washed once with ice-cold ethanol and resuspended in 1 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8). The amounts of total protein present in the extracts were determined using a Bradford assay (Bradford, 1976) with bovin gamma globulin as a standard. A volume corresponding to 10µg of total cell proteins or concentrated supernatant were heated at 100°C for 5 min in Laemmli sample buffer (Laemmli, 1970) and subjected to 10 % SDS-PAGE. BenchMark prestained protein ladder (Gibco BRL, Gaithersburg, Md. USA) was used as a molecular weight marker. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane by electroblotting (Towbin et al., 1979). Immunoblots were developed with rabbit anti-TTFC polyclonal serum diluted at 1:1000 (Innogenetics, Ghent, Belgium) and with AP-linked secondary antibody (Promega, Madison, WI., USA) diluted at 1:7000. Semi-quantification of the TTFC amounts were performed by scanning of the blots and processing of the resulting tiff files by the software GelComparII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Intensity (pixels per band area) of the strongest band was considered as 100% and used as a reference to estimate percentages of intensity in the other lanes.

## 2.5. Plasmid DNA analysis

*L. plantarum* plasmid DNA was extracted according to the method of Posno et al. (Posno et al., 1991). *E. coli* was transformed by electroporation and plasmid DNA was extracted by the alkaline lysis method as described by Sambrook et al. (Sambrook, et al., 1989). Restriction endonucleases were purchased from Biolabs (Beverly, Mass. USA) and were used following the recommendations of the manufacturer. Agarose gel electrophoresis was performed on 0.8% slab gels in 0.04 M Tris-0.2 M sodium acetate-0.002 M EDTA (pH 7.8) (TAE). The Smart Ladder “Classic” (Eurogentec, Seraing, Belgium) was used as molecular weight standard. Sequencing reactions were performed using the ABI PRISM™ Dye Terminator sequencing kit (Perkin Elmer, Foster City, Cal., USA).

## 3. Results

### 3.1. Effect of export and cell wall anchoring on the final TTFC production level

The level of TTFC production by the three recombinant *L. plantarum* strains was controlled by submitting identical amounts of total proteins (10 µg) from cell extracts and culture supernatants to SDS PAGE analysis (Fig. 2). As previously described (Reveneau et al., submitted), *L. plantarum* harboring pMEC127 (Fig. 2, lane 2), pMEC160 (Fig. 2, lanes 3 and 5) or pMEC139 (Fig. 2, lane 4) produced a 51-kDa, 65-kDa or 80-kDa protein band reacting with anti-TTFC antibodies, respectively. Large amount of precursor was obtained at 85-kDa in the cell extract of *L. plantarum* (pMEC139). No signal was detected in the cell extract and in the culture supernatant of the control strain *L. plantarum* (pGIT032) (Fig. 2, lanes 1 and 6). The scan analysis showed that the level of TTFC in cell extracts of *L. plantarum* harboring pMEC139 or pMEC160 and in the culture supernatant of *L. plantarum* (pMEC160) corresponded to 24%, 1.8% and 8.2% of the total TTFC amount produced by *L. plantarum* (pMEC127), respectively. Thus, the antigen level synthesized by *L. plantarum* (pMEC139) or *L. plantarum* (pMEC160) was 4 or 12 times lower, respectively, than the TTFC cytoplasmic concentrations measured in *L. plantarum* (pMEC127).

### 3.2. Effect of TTFC expression, export and anchoring on the cell viability

Figure 3 shows that at an identical OD<sub>600nm</sub>, the number of viable cells was lower for the TTFC producing strains than for the control strain. The lowest CFU number was obtained for the *L. plantarum* (pMEC139) strain that produces cell surface-anchored TTFC. The growth curves (data not shown) indicated that the doubling time was of 1.2 h, 2.5 h, 3.1 h and 5.4 h for *L. plantarum* harboring pGIT032, pMEC127, pMEC160 or pMEC139, respectively.

### 3.3. Evaluation of TTFC production levels during subculturing of the recombinant *L. plantarum* strains

Figure 4 represents the TTFC production at different steps of the strains propagation protocol. Total cell proteins were extracted from the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> *L. plantarum* (pMEC127) subcultures (Fig. 4A) and from the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> *L. plantarum*(pMEC160) (data not shown) and *L. plantarum*(pMEC139) (Fig. 4C) subcultures. The culture supernatants from the same *L. plantarum*(pMEC160) subcultures were also tested. Figure 4A shows that the TTFC production by *L. plantarum* (pMEC127) was detected during the six first days of the propagation protocol but that the protein was no longer detected after the 6<sup>th</sup> subculture. In contrast TTFC could only be detected after the 1<sup>st</sup> subculture of *L. plantarum* (pMEC160) (Fig. 4B) and of *L. plantarum* (pMEC139) (Fig. 4C). Very low or no TTFC reactive protein bands were detected at the 2<sup>nd</sup> and the 3<sup>rd</sup> day of subculture.

### 3.4. Structural stability analysis of the recombinant plasmids

Plasmid DNA of each *L. plantarum* subculture was extracted and introduced in *E. coli* by electroporation to enable the isolation of sufficient amounts of plasmid DNA for restriction analysis and sequencing. After transformation, plasmid DNA was isolated from five randomly picked Ap<sup>r</sup> colonies of *E. coli* and digested with *Kpn*I. Restriction profiles are shown in Fig. 5, as compared to the original plasmids pMEC127 (Fig. 5A, lane 1), pMEC160 (Fig. 5B, lane 1) and pMEC139 (Fig. 5C, lane 1). The restriction analysis of plasmid DNA corresponding to the 6<sup>th</sup> subculture of *L. plantarum* (pMEC127) shows that a ~500bp fragment was lost (Fig. 5A, lane 2). This deletion was observed for all (5/5) *E. coli* colonies tested. In the case of pMEC160, ~800 and ~1700 bp deletions were observed (Fig. 5B, lanes 2 and 3). They were

observed in 3/5 *E. coli* transformants obtained with DNA corresponding to the 1<sup>st</sup> subculture, and 5/5 *E. coli* colonies obtained after transformation with the DNA corresponding to the 2<sup>nd</sup> subculture. Figure 5C represents the restriction profiles obtained from plasmid DNA corresponding to the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> subcultures of *L. plantarum* (pMEC139). Deletions of 1000 and 3100 bp were observed in 2/5 *E. coli* colonies resulting from transformation with plasmid DNA of the 1<sup>st</sup> subculture. For the 2<sup>nd</sup> subculture, all tested *E. coli* colonies present an altered plasmid (2800 and 3100 bp deletions). The plasmid structural stability study was also performed on pGIT032 and no deletion was observed between the 1<sup>st</sup> and the 10<sup>th</sup> subculture (data not shown).

The different deletions were localized on the plasmids by sequencing (Figure 6). In pMEC127, a 524 bp fragment spanning the promoter region and the start of the TTFC encoding gene was deleted, thus preventing synthesis of TTFC expression. In pMEC160, a 1837 bp deletion was observed that corresponded to the promoter region and the almost entire fusion gene encoding M6-TTFC. Notably, specific simultaneous deletions of the 5' and 3' ends of *emm6* gene (510 and 506 bp, respectively) were generated in pMEC139. We found another type of deletion (3127 bp) in pMEC139, that covered the totality of the insert. The endpoints of the 800 and 2800 bp deletions observed by the *KpnI* restriction analysis pMEC160 and pMEC139, respectively, could not be mapped precisely. It is to note that the length of the deleted fragments and the deletion endpoints were very different in the three constructions.

#### 4. Discussion

We have studied the effect of producing TTFC in three different cellular locations on the stability of the corresponding *L. plantarum* recombinant strains. The M6 protein was chosen to drive TTFC export and anchoring in *L. plantarum*. By including or not the signal and/or anchoring sequences of M6 (Fig. 1), this system was used successfully to compare secretion, anchoring and cytoplasmic expression. However, we demonstrated that secretion and anchoring of TTFC was toxic for the cells (Fig. 4). The generation time was largely increased for *L. plantarum* harboring pMEC160 (TTFC secretion) or pMEC139 (TTFC production at the cell surface) as compared to the strain *L. plantarum* (pMEC127), that synthesizes TTFC intracellularly. This reduced growth rate might result from the metabolic burden or stress imposed by TTFC export and anchoring.

The genetic stability test showed that the M6::TTFC and M6::TTFC::M6' chimeras were no longer produced after the second subculture which corresponds to 15 generations for *L. plantarum* (pMEC160) and 9 generations for *L. plantarum* (pMEC139). On the contrary, TTFC cytoplasmic expression by *L. plantarum* (pMEC127) was stable during 60 generations. In all cases, the structural analysis of plasmid DNA showed deletions spanning the heterologous gene and its expression and/or targeting transcription/translation signals. This instability led to a heterogeneous plasmid population (intact parental plasmid and deletion variants) with cells harboring a rearranged plasmid that were found to have a clear growth advantage (data not shown). This might explain why *L. plantarum* (pMEC160) and *L. plantarum* (pMEC139) produce, respectively, 12 and 4 times less TTFC than *L. plantarum* (pMEC127). It also fits with the observation that only 15% of *L. plantarum* (pMEC139) bacterial population exposed the chimera M6::TTFC::M6' at the cell surface (N. Reveneau, unpublished).

The cause of structural rearrangements of RCR plasmids in *Bacillus subtilis* are usually linked to the presence of inverted and/or short direct repeats ((Peeters et al., 1988 ; Bron, et al., 1991a) but none of this type of sequences was found near the deletion points in our constructions. However, several alternative reasons could be at the basis of the instability of the recombinant plasmids we constructed. Deletions observed in pMEC160 and pMEC139 could be explained by the anchoring of the transcriptional-translational complex to the membrane, leading to a local hyper-supercoiling of plasmid DNA (Lynch & Wang, 1993). This structure could induce topoisomerase-dependent nicking activity as it was reported for PenP in *B. subtilis* (Cordes et al., 1996). The toxicity of the genes products could also be a cause of the plasmid instability. When M6 was expressed in *L. lactis* a truncated form of the protein was produced (Piard et al., 1997). These authors suggested that M6 was toxic to the cell and it was found that the heterologous gene was indeed deleted in given clones (Piard, personal communication). Notably, in both pMEC139 and pMEC69 (data not shown), identical specific deletions of 5' and 3' ends of the *emm6* gene were observed. The instability was not reduced when the hybrid gene carried by pMEC69 was integrated in the bacterial chromosome, as an identical truncated form of the chimera was produced. The overproduction of TTFC could be a additional source of instability as we observed a deletion, spanning the promoter and the start region of the TTFC encoding gene in pMEC127. The toxic effect of TTFC was reported by Norton et al. in *L. lactis* when it was anchored in the membrane as a PrtP fusion protein (Norton et al., 1996). Then the use of M6 as carrier for TTFC secretion and anchoring may amplify these toxic effects. Here, we demonstrated that resulting in the

juxtaposition of expression sequences selected independently under the control of a strong promoter may prove particularly inadequate.

In view of the structural stability of the recombinant *L. plantarum* strains we describe, we set up tightly controlled growth conditions and avoided to subculture the strains before administration to mice. Under these conditions high levels of seric anti-TTFC IgG after intranasal and intragastric immunization of the three recombinant strains of *L. plantarum* (Reveneau et al., submitted). Our work thus underlines that the analysis of the immunogenicity of recombinant strains should be carefully linked to the evaluation of their *in vitro* and *in vivo* stability.

### **Acknowledgements**

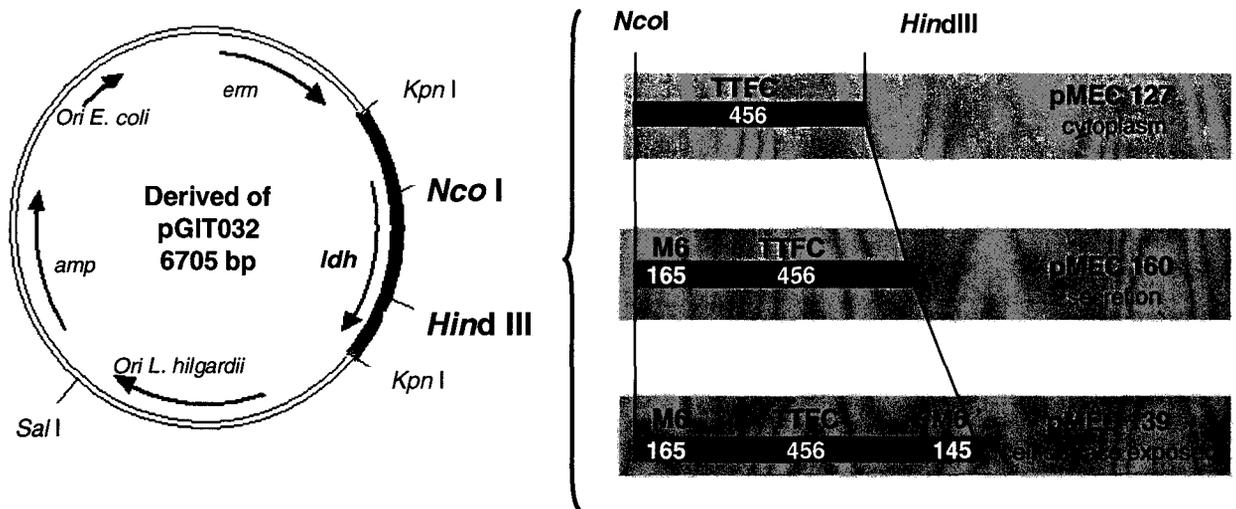
We acknowledge Soledad Boris for helpful discussions and Denise Goudercourt for her excellent technical assistance. This study was supported by the Institut Pasteur de Lille, FEDER funds and the BIO4-CT96-0542 EU grant. N. Reveneau has benefited from a one-year doctoral grant from Nestlé France before holding a grant from the Institut Pasteur de Lille.

---

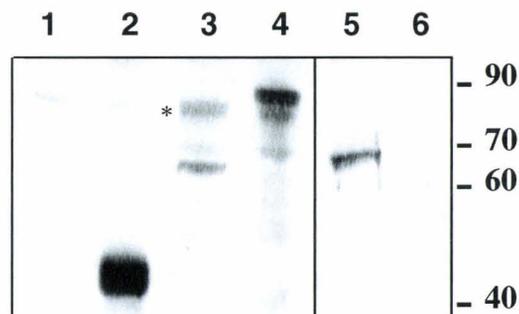
## References

- Beninati, C., Oggioni, M. R., Boccanera, M., Spinosa, M. R., Maggi, T., Conti, S., Magliani, W., De Bernardis, F., Teti, G., Cassone, A., Pozzi, G. & Polonelli, L. (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* **18**, 1060-4.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bron, S., Holsappel, S., Venema, G. & Peeters, B. P. (1991). Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol Gen Genet* **226**, 88-96.
- Bron, S., Meijer, W., Holsappel, S. & Haima, P. (1991). Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **142**, 875-83.
- Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., van Dijk, J. M. & Bron, S. (1996). The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 5235-42.
- Devine, K. M., Hogan, S. T., Higgins, D. G. & McConnell, D. J. (1989). Replication and segregational stability of *Bacillus* plasmid pBAA1. *J Bacteriol* **171**, 1166-72.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. & Piard, J. C. (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **183**, 4157-66.
- Ehrlich, S. D., Bierne, H., d'Alençon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P. & Michel, B. (1993). Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* **135**, 161-6.
- Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P. & Delcour, J. (1994). *Lactobacillus plantarum* ldhL gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol* **176**, 596-601.
- Grangette, C., Muller-Alouf, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M. C., Turneer, M. & Mercenier, A. (2001). Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* **69**, 1547-53.
- Gruss, A. & Ehrlich, S. D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol Rev* **53**, 231-41.
- Hols, P., Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Chabot, P., Delplace, B., Delcour, J. & Mercenier, A. (1997). Efficient secretion of the model antigen M6-gp41E in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Microbiology* **143**, 2733-41.
- Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H. & Mahillon, J. (1990). *Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists of two functional cassettes commonly found in other gram-positive organisms. *J Bacteriol* **172**, 3089-99.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Leenhouts, K., Buist, G. & Kok, J. (1999). Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 367-76.
- Leenhouts, K. J. & Venema, G. (1993). Lactococcal plasmid vectors. In: Plasmids. A practical Approach. K.G. Hardy (ed). Oxford University Press, New York, pp 65-94.
- Lynch, A. S. & Wang, J. C. (1993). Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* **175**, 1645-55.

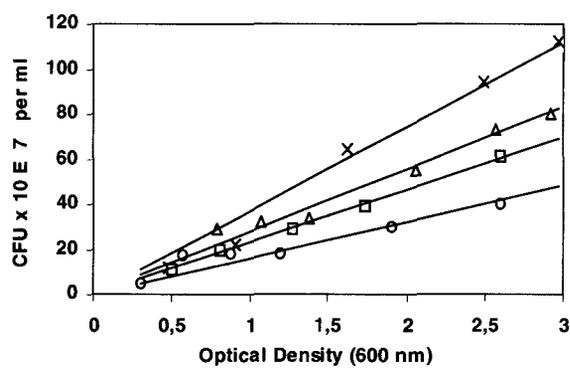
- Medaglini, D., Ricci, S., Maggi, T., Rush, C. M., Manganeli, R., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (1997). Recombinant Gram-positive bacteria as vehicles vaccine antigens. *Biotechnology Annual Review* **3**, 297-312.
- Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, M. R., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (2001). Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* **19**, 1931-9.
- Mercenier, A., Müller-Alouf, H. & Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues in Molecular Biology* **2**, 17-25.
- Norton, P. M., Le Page, R. W. F. & Wells, J. M. (1995). Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol* **40**, 225-30.
- Norton, P. M., Brown, H. W., Wells, J. M., Macpherson, A. M., Wilson, P. W. & Le Page, R. W. (1996). Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**, 167-77.
- Peeters, B. P., de Boer, J. H., Bron, S. & Venema, G. (1988). Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*: effect of direct and inverted repeats. *Mol Gen Genet* **212**, 450-8.
- Piard, J. C., Hautefort, I., Fischetti, V. A., Ehrlich, S. D., Fons, M. & Gruss, A. (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **179**, 3068-72.
- Posno, M., Leer, R. J., Van Luik, K., Van Giesen, N. M. J. F., Heuvelmans, B. C., Lockman, P. T. H. M. & Pouwels, P. H. (1991). Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1822-1828.
- Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J. & Conway, P. L. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol* **41**, 155-67.
- Salminen, S., Isolauri, E. & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 347-58.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shaw, D. M., Gaerthe, B., Leer, R. J., Van Der Stap, J. G., Smittenaar, C., Heijne Den Bak-Glashouwer, M., Thole, J. E., Tielen, F. J., Pouwels, P. H. & Havenith, C. E. (2000). Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing *lactobacilli*. *Immunology* **100**, 510-8.
- Steidler, L., Viaene, J., Fiers, W. & Remaut, E. (1998b). Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A. *Appl Environ Microbiol* **64**, 342-5.
- te Riele, H., Michel, B. & Ehrlich, S. D. (1986). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2541-5.
- te Riele, H., Michel, B. & Ehrlich, S. D. (1986). Are single-stranded circles intermediates in plasmid DNA replication? *Embo J* **5**, 631-7.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Wang, T. T. & Lee, B. H. (1997). Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit Rev Biotechnol* **17**, 227-72.



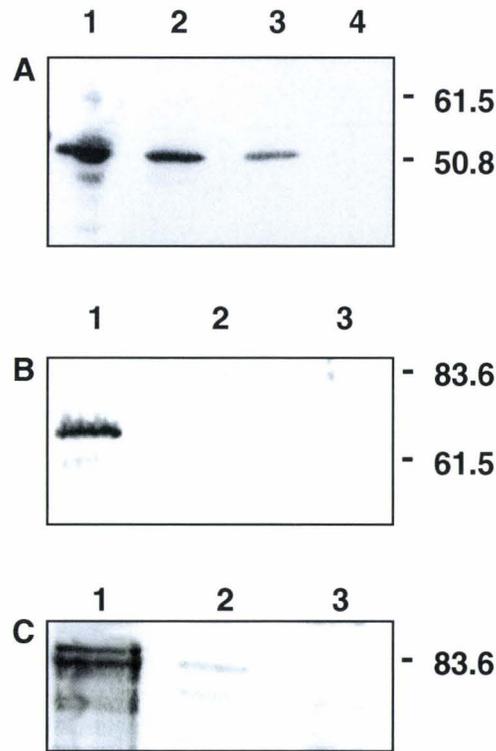
**Figure 1.** Schematic representation of the recombinant plasmids carrying the TTFC coding gene. pMEC160 and pMEC139 were derived from pMEC127 (Reveneau et al., submitted) by replacing the gene encoding TTFC by fusion genes encoding M6::TTFC (pMEC160) and M6::TTFC::M6' (pMEC139) respectively. The number indicated in the box correspond to the number of amino acid résidus in each fragment. *amp* : gène de résistance à l'ampicilline ; *erm* : gène de résistance à l'érythromycine ; *ldh* : gène de la lactate déshydrogénase ; *ori* : origine de réplication.



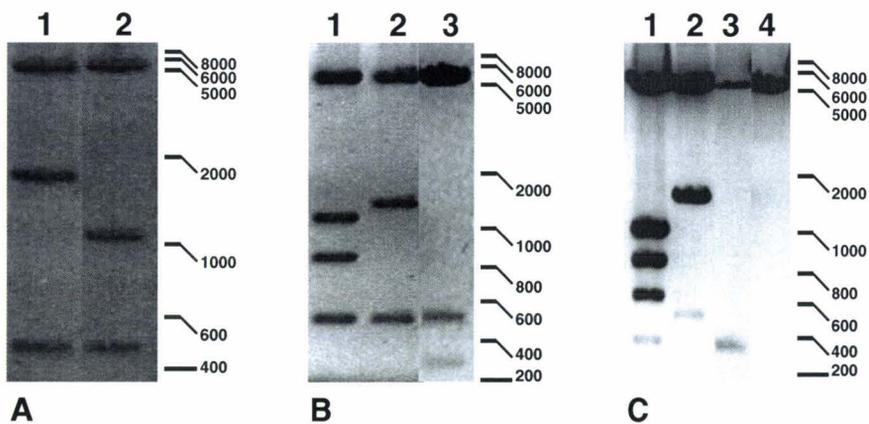
**Figure 2.** TTFC production levels in recombinant *L. plantarum* strains. Lane 1, cell extract of the control strain *L. plantarum* (pGIT032); lane 2, *L. plantarum* (pMEC127); lanes 3 and 5, *L. plantarum* (pMEC160); lane 4, *L. plantarum* (pMEC139); lanes 5 and 6, culture supernatant of *L. plantarum* harboring pMEC160 and pGIT032. The size of the molecular mass markers are given in kDa in the right margin.



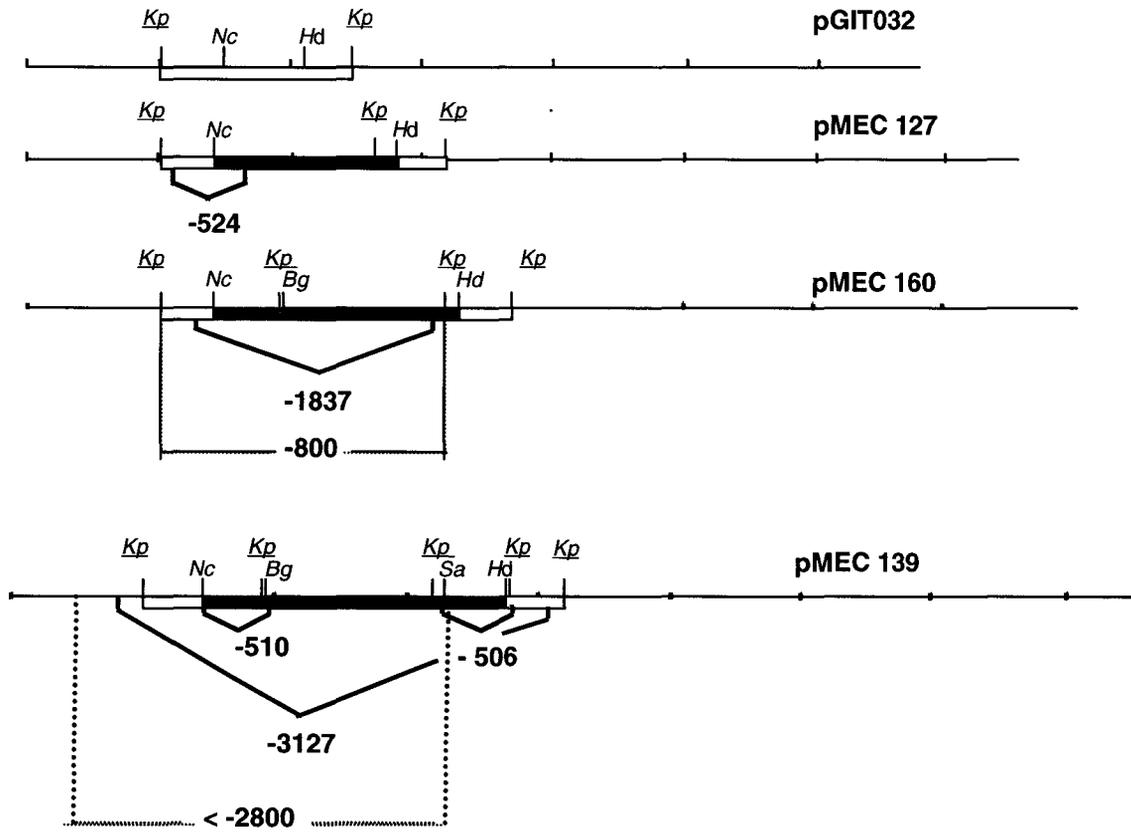
**Figure 3.** Correlation between OD<sub>600nm</sub> and the number of viable cells for the recombinant *L. plantarum* strains harboring pGIT032 (x), pMEC127 (Δ), pMEC160 (□) or pMEC139 (o).



**Figure 4.** TTFC production levels at different steps of the strain propagation protocol controlled by Western blot. **A.** Total extracts of *L. plantarum* (pMEC127) performed at days 1 (lane 1), 5 (lane 2), 6 (lane 3) and 10 (lane 4) of growth under selective conditions. **B.** Culture supernatant of *L. plantarum* (pMEC160) performed at days 1 (lane 1), 2 (lane 2) and 3 (lane 3) of growth under selective conditions. **C.** Total extracts of *L. plantarum* (pMEC139) performed at days 1 (lane 1), 2 (lane 2) and 3 (lane 3) of growth under selective conditions. The size of the molecular mass markers are given in kDa in the right margin.



**Figure 5.** Restriction analysis (base pair) of the rearranged plasmids derived from pMEC127, pMEC160 and pMEC139 after subculturing. **A.** Original pMEC127 (lane 1), plasmid extracted after 6 days of subculturing (lane 2). **B.** Original pMEC160 (lane 1), plasmid extracted after 1 and 2 days of subculturing respectively (lane 2 and 3). **C.** original pMEC139 (lane 1), plasmid extracted after 1 day (lane 2), 2 and 3 days (lanes 3 and 4) of subculturing respectively.



**Figure 6.** Analysis of the deletions (base pair) occurring in pMEC127, pMEC160 and pMEC139 after subcultures. The different deletions were localized on the plasmids by sequencing.

### **C. Etude de l'immunogénicité des souches recombinantes de *L. plantarum* productrices de TTFC dans trois localisation différentes.**

L'analyse *in vitro* présentée dans l'article précédent nous a permis de standardiser au mieux la préparation de l'inoculum pour la comparaison de l'immunogénicité des trois souches recombinantes. Chaque souche a été cultivée directement à partir d'un stock -80°C, sans repiquage intermédiaire pour éviter la perte d'expression du gène d'intérêt. Les bactéries ont été récoltées en début de phase exponentielle de croissance à un nombre de CFU identique pour chaque souche, la dose administrée étant contrôlée pour chaque inoculum par étalement sur milieu sélectif. La production de l'antigène hétérologue a été vérifiée par immunodétection pour chaque souche à chaque inoculation chez l'animal.

Ce travail est présenté dans l'article intitulé : **“Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations”**. Article soumis à *Vaccine*.

**Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations.**

Nathalie Reveneau<sup>1, 2</sup>, Marie-Claude Geoffroy<sup>3</sup>, Camille Locht<sup>2</sup>, Patrice Chagnaud<sup>1</sup> and Annick Mercenier<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes, INSERM IFR17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France
2. Laboratoire de Microbiologie Génétique et Moléculaire, INSERM U447 and IFR17, IBL, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur. Calmette, F-59019 Lille Cedex, France
3. INSERM 411, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, F- 75015, Paris, France

Corresponding author: Dr. Annick Mercenier, Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur. Calmette, B.P. 245, F-59019 Lille Cedex, France

Phone: (+33) 320.87.11.87, Fax: (+33) 320.87.11.58

E-mail: [annick.mercenier@pasteur-lille.fr](mailto:annick.mercenier@pasteur-lille.fr)

## **Abstract**

*Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 was selected as a bacterial carrier for the development of live mucosal vaccines. This strain was reported to display interesting pharmaco-kinetic properties when fed to human volunteers and is also able to persist in the mouse intestine. The non-toxic C fragment of tetanus toxin (TTFC) was used as a model antigen, and recombinant strains producing TTFC in three cellular locations - intracellular, secreted or cell-surface exposed - were constructed. Their immunogenicity was compared after administration to mice through the subcutaneous, intranasal and intragastric routes. The three types of constructs were able to induce strong specific immune responses against TTFC by all routes tested. While cell-surface presentation required lower antigen doses to be immunogenic, the highest IgG serum antibody titers were obtained with the strain producing large amounts of TTFC in the cytoplasm.

**Keywords:** mucosal vaccine, Lactic Acid Bacteria, antigen location

**Abbreviated title:** Local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum*

## 1. Introduction

Most pathogenic microorganisms initiate their infectious cycle at the mucosal surfaces. The respiratory, intestinal and urogenital tracts correspond, in total, to a huge epithelial surface, which needs to be protected against the permanent challenge by invading bacteria, viruses or parasites. Efficient protection against mucosal infections requires the development of new vaccines, which are able to induce protective local immune responses in order to neutralize the pathogen at its infection point [1,2].

In many instances, this necessitates the elicitation of the local production of so-called secretory immunoglobulins A (sIgA) [3]. This can best be achieved by mucosal vaccination, a route, which offers several advantages over the traditional parenteral vaccines [4,5]. However, as the local administration of pure antigens or subunit vaccines is usually rather inefficient, several strategies have been developed to deliver the antigen in an immunogenic and protected form at the targeted mucosa. One promising approach relies on the use of live bacterial vehicles [6]. While most of them were initially derived from attenuated pathogens [7-10], alternative systems based on non-pathogenic gram-positive bacteria have recently been designed [11,12]. The development of lactic acid bacteria as live bacterial carriers has been achieved in different laboratories during the last decade [13-17]. The « Generally Recognized As Safe » (GRAS) status of dietary lactic acid bacteria such as *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* spp. render them particularly attractive as mucosal vaccine vectors. While these two types of bacteria offer common advantages [12], they are presently perceived as leading to potentially different delivery systems. *L. lactis* is a commonly used dairy starter which does not persist in the gastro-intestinal tract of humans or mice [16,18,19] but nevertheless has successfully been used as a « live micro-particle » pre-loaded with antigen [13]. In contrast, the lactobacilli include a wide variety of species some of which being able to persist in the gastro-intestinal or urogenital tract for several days or weeks, respectively [20]. Specific *Lactobacillus* strains are also reputed to exert beneficial health properties and are thus intensively studied for probiotic applications (See [21]). We therefore choose to develop *Lactobacillus plantarum* as a candidate vaccine vehicle. Our model strain, *L. plantarum* NCIMB8826, is an isolate of human origin, which has been demonstrated to be particularly resistant to the conditions of the upper digestive tract in humans. When fed to healthy volunteers it has been shown to survive at much higher rates in the terminal ileum than *L. lactis* [19]. We also observed that it is able to persist in the mouse intestine for more than 4-6 days, while *L. lactis* could not be detected in faeces 24 hours after cessation of the feeding [18]. It has already been demonstrated that both lactococci and lactobacilli producing the non-

toxic C fragment of the tetanus toxin (TTFC) intracellularly are immunogenic by the nasal and intragastric routes [22-25]. In a recent paper, Shaw *et al.* reported that cell surface presentation of TTFC in *L. plantarum* 256, a silage strain, appears to be less efficient than cytoplasmic expression in inducing immune responses [24]. Even though the capacity of lactic acid bacteria to act as efficient antigen carriers has been undoubtedly established, a number of key questions remain to be answered. Among others, it is not yet known whether the cellular location of the foreign antigen is equally important when using persisting rather than non-persisting recombinant strains.

Therefore, we constructed recombinant *L. plantarum* NCIMB8826 strains producing the model antigen TTFC in three cellular locations, i.e. the cytoplasm, the external milieu or anchored to the cell surface. The immunogenicity of the three recombinant strains was analyzed after subcutaneous, intranasal or intra-gastric administration of live bacteria to mice. The highest TTFC-specific immune response was obtained with the recombinant strain synthesizing very high amounts of cytoplasmic antigen. However, the cell-surface associated form of TTFC was found to be intrinsically the most immunogenic.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and growth conditions

*L. plantarum* NCIMB8826 (National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, UK), a lactic acid bacterium isolated from the human saliva [19], was grown at 37°C, without shaking in MRS medium (Difco laboratories, Detroit, Mich. USA).

### 2.2. Plasmids, DNA manipulation and transformation

The plasmids used in this study are listed in Table 1. pMEC127, pMEC160 and pMEC139 were derived from pMEC4 (see below). In all cases, expression of the recombinant genes was controlled by the strong constitutive *ldh* promoter, and the transcriptional termination signals were those of the *ldh* gene. pMEC4 was obtained by inserting a fragment coding for TTFC into pGIT032 [26]. This fragment was obtained by polymerase chain reaction (PCR) using pLET2-TTFC [27] as described by Chagnaud *et al.* (in preparation). pMEC127 (Fig. 1A) was obtained by deleting the 73 base pair (bp) sequence coding for the N-terminus of LDH in pMEC4 in order to place the initiation codon of TTFC at an optimal distance from the *ldh* ribosome binding site (RBS) (see Fig.1B). This was achieved by PCR amplification of a 1460 bp fragment of pMEC4 using the oligonucleotides 5'-

GGCATGCTTGCCATGGAATAAG-3' and 5'-GAGGTGAATTCCCGGGAGAGC-3' as primers including a *Nco*I site and a *Sma*I site (underlined), respectively. This fragment was inserted into the *Sma*I-*Nco*I restriction sites to replace the corresponding fragment of pMEC4. The construction was verified by nucleotide sequencing. pMEC160 and pMEC139 were obtained by replacing the gene encoding TTFC in pMEC127 with chimeric genes coding the hybrid proteins M6::TTFC and M6::TTFC::M6' respectively, where M6 designates the N terminal (165 residues) and M6' the C terminal (145 residues) parts of the M6 protein of *Streptococcus pyogenes*. These fragments were obtained by PCR using pSMB158 [17] as a template and the forward primer 5'-CGCCATGGCTAAAAATAACACGAATAG-3' including a *Nco*I site (underlined) in both cases, with the reverse primers 5'-CCCAAGCTTTTAGCTGTTTGC-3' and 5'-CCCAAGCTTTTAGTTTTCTTC-3' (including a *Hind*III site), for the genes encoding the fusions M6::TTFC and M6::TTFC::M6', respectively (see Table 1).

All DNA manipulations were carried out as described by Sambrook *et al.* [28]. Electroporation of *L. plantarum* was performed according to the method of Josson *et al.* [29], and plasmid DNA was isolated as described by Posno *et al.* [30]. Recombinant *L. plantarum* strains were selected on MRS medium containing 5 µg/ml of erythromycin. The presence and the integrity of the constructions carried by the *L. plantarum* transformants were checked by extraction of plasmid DNA, electroporation into *E. coli* XL1-Blue, DNA extraction from this host followed by restriction analyses and sequencing (data not shown).

### 2.3. Protein extraction and immunoblotting

Total cell protein extracts, cell-wall extracts and culture supernatants were prepared from cells harvested at mid-exponential phase ( $OD_{600} \approx 1.5$ ). A volume corresponding to  $10^9$  colony forming units (CFU) was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C. 1:40 of 1 % sodium deoxycholate (DOC) was added to the supernatant, and the mixture was incubated for 20 min at 4°C. After addition of 1:16 of 100 % Trichloroacetic acid (TCA) and incubation for 5 min at room temperature, the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 20 min, and the pellet was washed once with ice-cold ethanol and resuspended in 1 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8).

The bacteria were washed twice in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) and resuspended in the same buffer to obtain a suspension at  $10^9$  CFU/ml. Total cell extracts were obtained from the bacteria by disruption with a French pressure cell (Bioritech). In order to release protein that might be attached to the cell wall, the bacteria were treated with lysozyme to degrade the cell

surface. The cell wall extracts were obtained by washing the bacteria three times in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 10% w/v sucrose supplemented with 50  $\mu$ l 10 mg/ml lysozyme. After 30 min at 37°C, the suspension was centrifuged for 15 min at 3500 rpm. The supernatant was then treated with 1% DOC and 100% TCA as described above. After a centrifugation for 20 min at 3500 rpm, the pellet was resuspended in 1M Tris-HCl (pH 8). The amounts of total proteins present in the extracts were determined using a Bradford assay [31] with bovin gamma globulin as a standard. Ten microliters (corresponding to about  $10^7$  CFU) of total cell extracts and concentrated supernatant were heated at 100°C for 5 min in Laemmli sample buffer [32] and subjected to 10 % SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane by electroblotting [33]. Immunoblots were developed with rabbit anti-TTFC polyclonal serum diluted at 1:1000 (Innogenetics, Ghent, Belgium) and with AP-linked secondary antibody (Promega, Madison, WI., USA) diluted at 1:7000.

#### 2.4. Immunization

Eight weeks old C57 Bl/6 N Crl BR female mice (Charles River Laboratories, St Aubin-les-Elbeuf, France) were immunized subcutaneously (s.c.), intranasally (i.n.) or intragastrically (i.g.) with a suspension of recombinant *L. plantarum* prepared as follows. Freshly cultured bacteria were harvested at mid-exponential phase ( $OD_{600} \approx 1.5-2$ ) and washed twice with sterile PBS (pH 7.2). The bacterial cell concentrations were adjusted to  $10^{10}$  CFU/ml (sc or ig administration) or  $10^{11}$  CFU/ml (i.n. administration). Plate counts were performed with all inoculum samples to confirm the number of CFU administered to the mice. The antigen production was verified by immunoblotting for each inoculum at each administration.

##### 2.4.1. Subcutaneous immunizations

Groups of five mice were immunized by injection of 100  $\mu$ l of a bacterial suspension containing  $10^9$  CFU at days 1, 15 and 30. Control mice received identical volumes of PBS.

##### 2.4.2. Intranasal immunizations

Groups of eight mice were anesthetized with 100  $\mu$ l of a cocktail containing 20% Imalgene 1000 (Merial, Lyon, France), 0.5 mg of valium per ml (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) and 62.5  $\mu$ g of Atropine per ml (Aguettant Laboratory, Lyon, France) in PBS as described by Grangette *et al.* [25].  $10^9$  CFU suspended in 10  $\mu$ l of PBS were administered into

one nostril of anesthetized mice on two consecutive days. Three administrations (one priming and two boosts) were performed at 3-week-intervals.

#### *2.4.3. Intra-gastric immunizations*

Groups of 8 mice were immunized with  $10^9$  CFU in 100  $\mu$ l of a buffer containing 250 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5% casein and 1% glucose [22]. Three consecutive daily doses of  $10^9$  CFU each were given to the mice 3 times at 3-week-intervals.

#### *2.5. Collection of biological fluids*

Serum samples were taken 7 days after each administration. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were obtained 9 days after the final boost by lavage of the lungs with 0.5 ml of PBS containing the complete protease inhibitor cocktail (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). BAL fluids were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C to remove cells. Sera and BAL fluids were stored at – 20°C until assayed for the presence of specific antibodies. Nine days after the last boost, the intestinal lavages were performed by collecting the small intestine, and washing once in PBS to eliminate traces of blood. The intestine was cut in its length and washed with 1 ml of protease inhibitors in PBS. The lavage was centrifuged for 10 min at 3500 rpm at 4°C and the supernatant was stored at – 20°C until analysis.

#### *2.6. Antibody determinations*

The levels of anti-TTFC antibodies in sera and BAL fluids were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Microtiter plates Immulon I (Dynatech Laboratories, Mc Lean, Va., USA) were coated for 1 hour at 37°C and then overnight at 4°C with 100  $\mu$ l per well of a 2  $\mu$ g/ml solution of recombinant TTFC (rTTFC, Boehringer Mannheim, Germany). rTTFC was diluted in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.5). After one wash with PBS containing 0.1% Tween 20, the plates were blocked with 3% Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma, St Louis, Mo., USA) in PBS for 1 hour at 37°C. Samples were diluted by 2 fold serial dilutions starting from 1:50 (for sera) or 1:2 (for BAL fluids) in PBS containing 1% BSA. The plates were incubated at room temperature for 2 hours and washed three times in PBS containing 0.1% Tween before addition of biotin-labeled goat anti-mouse IgG or IgA (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) diluted in PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween. Anti-mouse IgG was used at a 1 :10000 dilution and anti-mouse IgA at a 1 :2000 dilution. The incubation was performed for 1 hour at room temperature. After 3 washes in PBS containing 0.1% Tween, the streptavidin-

horseradish peroxidase conjugate (Amersham, Buckinghamshire, UK) was added at a 1 :2000 dilution in PBS containing 0.1% Tween for 30 min at room temperature. One mg of *o*-phenylenediamine (Sigma, St Louis, Mo. USA) per ml in 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M Citrate buffer (pH 5.5) containing 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 50 µl of 2 N HCl. The absorbance was measured at 490 nm with an Elx800GUV automated microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vt.). End point titers were defined as the highest dilution that gave an absorbance three times higher than background for serum samples or twice for BAL fluids samples, using the Kc4 program (Kinetic for windows-Bio-tek instruments, Inc, Winooski, Vt.).

### 2.7. Statistical analysis

The results are expressed as the mean +/- SEM. Statistical significance was evaluated by Student *t* test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$  level.

### 2.8. Bacterial enumeration in faeces

Freshly passed faeces were collected 3 hours after oral feeding of live lactobacilli and then every day during 10 days. Samples of each group of mice were pooled. Faecal pellets were weighed and crushed in MRS medium to obtain a suspension at 100 mg/ml. 100 µl of appropriate dilutions were plated onto selective medium, and bacterial colonies were counted after 48 hours incubation at 37°C. The results were expressed as CFU/10 mg of faeces.

## 3. Results

### 3.1. TTFC production by recombinant *L. plantarum*

Three recombinant *L. plantarum* strains were engineered to produce TTFC in the cytoplasm (*L. plantarum* [pMEC127]), in the supernatant (*L. plantarum* [pMEC160]) or on the surface of the bacterium (*L. plantarum* [pMEC139]). This led to a 5 to 10 fold increase in the level of cytoplasmic TTFC synthesized by the corresponding recombinant strain. Cell surface and extracellular production of TTFC were achieved by using the N- and C-terminal ends of M6, a surface protein of *S. pyogenes* [17]. The synthesis of TTFC was examined in the cytoplasm for the three strains and in the supernatant for *L. plantarum* (pMEC160) and in cell-wall preparations for *L. plantarum* (pMEC139). As shown in Fig. 2A, specific immunoreactive proteins were detected in the cell extracts for the three recombinant strains at the expected sizes i.e. 51 kDa, 65 kDa and 80 kDa for *L. plantarum* harboring pMEC127, pMEC160 and pMEC139, respectively. An immunoreactive protein band of the expected size

was also detected in the culture supernatant of *L. plantarum* (pMEC160) (Fig. 2B, lane 1) and in the cell-wall extract of *L. plantarum* (pMEC139) (Fig. 2B, lane 2). TTFC was produced at high levels in the cytoplasm of *L. plantarum* (pMEC127) (Fig. 2A, lane 2), while the levels of TTFC in the supernatant of *L. plantarum* (pMEC160) or cell wall extracts of *L. plantarum* (pMEC139) were significantly lower (Fig. 2B, lanes 2 and 1). No signal was detected in extracts or culture supernatants of the control strain harboring pGIT032 (Fig. 2A, lane 1).

The respective amounts of TTFC synthesized by the three recombinant *L. plantarum* strains were evaluated by scanning immunoblots of relevant cellular fractions (cytoplasm, supernatant or cell wall) corresponding to  $10^7$ ,  $3 \times 10^6$  and  $10^6$  CFU of each strain. The results indicated that the production of TTFC is approximately five times higher in *L. plantarum* (pMEC127) as compared to *L. plantarum* (pMEC139), which in turn synthesizes about four times more TTFC than *L. plantarum* (pMEC160) (data not shown). In addition, the surface association of the chimeric protein in *L. plantarum* (pMEC139) was assessed by flow cytometry using polyclonal TTFC-specific antiserum. It was observed that TTFC was exposed at the cell surface in only a small portion of the bacterial population ( $\geq 15\%$ ).

### 3.2. Immune responses induced by systemic immunization

The immunogenicity of the different recombinant strains was evaluated by s.c. administration of  $10^9$  CFU (at days 1, 5 and 30) to mice. As shown in Fig. 3, high levels of anti-TTFC IgG (end point titers of  $10^4$ - $10^5$ ) were obtained in all groups of mice that had received live TTFC-producing strains. No anti-TTFC antibody response was observed in the groups of mice that had received PBS or the strain not producing TTFC (*L. plantarum* [pGIT032]). After two administrations of *L. plantarum* producing TTFC in the cytoplasm (*L. plantarum* [pMEC127]), the anti-TTFC serum IgG titers were somewhat higher ( $p < 0.05$ ) than after administration of the strains producing TTFC in the extracellular medium (pMEC160) or on the cell surface (pMEC139) (i.e. end point titers of  $6 \times 10^4$  versus  $3 \times 10^4$  and  $2 \times 10^4$ ). The IgG end point titers increased only slightly after the boosts, reaching  $1 \times 10^5$  with *L. plantarum* harboring pMEC127,  $3 \times 10^4$  with *L. plantarum* harboring pMEC160 and  $4 \times 10^4$  with *L. plantarum* harboring pMEC139.

### 3.3. Immune responses induced by i.n. immunization

As the three recombinant *L. plantarum* strains were shown to induce strong immune responses by the s.c. route, their immunogenicity was also tested by i.n. immunization. A

priming and two boosts were performed at 3-week-intervals, and the mice received two consecutive doses (days 0 and 1) of  $10^9$  live bacteria at each administration. After the second boost, high levels of serum anti-TTFC IgG were obtained by intranasal administration of *L. plantarum* (pMEC127), *L. plantarum* (pMEC160) or *L. plantarum* (pMEC139), whereas no anti-TTFC antibodies were observed in the control groups of mice that received PBS or *L. plantarum* (pGIT032) (Fig. 4A). Maximum levels of anti-TTFC antibodies (IgG end point titer of  $4 \times 10^5$ ) were already reached after the first boost when the mice were immunized with *L. plantarum* (pMEC127), and a significant systemic response was already observed after priming (serum IgG end point titer of  $3 \times 10^2$ ). In contrast, significant anti-TTFC serum antibody responses were detected only after the first boost when the mice were immunized with *L. plantarum* (pMEC160) or *L. plantarum* (pMEC139). End-point titers reached levels of  $2 \times 10^4$  and  $6 \times 10^4$ , respectively, after the second boost. After the last boost, the level of anti-TTFC IgG was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in mice that had received *L. plantarum* (pMEC139) than in those that were given *L. plantarum* (pMEC160).

The local response was also studied by measuring the anti-TTFC IgA response in BAL fluids (Fig. 5A). Immunization with *L. plantarum* (pMEC127) led to a significantly higher response (end-point titer of 160) than administration of *L. plantarum* (pMEC160) (end-point titer of 44) or *L. plantarum* (pMEC139) (end-point titer of 85). No response was observed after administration of *L. plantarum* (pGIT032) or PBS.

### 3.4. Immune responses induced by i.g. immunization

We therefore examined whether specific responses against TTFC could be induced in the serum of mice after i.g. administration of each of the TTFC-producing strain described in this paper. As shown in Fig. 4B, this was clearly found to be the case, while no response was elicited in the control group receiving PBS or the control strain (*L. plantarum* [pGIT032]). Notably, anti-TTFC IgG levels were already high (end point titer of  $9 \times 10^2$ ) after the first administration of *L. plantarum* (pMEC127) and reached maximum levels as soon as after the first boost (titer of  $2.5 \times 10^5$ ). In contrast, anti-TTFC antibodies were detected only after the second administration of *L. plantarum* (pMEC160) (titer of  $2 \times 10^2$ ) or *L. plantarum* (pMEC139) (titer of  $1 \times 10^2$ ) and were substantially increased by a second boost leading to IgG titers of  $2 \times 10^3$  and  $1.5 \times 10^3$ , respectively.



Figure 5B shows that anti-TTFC IgA was present in intestinal lavages after administration of *L. plantarum* (pMEC127) or *L. plantarum* (pMEC160). However, no local response was observed after administration of *L. plantarum* (pMEC139).

### 3.5. Intestinal transit time of the recombinant *L. plantarum* strains

Since it is difficult to foresee whether the metabolic burden imposed by the synthesis of heterologous molecules in various cellular locations would impact differently on the individual capacity of the strains to maintain themselves in the intestine, the persistence of each of the recombinant strains was studied by bacterial enumeration in the faeces of mice after intragastric administration (Fig. 6). Bacteria were recovered during 8 days in the faeces after administration of the TTFC-producing *L. plantarum* strains, and the persistence curves were not statistically different ( $p > 0.05$ ) from that obtained with the strain not producing TTFC.

## 4. Discussion

In this study we compared the relative immunogenicity of three recombinant *L. plantarum* strains producing TTFC in the cytoplasm, in the external milieu or on the cell surface, after administration to mice by different routes. In comparison with the previously described expression vector pMEC4 [25], the improved construction described in this paper led to much higher cytoplasmic synthesis of the antigen by the recombinant strain *L. plantarum* (pMEC127). In contrast, secretion in the culture medium by *L. plantarum* (pMEC160) or anchoring to the cell wall in *L. plantarum* (pMEC139) remained notably lower. This has also been reported for other lactic acid bacteria [24,34]. In our hands, essentially similar TTFC-specific IgG serum responses were elicited by subcutaneous administration of the three recombinant *L. plantarum* strains, irrespective of the antigen dose they synthesize or the location of the antigen.

When the three strains were administered i.n. or i.g., *L. plantarum* (pMEC127) performed substantially better than *L. plantarum* (pMEC160) or *L. plantarum* (pMEC139). As estimated by quantitative immunoblot analysis, this difference could be related to varying levels of TTFC production depending on the cellular location of the antigen. The immune responses induced by i.n. or i.g. administration of *L. plantarum* (pMEC127) were very high already after priming and reached maximal levels after a single boost. No statistically significant difference was observed between the i.n. and i.g. routes. This strong immunogenicity most probably results from the high level of cytoplasmic TTFC production in

*L. plantarum* (pMEC127), since similar experiments conducted with the original strain *L. plantarum* (pMEC4) producing substantially lower antigen amounts led to significant antibody titers only after i.n. administration [Grangette *et al.*, in preparation]. These observations are consistent with the fact that *L. plantarum* NCIMB8826 resists quite well the gastric barrier which may limit TTFC release *in vivo* when the antigen is produced intracellularly.

Even though *L. plantarum* (pMEC160) and *L. plantarum* (pMEC139) produced significantly less TTFC (i.e. 20 and 5 times, respectively) compared to *L. plantarum* (pMEC127), they induced high immune responses by the i.n. route. For both strains, serum anti-TTFC IgG end-point titers were approximately one order of magnitude lower than those elicited by the *L. plantarum* (pMEC127) strain after two boosts, and the kinetics of antibody induction were slower. The difference in immunogenicity between the two strains was even more pronounced after immunization by the i.g. route (Fig. 4). However, considering the respective amounts of TTFC synthesized in the three cellular locations, the cell surface associated and secreted forms of TTFC were more immunogenic than the cytoplasmic form of the antigen, as illustrated by the fact that only *L. plantarum* (pMEC127) was immunogenic after oral administration, whereas *L. plantarum* (pMEC4) was not [Grangette *et al.*, in preparation]. This was also reported for *L. lactis* by the s.c. route [34] but contrasts with the results published by Shaw *et al.* [24] who found that cell surface presentation of TTFC in strain *L. plantarum* 256 was inefficient by the i.g. route. Several factors may explain these differences. Successful mucosal immunization requires the delivery of a minimal threshold load of antigen. This dose dependence has clearly been demonstrated for *L. plantarum* NCIMB8826 administered by the i.n. route [25]. It is therefore possible that the recombinant strain described by Shaw *et al.* produces insufficient antigen quantities at the cell surface. Alternatively, intrinsic immunostimulatory properties of strain NCIMB8826, yet to be determined, may differ from those of *L. plantarum* 256, used by Shaw *et al.* [24]. Differences in these properties may perhaps explain why *L. plantarum* 256 producing cytoplasmic TTFC led to only modest antigen-specific IgG levels (i.e.  $10^{2-4}$ ) after i.g. administration [24], whereas anti-TTFC serum titers were very high (i.e.  $2,5 \times 10^5$ ) with *L. plantarum* NCIMB8826 producing high cytoplasmic levels of TTFC (i.e. *L. plantarum* [pMEC127]). In addition, while no major difference is expected by the i.n. route between uptake and processing of gut colonizing or non-colonizing strains, efficient immunization by the i.g. route could be influenced much more importantly by the nature of the bacterial vector used. If persisting strains replicate actively *in vivo*, the induced immune responses might vary as a

result of the antigen location and the nature of the bacterial vehicle itself. Definitive conclusions concerning this point await further experiments such as local immunizations with the three recombinant lactococcal strains mentioned above and controlled comparison between *L. plantarum* NCIMB8826 and *L. plantarum* 256. However, it is to note that Shaw *et al.* [24] also report that mucosal immunization with recombinant *L. casei* strains producing TTFC in the cytoplasm or at the cell surface failed to elicit detectable anti-TTFC immune responses. The authors conclude that several factors, including persistence, may explain the differences found in immunogenicity between the strains they have studied.

We indeed verified whether the persistence time of the three recombinant *L. plantarum* NCIMB8826 strains in the mouse intestine was identical to that of the non-expressor strain. This was found to be the case. Nevertheless, in our hands, it seems that *in vivo* replication of *L. plantarum* NCIMB8826 is unable to compensate totally for the lower antigen dose produced by strains *L. plantarum* (pMEC160) (secretion) and *L. plantarum* (pMEC139) (cell surface), as both strains turned out to be less immunogenic by mucosal routes than the high-expressor strain *L. plantarum* (pMEC127). It is also possible that in these “exposed” locations TTFC is more susceptible to degradation by the intestinal milieu.

In summary, we have shown that lower antigen doses are sufficient to elicit specific serum IgG responses by systemic and mucosal routes when TTFC is exposed to the external milieu of the bacterial carrier. However, several factors such as persistence, *in vivo* genetic stability and replication ability of the recombinant strains, intrinsic adjuvanticity of the bacterial carrier, or immunological and biochemical properties of the protective antigen may all affect the immunogenicity of the host-vector combination by a specific route of administration. As a consequence, in the system described here, the best results (i.e. high serum TTFC-specific IgG and local IgA responses) were reached with the strains producing high intracellular levels of TTFC, by both the i.n. and i.g. routes. However this required optimization of the corresponding expression vectors. Systems to improve cell surface presentation or *in vivo* antigen delivery are presently being developed in the laboratory. In addition, we are pursuing a controlled comparison of lactic acid bacterial carriers with different persisting capacities.

### Acknowledgements

This study was supported by the Institut Pasteur de Lille, FEDER funds and the BIO4-CT96-0542 EU grant. N. Reveneau has benefited from a one-year doctoral grant from Nestlé France before holding a grant from the Institut Pasteur de Lille. We deeply acknowledge the

skilful help of D. Goudercourt, C. Granette and H. Müller-Alouf. We thank G. Pozzi for the gift of pSMB158. Rabbit anti-TTFC antibodies were kindly supplied by E. Sablon, Innogenetics N. V., Ghent, Belgium. We thank M.C. Renaud for her secretarial help.

## References

- 1 Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987; 7: 265-76.
- 2 Mc Ghee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system : from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10: 75-88.
- 3 Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 311-40.
- 4 Michalek SM, Eldridge JH, Curtiss III R, Rosenthal KL. Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In: Ogra PL, Mestecky MD, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego, Academic Press Inc., 1994; 373-90.
- 5 Chen H. Recent advances in mucosal vaccine development. *J Control Release* 2000; 67: 117-28.
- 6 Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 2001; 19: 1573-80.
- 7 Gicquel B. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* 1995; 23: 113-8.
- 8 Guzman CA, Weiss S, Chakraborty T. *Listeria monocytogenes* a promising vaccine carrier to evoke cellular immune responses. In: Wells JM, Pozzi G, editors. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicle for Mucosal Immunization*. Berlin/Georgetown, Springer/Landes Bioscience, 1997; 145-73.
- 9 Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* 1999; 171: 5-26.
- 10 Locht C. Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective antigens. *Pharmaceutical Science and Technology Today. Current trends* 2000; 3: 121-8.
- 11 Stahl S, Samuelson P, Hansson M et al. Development of non-pathogenic *Staphylococci* as vaccine delivery vehicles. In: Pozzi G, Wells JM, editors. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicles for Mucosal Immunization*. Berlin/Georgetown, Springer/Landes Bioscience, 1997; 61-81.
- 12 Wells JM, Pozzi G. An overview of gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. In: Pozzi G, Wells JM, editors. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicles for Mucosal Immunization*. Berlin/Georgetown, Springer/ Landes Bioscience, 1997; 1-8.

- 13 Norton PM, Le Page RWF, Wells JM. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol* 1995; 40: 225-30.
- 14 Medaglini D, Ricci S, Maggi T et al. Recombinant Gram-positive bacteria as vehicles vaccine antigens. *Biotechnology Annual Review* 1997; 3: 297-312.
- 15 Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 155-67.
- 16 Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues in Molecular Biology* 2000; 2: 17-25.
- 17 Medaglini D, Ciabattini A, Spinosa MR et al. Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* 2001; 19: 1931-9.
- 18 Gruzza M, Duval-Iflah Y, Ducluzeau R. Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. *Microb Releases* 1992; 1: 165-71.
- 19 Vesa T, Pochart P, Marteau P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 823-8.
- 20 Mercenier A. Development of lactic acid bacteria as live vectors for oral or local vaccines. *Adv. Food Sci.* 1996; 18: 73-7.
- 21 Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70: 347-58.
- 22 Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RW. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 653-7.
- 23 Maassen CB, Laman JD, den Bak-Glashouwer MJ et al. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 1999; 17: 2117-28.
- 24 Shaw DM, Gaerthe B, Leer RJ et al. Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing *lactobacilli*. *Immunology* 2000; 100: 510-8.

- 
- 25 Grangette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 2001; 69: 1547-53.
  - 26 Ferain T, Garmyn D, Bernard N, Hols P, Delcour J. *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol* 1994; 176: 596-601.
  - 27 Wells JM, Wilson PW, Norton PM, Le Page RW. A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3954-9.
  - 28 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
  - 29 Josson K, Scheirlinck T, Michiels F et al. Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid* 1989; 21: 9-20.
  - 30 Posno M, Leer RJ, Van Luik K et al. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57: 1822-8.
  - 31 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
  - 32 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
  - 33 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4.
  - 34 Norton PM, Brown HW, Wells JM, Macpherson AM, Wilson PW, Le Page RW. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 14: 167-77.

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant features	Expected location of recombinant protein	Reference
pGIT032	pLAB1000 replicon; Ap <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> ; <i>E. coli</i> Ori <sub>pBR322</sub> ; <i>Lactobacillus hilgardii</i> Ori <sub>pLH1</sub> ; <i>KpnI-KpnI</i> fragment coding for LDH of <i>L. plantarum</i> DG301	Cytoplasmic	[26]
pMEC4	pGIT032 with the <i>NcoI-HindIII</i> fragment of <i>ldh</i> replaced by a 1368 bp fragment coding for TTFC, leading to a <i>ldh : :ttfc</i> fusion gene	Cytoplasmic	This work
pMEC127	pMEC4 with a 73 bp deletion of the 5' <i>ldh</i> sequence where translation of TTFC starts at its own initiation codon	Cytoplasmic	This work
pMEC160	pMEC127 where the <i>NcoI-HindIII</i> TTFC encoding fragment was replaced by the genetic fusion coding the chimera M6::TTFC. M6::TTFC comprises the 165 N-terminal residues of M6 including the signal peptide and the full-length gene coding for TTFC including its translation termination codon	Secreted	This work
pMEC139	pMEC127 where the <i>NcoI-HindIII</i> TTFC encoding fragment was replaced by the genetic fusion coding the chimera M6::TTFC::M6'. M6::TTFC::M6' comprises the 165 N-terminal residues of M6 including the signal peptide, the gene coding for TTFC without stop codon and the 145 C-terminal residues of M6 including the anchor sequence (M6')	Cell-surface exposed	This work

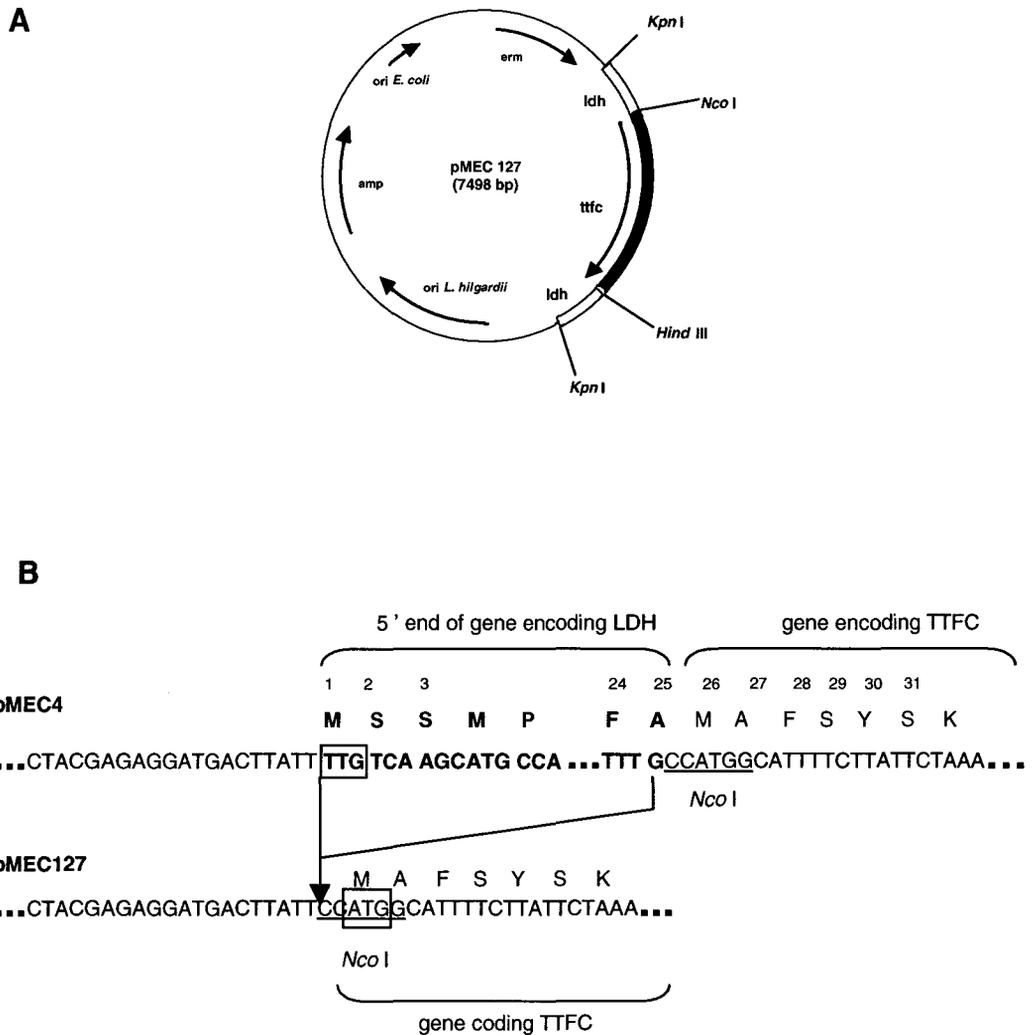


Fig. 1: Structure of pMEC127. (A) Partial restriction map of pMEC127 carrying the gene encoding tetanus toxin fragment C (TTFC) under the control of the *L. plantarum* L-lactate dehydrogenase promoter (*PldhL*).

(B) Deletion of 73 bp of the *ldh* 5' end in pMEC4 to obtain pMEC127. The start (ATG) codon of TTFC in pMEC127 is boxed.

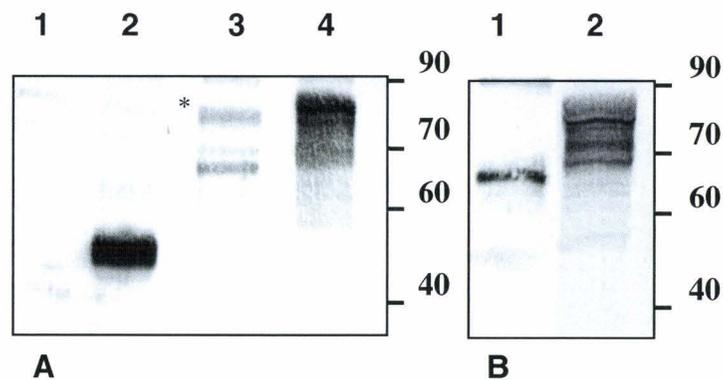


Fig. 2: Production of tetanus toxin fragment C (TTFC) by *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 transformants. (A) Immunoblotting of total cell extracts. Lane 1: *L. plantarum* (pGIT032), lane 2: *L. plantarum* (pMEC127), lane 3: *L. plantarum* (pMEC160), lane 4: *L. plantarum* (pMEC139). Protein extracts corresponding to approximately  $10^7$ cfu of bacteria were immunoblotted and revealed with rabbit polyclonal anti-TTFC serum. The size of the molecular mass markers are given in the right margins. ( \* aspecific band)

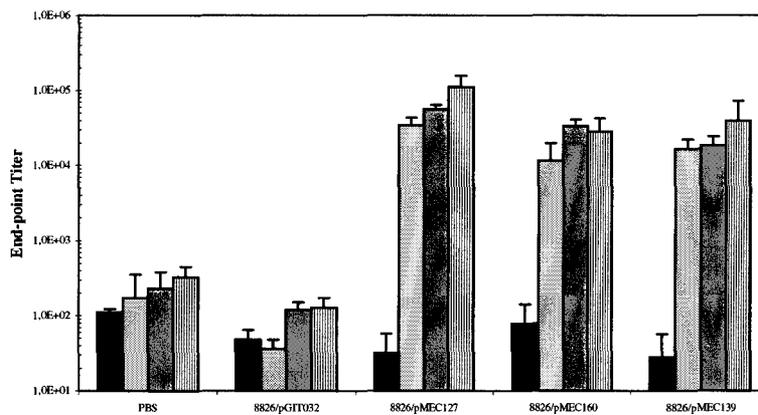


Fig. 3: Anti-TTFC antibody response induced after subcutaneous immunization with recombinant *L. plantarum* NCIMB8826 strains. Groups of five mice were immunized with  $10^9$  CFU of *L. plantarum* (pGIT032) (negative control), *L. plantarum* (pMEC127) (intracellular), *L. plantarum* (pMEC160) (secretion) or *L. plantarum* (pMEC139) (cell surface anchoring). Individual serum were collected from preimmune mice (open bar) and 7 days after each administration: priming (dotted bar), boost 1 (grey bar) and boost 2 (solid bar) and tested by ELISA for TTFC specific IgG. An additional control group of mice received only PBS. Bars represent the mean IgG titer +/- SEM in each group.

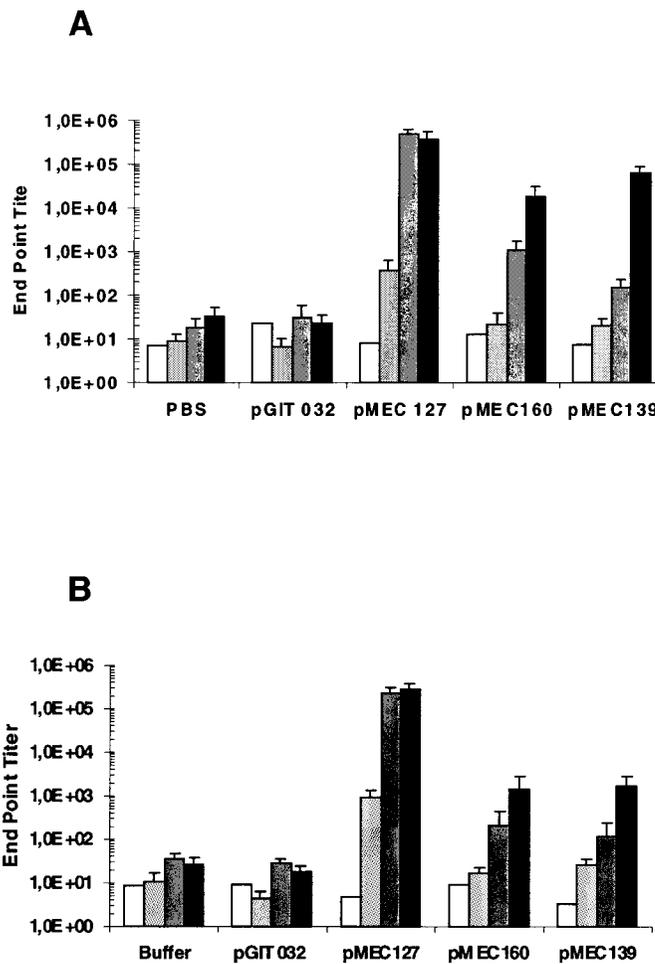
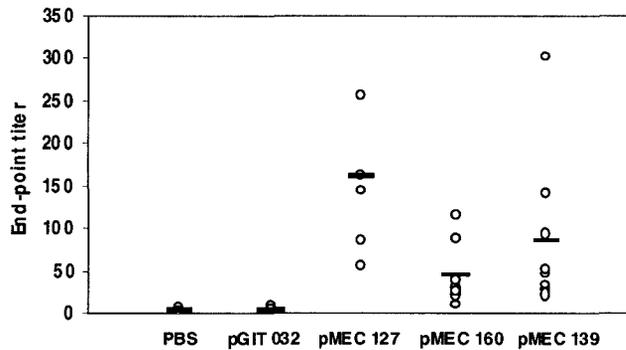


Fig. 4: Anti-TTFC serum IgG titers induced after mucosal immunizations with recombinant *L. plantarum* NCIMB8826 strains. Inocula of  $10^9$  CFU were prepared from cultures collected in mid-exponential phase and administered by intranasal (A) or intragastric (B) route. Groups of 8 mice were immunized with the control strain not producing TTFC (pGIT032), or each of the three TTFC-producing *L. plantarum* strains (pMEC127, pMEC160 or pMEC139). Individual sera were collected from pre-immune mice (open bar) and 7 days after each administration: priming (dotted bar), boost 1 (grey bar) and boost 2 (solid bar). Bars represent the mean IgG titer  $\pm$  SEM in each group.

A



B

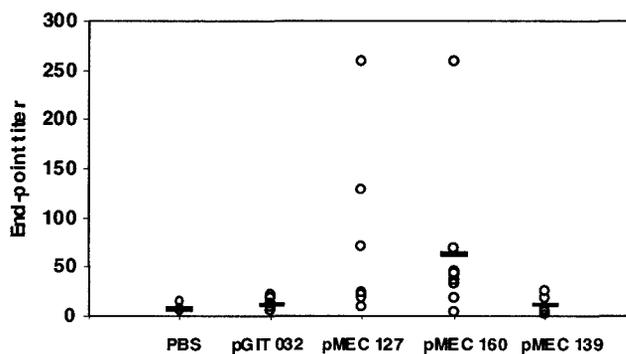


Fig. 5: TTFC-specific local IgA responses in (A) bronchoalveolar lavage (BAL) fluids after intranasal immunization or (B) in intestinal lavages after intragastric immunization. Groups of 8 mice received 2 (intranasal administration) or 3 (intragastric administration) consecutive doses of  $10^9$  cfu, 3 times at 3-week intervals. Mice received  $10^9$  CFU of *L. plantarum* pGIT032 (negative control), pMEC127, pMEC160 or pMEC139. A naïve group received buffer alone. BAL fluids and intestinal lavages were collected 9 days after the final boost. Bars represent the mean IgG titer  $\pm$  SEM in each group.

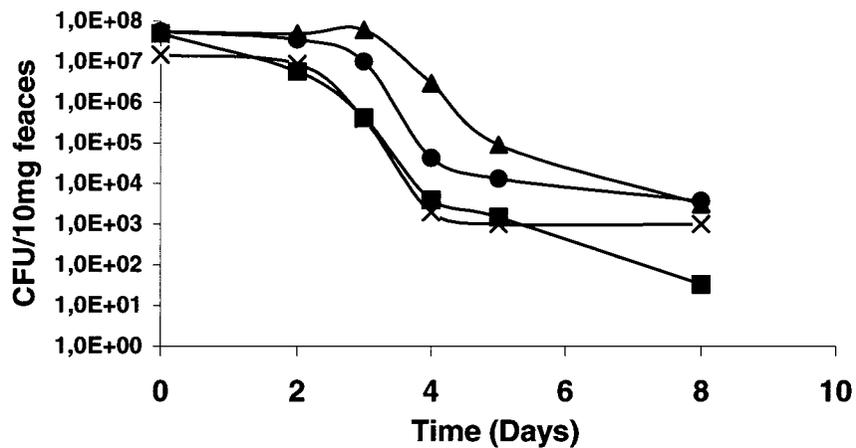


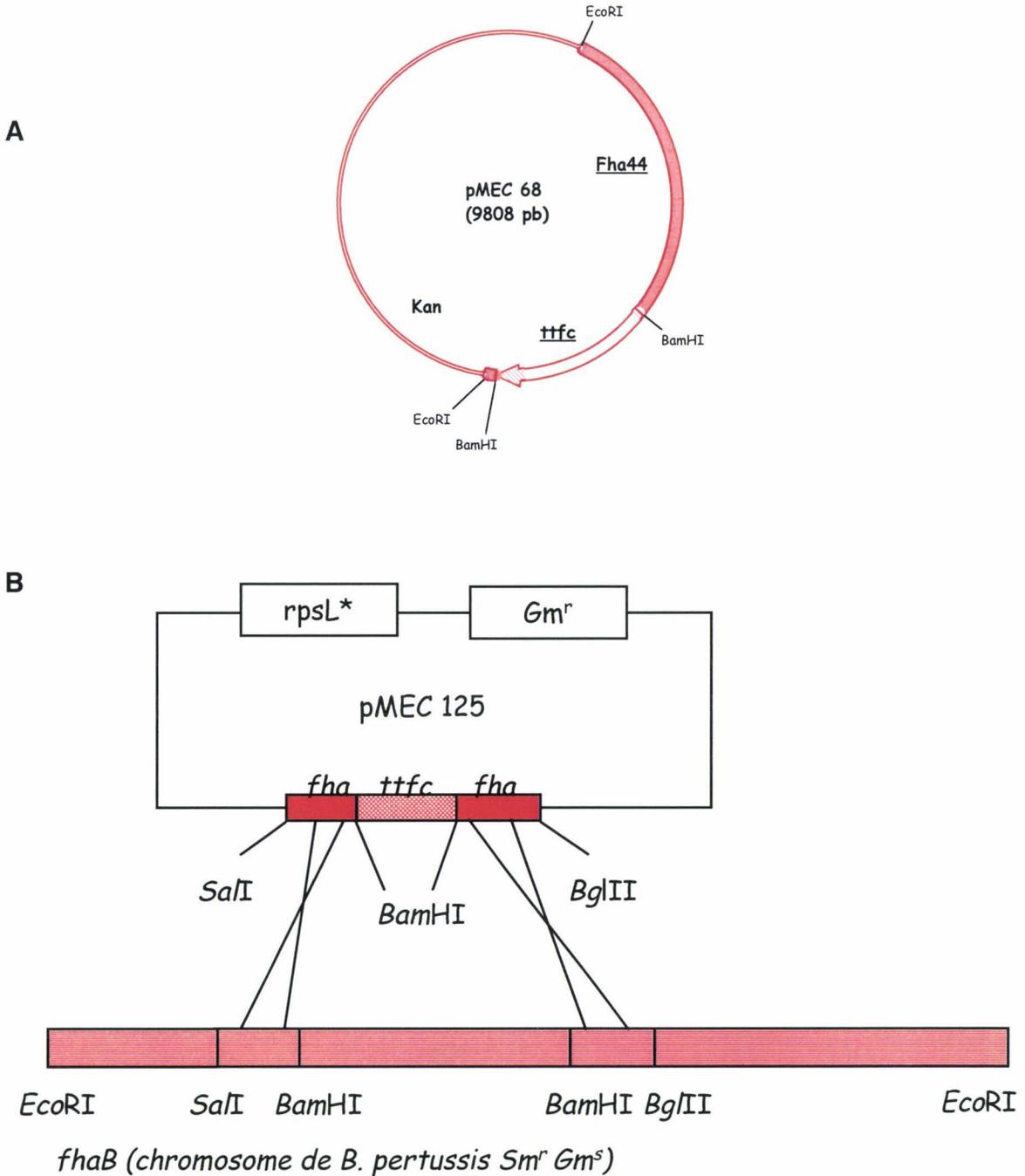
Fig. 6: Persistence of *L. plantarum* recombinant strains in the mouse digestive tract. Groups of 8 mice were fed  $10^9$  CFU of the non-producing strain, *L. plantarum* pGIT032 (open circle), or each of the three TTFC producing strains, *L. plantarum* pMEC127 (closed square), *L. plantarum* pMEC160 (closed circle) or *L. plantarum* pMEC139 (closed triangle). Bacteria were enumerated by plating faecal suspensions on selective media.

*Chapitre II :*

*Sécrétion du fragment C de la toxine tétanique par  
Bordetella pertussis et mesure de l'immunogénicité.*

L'utilisation de *Bordetella pertussis* comme vecteur vivant de vaccination est basée sur l'exploitation des propriétés de son adhésine majeure, l'hémagglutinine filamenteuse ou FHA, afin de sécréter l'antigène choisi. Cette protéine de 230 kDa est produite en grande quantité à la surface de la bactérie et dans le milieu extracellulaire, elle permet à la bactérie d'adhérer à un grand nombre de cellules, elle très immunogénique et possède une activité d'adjuvantité. Sur la base de ces propriétés nous avons choisi d'utiliser un troncat N-terminal de FHA, appelé Fha44, d'une taille de 80 kDa, sécrété en plus grande quantité que FHA. Une fusion génétique contenant le gène codant la TTFC en phase avec le cadre de lecture du gène *fha44* a donc été construite et introduite sur un plasmide répliatif (Figure 11A) ainsi que sur un plasmide suicide (Figure 11B). Ce dernier a permis d'intégrer la fusion génétique au locus *fha* dans le chromosome de la souche sauvage ainsi que dans celui souche atténuée de *B. pertussis*. L'immunogénicité de ces deux souches recombinantes a été testée par administration intranasale chez la souris.

La construction des différentes souches ainsi que l'ensemble des résultats obtenus sont décrits dans l'article intitulé : **“Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*”**. Article accepté dans *Vaccine*.



**Figure 11. A.** Carte du pMEC68. **B.** Schéma d'intégration du gène hybride, codant Fha44::TTFC, dans le chromosome de *B. pertussis*, au locus *fhaB*.

**Fha44** : séquence codant la protéine Fha44 ; **Gm<sup>r</sup>** : résistance à la gentamycine ; **Gm<sup>s</sup>** :sensibilité à la gentamycine ; **Kan** : résistance à la kanamycine ; **rpsL\*** : gène codant un mutant de la protéine ribosomiale S12, conférant la sensibilité à la streptomycine ; **Sm<sup>r</sup>** : résistance à la steptomycine ; **ttfc** : séquence codant la TTFC.



## Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*

Nathalie Reveneau<sup>a,b</sup>, Sylvie Alonso<sup>a</sup>, Françoise Jacob-Dubuisson<sup>a</sup>,  
Annick Mercenier<sup>b</sup>, Camille Locht<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr. Calmette, F-59019 Lille, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Microbiologie des Ecosystèmes, IFR17, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Pr. Calmette, F-59019 Lille, France

Received 23 May 2001; received in revised form 6 August 2001; accepted 21 August 2001

### Abstract

As an alternative to parenteral administration, mucosal administration offers several advantages including the ease of administration, safety and the ability to induce mucosal immunity. As a first step towards nasal administration of important childhood vaccines, we have previously developed attenuated *Bordetella pertussis* strains able to protect mice against pertussis upon nasal vaccination. Since pertussis vaccines are generally combined with tetanus and diphtheria vaccines, we constructed recombinant *B. pertussis* strains producing the non-toxic protective tetanus toxin fragment C (TTFC). TTFC was genetically fused to the N-terminal domain of the *B. pertussis* filamentous haemagglutinin. The hybrid gene was introduced into *B. pertussis* both on a multi-copy replicative plasmid and as a single copy inserted into the chromosome of a pertussis toxin-producing strain and a toxin-deficient attenuated strain. The hybrid protein was secreted by the recombinant strains. However, the recombinant multi-copy plasmid was unstable in vivo, and immunisation could only be carried out with the strains containing the single-copy chromosomal integration. Both the toxin-producing and the toxin-deficient recombinant *B. pertussis* strains were able to prime mice for the production of anti-TTFC serum antibodies upon intranasal administration, suggesting the feasibility of using recombinant attenuated *B. pertussis* for the development of combined childhood vaccines. © 2001 Published by Elsevier Science Ltd.

**Keywords:** Tetanus toxin fragment C; Recombinant *Bordetella pertussis*; Intranasal infection

### 1. Introduction

Mucosal surfaces are the entry sites of most pathogenic micro-organisms responsible for respiratory, digestive or urogenital infections. Therefore, inducing, or at least priming, immune responses at mucosal surfaces seems to be a logical thing to do. Nevertheless, most currently available vaccines are administered by parenteral routes, although mucosal vaccination offers several advantages over parenteral vaccination. Due to the common mucosal immune system, immune cells stimulated at one mucosal surface can disseminate to other mucosal sites [1]. In addition, mucosal immunisation can also induce high systemic immune responses. Mucosal vaccines are easy to administer to large populations, reduce the need for trained personnel and eliminate the risk of contamination through the use of needles required for parenteral vaccination.

\* Corresponding author. Tel.: +33-3-20-87-11-51;  
fax: +33-3-20-87-11-58.  
E-mail address: camille.locht@pasteur-lille.fr (C. Locht).

However, most antigens given by mucosal routes induce at best low immune responses due to their rapid degradation, especially in the gastro-intestinal tract, and due to the induction of mucosal tolerance [2]. Efficient adjuvants are, therefore, needed to enhance the immunogenicity of mucosally delivered antigens. The most powerful mucosal adjuvants studied so far are bacterial enterotoxins, such as cholera toxin or heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* [3]. However, despite considerable efforts to dissociate toxicity from adjuvant activity through site-directed alterations of these toxins, there is still concern about residual toxic activities, especially when these adjuvants are given by the nasal route [4].

The use of live microbial vaccine carriers, especially attenuated pathogens, constitutes an attractive alternative. Many pathogenic micro-organisms are known to colonise mucosal surfaces of the host efficiently and to induce strong immune responses. These properties have been exploited to engineer several bacterial species into potentially useful vaccine carriers for mucosal immunisation (for a review see [5]). Numerous studies using diverse antigens in various animal models have shown that the intranasal route seems to be particularly advantageous [6]. Antigens delivered intranasally

64 avoid the proteolytic and acidic environment of the stom- 89  
 65 ach which is encountered by orally-administered antigens. 90  
 66 The respiratory tract is less colonised by commensal micro- 91  
 67 organisms than the gut, thereby decreasing interference 92  
 68 with vaccine strain up-take through ecological competition. 93

69 However, compared to live vectors adapted for the 94  
 70 gastro-intestinal tract, relatively few vectors have been de- 95  
 71 veloped that are especially adapted for the respiratory tract 96  
 72 [7]. We have recently assessed the potential of *Bordetella* 97  
 73 *pertussis* to be used for the intranasal delivery of protective 98  
 74 antigens. *B. pertussis* is the etiological agent of whooping 99  
 75 cough, is very contagious and has long been known to elicit 100  
 76 both strong humoral [8] and cellular [9] immune responses 101  
 77 in humans. Heterologous antigens have been produced in  
 78 *B. pertussis* using a system in which the *B. pertussis* ad-  
 79 hesin filamentous haemagglutinin (FHA) serves to carry  
 80 the passenger antigens to the bacterial surface [10] or into  
 81 the extracellular milieu [11]. In addition, attenuated strains  
 82 of *B. pertussis*, lacking pertussis toxin, a major virulence  
 83 factor of the pathogen [12], have been found to induce  
 84 strong protection against pertussis when given by the nasal  
 85 route in a single dose [13]. Current efforts in our laboratory  
 86 are devoted to further attenuate *B. pertussis* by altering  
 87 the genes responsible for the production of the other *B.*  
 88 *pertussis* toxins.

Since pertussis vaccines are generally given in combi-  
 nation with at least tetanus and diphtheria vaccines, we  
 wanted to investigate whether a recombinant *B. pertussis*  
 strain could be engineered to express tetanus toxin fragment  
 C (TTFC), the immunogenic, non-toxic portion of tetanus  
 toxin, which constitutes the protective antigen against  
 tetanus. We, therefore, fused TTFC to the secretion deter-  
 minant of FHA as a hybrid protein produced in recombinant  
*B. pertussis*. Here, we show that intranasal administration  
 of this recombinant strain efficiently primes mice for the  
 induction of anti-TTFC serum antibodies when they were  
 subsequently boosted with purified, non-adjuvanted TTFC  
 by the nasal route.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids, growth conditions and  
 DNA manipulations

The bacterial strains and plasmids used in this study  
 are listed in Table 1. All *B. pertussis* strains were grown  
 at 36°C on Bordet Gengou agar [14] supplemented with  
 1% glycerol and 20% defibrinated sheep blood (BG) or  
 in modified Stainer–Scholte medium containing 2,6-O-

Table 1  
 Strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant features	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>B. pertussis</i>		
BPSM	Sm <sup>r</sup> Nal <sup>r</sup> Tohama I derivative	[36]
BPGR4	BPSM derivative; 10 kb <i>EcoRI</i> deletion of <i>fhaB</i>	[28]
BPRA	BPSM derivative; deletion of the gene encoding pertussis toxin	[37]
BPNR23	BPSM derivative with the gene encoding TTFC fused to <i>fha44</i>	This work
BPNR19	BPRA derivative with the gene encoding TTFC fused to <i>fha44</i>	This work
BPSA89	BPSM derivative with <i>fha44</i> instead of <i>fhaB</i>	[Alonso et al., unpublished data]
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	F <sup>'</sup> ::Tn10 <i>proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> delta ( <i>lacZ</i> )M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>thi hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1 lac</i>	Stratagene
MC1061	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> delta( <i>ara-leu</i> )7696 <i>galE15 galK16</i> delta( <i>lac</i> )X74 <i>rpsL</i> (Strr) <i>hsdR2</i> (rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) <i>mcrA mcrB1</i>	ATCC
S17-1	<i>pro, hdsR, res, mod, recA, RP4-2Tc::Mu, Km::Tn7</i>	[21]
<b>Plasmids</b>		
<b>Cloning vectors</b>		
pAS32	2835 bp <i>EcoRI</i> – <i>BamHI</i> and 1075 bp <i>BamHI</i> – <i>BglII</i> fragments of mature FHA gene in pBR328. Ap <sup>r</sup>	[Alonso et al., unpublished data]
pJQ200mp18-rpsI	Suicide vector for <i>B. pertussis</i> . Gm <sup>r</sup>	[38]
pMEC118	1494 bp <i>BamHI</i> – <i>BamHI</i> fragment of pMEC68 coding for TTFC in pAS32. Ap <sup>r</sup>	This work
pMEC125	4106 bp <i>SalI</i> – <i>SalI</i> fragment of pMEC118 in pJQ200mp18-rpsI; suicide vector for <i>B. pertussis</i> . Gm <sup>r</sup>	This work
<b>Expression vectors</b>		
pBG4	2835 bp <i>EcoRI</i> – <i>BamHI</i> fragment containing the 5' end of <i>fhaB</i> ( <i>fha44</i> ) in pBBR122. Kan <sup>r</sup>	[26]
pMEC4	1368 bp <i>NcoI</i> – <i>HindIII</i> fragment coding for TTFC in Pgit032. Ap <sup>r</sup>	[Reveneau et al., unpublished data]
pMEC68	1494 bp <i>BamHI</i> – <i>BamHI</i> fragment coding for TTFC in pBG4, leading to a <i>fha44::ttfC</i> fusion gene. Kan <sup>r</sup>	This work

110 dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin at 1 g/l [15,16]. Antibiotics were  
111 used at the following concentrations: kanamycin, 25  $\mu$ g/ml;  
112 streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; gentamycin, 10  $\mu$ g/ml. Recombi-  
113 nant *E. coli* was selected with kanamycin (25  $\mu$ g/ml),  
114 ampicillin (100  $\mu$ g/ml) or gentamycin (25  $\mu$ g/ml). All DNA  
115 manipulations carried out in *E. coli* XL1-Blue as described  
116 by Sambrook et al. [17].

## 117 2.2. Construction of recombinant *B. pertussis* strains

118 To obtain pMEC68, a 1494 bp fragment coding for  
119 TTFC and terminating with a stop codon was amplified  
120 by PCR from pMEC4 (Table 1) using the oligonucleotides  
121 5'-GCGGATCCGCATTTTCTTATTCTAAAAATCTGG-3'  
122 and 5'-GCGGATCCGGCACCTACTGGTAAAACGG-3',  
123 digested with *Bam*HI and cloned into the *Bam*HI site of  
124 pBG4 (Table 1). This fragment contains 1368 bp corre-  
125 sponding to the TTFC-encoding gene and additional 126 bp  
126 vector-derived DNA at the 3' end of the TTFC-encoding  
127 DNA. The *Bam*HI site of pBG4 is located at the 3' end  
128 of *pha44*. The resulting plasmid, pMEC68, was transferred  
129 by electroporation into *B. pertussis* BPGR4, a strain lack-  
130 ing *phaB*, the structural gene of FHA. The *B. pertussis*  
131 transformants were selected on BG agar medium con-  
132 taining kanamycin and screened by PCR on colonies, as  
133 described in [18]. The presence and the integrity of the  
134 constructs introduced into *B. pertussis* were determined by  
135 retro-electroporation into *E. coli* MC1061 [19], restriction  
136 analyses and DNA sequencing.

137 *B. pertussis* BPNR19 and BPNR23 were obtained by  
138 double homologous recombination as described by Stib-  
139 itz [20]. To construct these strains, the 1846 bp *Bam*HI  
140 fragment of *phaB* in pAS32 was first replaced by the  
141 above described PCR fragment digested with *Bam*HI to  
142 yield pMEC118. A 2835 bp *Sal*I fragment was then iso-  
143 lated from pMEC118 and cloned into the *Sal*I site of  
144 pJQ200mp18-rpsI. The resulting plasmid harboring a frag-  
145 ment coding for TTFC flanked by two regions of *phaB*, was  
146 named pMEC125 and introduced into *E. coli* S17-1 [21].  
147 This strain was then conjugated with *B. pertussis* BPRA  
148 or BPSM to allow for the insertion of the TTFC-encoding  
149 construct into the *phaB* locus. The first recombination event  
150 was selected on BG agar containing gentamycin, and the  
151 second recombination event was selected on streptomycin.  
152 The streptomycin-resistant, gentamycin-sensitive BPRA  
153 and BPSM cells, named BPNR19 and BPNR23, respec-  
154 tively, were screened by immunoblotting for the produc-  
155 tion of a Fha44–TTFC chimera and the absence of the  
156 mature FHA.

## 157 2.3. Protein extraction and immunoblotting

158 For the detection of the Fha44–TTFC hybrid proteins, the  
159 culture supernatants of the *B. pertussis* strains were concen-  
160 trated by precipitation with trichloroacetic acid (6% final  
161 concentration) and 0.4 mM deoxycholate. The amounts of

total proteins present in the extracts were determined using 162  
a Bradford assay [22] with bovin gamma globulin as a stan- 163  
dard, and the proteins were subjected to SDS-PAGE [23] 164  
using a 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred 165  
onto nitrocellulose membranes by electroblotting. The blots 166  
were probed with goat anti-TTFC polyclonal serum diluted 167  
at 1:100 (kindly provided by Innogenetics, Ghent, Bel- 168  
gium) or anti-Fha44 IgY [24] and developed using alkaline 169  
phosphatase-conjugated secondary antibodies (Promega, 170  
Madison, WI, USA) diluted at 1:7000 or 1:5000. 171

## 172 2.4. *B. pertussis* colonization of the mouse respiratory tract

173 The *B. pertussis* strains were grown for 48 h at 37°C 173  
on BG agar supplemented with streptomycin. The bacteria 174  
were then scraped off the plates and resuspended at 2.5  $\times$  175  
10<sup>8</sup> CFU/ml in sterile phosphate-buffer saline (PBS). Groups 176  
of 24, 4-week-old OF1 mice (Iffa Credo, L'Arbesle, France) 177  
were anaesthetised with 100  $\mu$ l of a cocktail [25] containing 178  
20% Imalgene 1000 (Merial, Lyon, France), 0.5 mg of val- 179  
ium per ml (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) and 62.5  $\mu$ g 180  
of atropine per ml (Aguettant Laboratory, France) in PBS. 181  
Bacterial suspension (20  $\mu$ l) (corresponding to 5  $\times$  10<sup>6</sup> CFU) 182  
was then instilled into the nostrils of the mice. Infected mice 183  
were sacrificed by cervical dislocation 3 h after intranasal 184  
infection or at the indicated time points. Four mice were 185  
analysed per time point. The lungs of the sacrificed mice 186  
were removed aseptically and homogenised individually in 187  
PBS as described in [10]. Serial dilutions of the lung ho- 188  
mogenates were then plated onto BG agar supplemented 189  
with streptomycin, and CFUs were counted after 3–5 days 190  
of incubation at 37°C. 191

## 192 2.5. Serum antibody determination

193 Serum samples were taken by retro-orbital plexus punc- 193  
ture and were stored at –20°C until assayed for the pres- 194  
ence of specific antibodies. Bronchoalveolar lavage fluids 195  
were harvested as described in [10]. The levels of Fha44- 196  
and TTFC-specific antibodies in sera and bronchoalveolar 197  
lavage fluids were determined by enzyme-linked immunoab- 198  
sorbent assays (ELISAs). Microtiter plates Immulon III (Dy- 199  
natech Laboratories, Mclean, VA, USA) were coated for 200  
1 h at 37°C with 100  $\mu$ l per well of 2  $\mu$ g/ml recombinant 201  
TTFC (rTTFC, Boehringer Mannheim, Germany) and then 202  
incubated overnight at 4°C. rTTFC was diluted in 0.1 M 203  
carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.5). After one wash with 204  
PBS containing 0.1% Tween 20, the plates were incubated 205  
with 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, 206  
MO, USA) in PBS for 1 h at 37°C. Samples were diluted 207  
by two-fold serial dilution starting from 1:50 (for sera) or 208  
1:2 (for bronchoalveolar lavage fluids) in PBS containing 209  
1% BSA. The plates were then incubated at room temper- 210  
ature for 2 h and washed three times with PBS contain- 211  
ing 0.1% Tween before the addition of biotin-labelled goat 212  
anti-mouse IgG (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, 213

214 USA) diluted in PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween.  
 215 Anti-mouse IgG was used at a 1:10,000 dilution. After incu-  
 216 bation for 1 h at room temperature and three washes in PBS  
 217 containing 0.1% Tween, the streptavidin–horseradish per-  
 218 oxidase conjugate (Amersham, Buckinghamshire, UK) was  
 219 added at a 1:2000 dilution in PBS containing 0.1% Tween  
 220 for 30 min at room temperature. An amount of 100 µl of  
 221 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citrate buffer (pH 5.5) containing  
 222 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 mg/ml of *o*-phenylenediamine (Sigma, St.  
 223 Louis, MO, USA) was added to each well, and the plates  
 224 were incubated at 37°C for 30 min. The reaction was stopped  
 225 by the addition of 50 µl of 2N HCl. The absorbance was mea-  
 226 sured at 490 nm with an Elx800GUV automated microplate  
 227 reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Vinooski, VT). End-point  
 228 titers were defined as the highest dilution that gave an ab-  
 229 sorbency three times higher than background for serum sam-  
 230 ples, using the Kc4 program (Kinetical for windows-Bio-Tek  
 231 Instruments, Inc., Vinooski, VT). The results are expressed  
 232 as means ± S.E.M. The levels of anti-Fha44 antibodies were  
 233 determined by ELISA using purified Fha44, as described by  
 234 Alonso et al. [unpublished results].

235 **3. Results**

236 *3.1. Expression of the chimeric fha44–ttfC gene in B.*  
 237 *pertussis*

238 To express the *ttfC* gene in *B. pertussis*, the export ma-  
 239 chinery of FHA was used in order to produce the recom-  
 240 binant protein in a secreted form. Since Fha44, an 80 kDa  
 241 N-terminal fragment of FHA, contains the complete secre-  
 242 tion determinant and is even better secreted by *B. pertus-*  
 243 *sis* than full-length FHA [26], TTFC was fused to Fha44 in  
 244 *B. pertussis* BPGR4(pMEC68). The genetic construct con-  
 245 tained the sequence coding for the 792 first amino acids of  
 246 FHA followed by the sequence encoding the 456 residues of  
 247 TTFC and the termination codon (Fig. 1). This construct  
 248 was engineered into a replicative plasmid, based on the pBBR1  
 249 replicon [27], which was then introduced into *B. pertussis*  
 250 BPGR4, a strain from which the chromosomal *fhaB* gene  
 251 had been deleted [28].

252 The recombinant bacteria were grown to late exponen-  
 253 tial phase, and 20-fold concentrated culture supernatants  
 254 were analysed by immunoblotting using anti-Fha44 and  
 255 anti-TTFC polyclonal antibodies. As shown in Fig. 2,  
 256 the anti-TTFC antibodies reacted with an approximately  
 257 85 kDa protein (Fig. 2B, lane 4), not present in the cul-  
 258 ture supernatants of non-recombinant *B. pertussis* (not  
 259 shown) or *B. pertussis* BPGR4(pBG4) which produces  
 260 Fha44 (Fig. 2B, lane 3). The anti-Fha44 antibodies  
 261 recognise several proteins in the supernatants of both  
 262 BPGR4(pBG4) and BPGR4(pMEC68). The two major  
 263 bands detected by the anti-Fha44 antibodies in the super-  
 264 natants of the BPGR4(pBG4) cultures were also detected  
 265 in the BPGR4(pMEC68) culture supernatants (Fig. 2A).

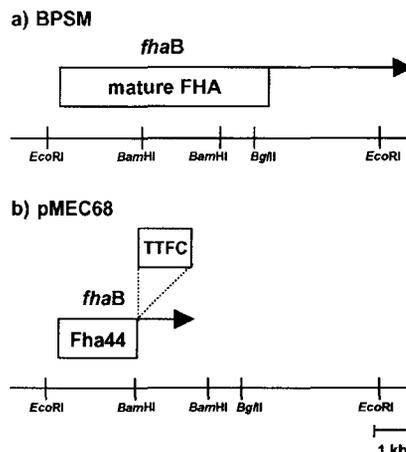


Fig. 1. Physical map of the *fhaB* locus in BPSM and in BPGR4(pMEC68). The arrows represent the lengths and directions of the open reading frames. The relevant restriction sites of this locus are shown in the top line. (a) BPSM contains the wild-type *fhaB* locus coding for a 370 kDa precursor protein that includes the 230 kDa portion of the mature form indicated by the open box. (b) pMEC68 contains the hybrid gene encoding Fha44–TTFC, as indicated by the open boxes labelled Fha44 and TTFC, respectively.

266 The band at 65 kDa corresponds to a typical breakdown  
 267 product of Fha44 [26]. In addition, the BPGR4(pMEC68)  
 268 supernatant also contained a 85 kDa protein recognised by  
 269 the anti-Fha44 antibodies (Fig. 2A, lane 2). This protein  
 270 corresponds to that recognised by the anti-TTFC antibod-  
 271 ies (Fig. 2B, lane 4), indicating that BPGR4(pMEC68)  
 272 produced and secreted a chimeric protein containing both  
 273 Fha44 and TTFC epitopes. However, the apparent size of  
 274 the 85 kDa chimera was smaller than expected (130 kDa),  
 275 indicating that the protein had undergone proteolytic break-  
 276 down. Since the two lower anti-Fha44 reactive bands were  
 277 not recognised by the anti-TTFC antibodies, they most  
 278 likely correspond to molecules that had lost the TTFC part.  
 279 In contrast, the upper, 85 kDa band was recognised by both

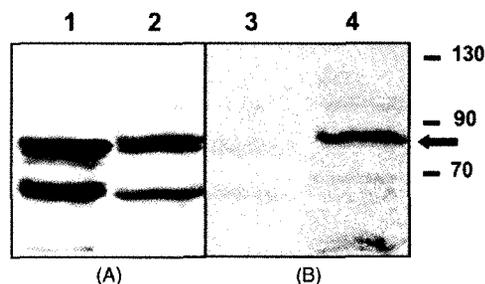


Fig. 2. Immunoblot analysis of the Fha44–TTfC chimera produced by *B. pertussis* containing pMEC68. Concentrated culture supernatants of BPGR4(pBG4) (lanes 1 and 3) or BPGR4(pMEC68) (lanes 2 and 4) were analysed by 10% SDS-PAGE and immunoblotting using anti-Fha44 IgY (A) or anti-TTFC polyclonal antiserum (B). Approximately 20 µg of total protein was loaded in each lane. The sizes of the molecular mass markers are given in kDa in the right margin.

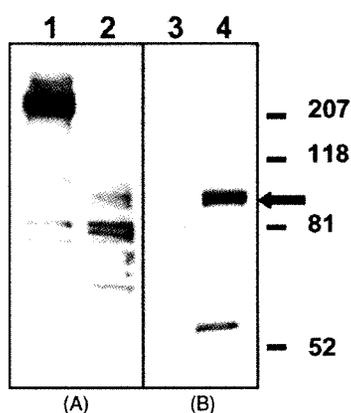
280 anti-Fha44 and anti-TTFC antibodies, indicating that the  
 281 protein corresponding to that band was truncated at either  
 282 or both sides. Occasionally, additional smaller anti-TTFC  
 283 reactive proteins could be detected in the BPGR4(pMEC68)  
 284 culture supernatants (not shown), confirming proteolytic  
 285 cleavage.

286 Together, these results indicate that Fha44 can be used to  
 287 carry heterologous proteins such as TTFC into the culture  
 288 supernatants. However, upon intranasal infection, recombinant  
 289 pBBR1 derivatives are rapidly lost, and therefore, the  
 290 immune response against Fha44 and TTFC could not be de-  
 291 termined after infection with the recombinant *B. pertussis*  
 292 strain. To stabilise the genetic constructs, they were, thus, in-  
 293 serted into the chromosome by homologous recombination  
 294 at the *fhaB* locus, yielding strains BPNR19 and BPNR23.  
 295 These two strains differ from each other by the production  
 296 of pertussis toxin, as BPNR19 was derived from a pertussis  
 297 toxin-deficient strain, whereas BPNR23 was derived from a  
 298 toxin-producing wild-type strain.

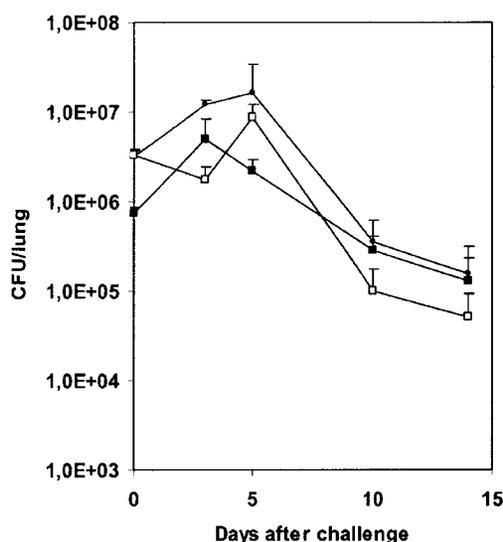
299 Immunoblot analyses of the two strains indicated that  
 300 both BPNR19 (Fig. 3) and BPNR23 (not shown) produced  
 301 and secreted proteins recognised by the anti-Fha44 anti-  
 302 bodies (Fig. 3A, lane 2), and that the supernatants of both  
 303 strains contained a 85 kDa major protein recognised by the  
 304 anti-TTFC antibodies (Fig. 3B, lane 4). However, as in the  
 305 case of BPGR4(pMEC68) an anti-TTFC antibody reactive  
 306 protein of the expected size (130 kDa) could not be detected.

307 3.2. Lung colonisation by recombinant *B. pertussis*

308 To study the ability of BPNR23 and BPNR19 to colonise  
 309 the respiratory tract, OF1 mice were infected intranasally  
 310 with a suspension containing  $5 \times 10^6$  CFU of either strain or  
 311 of BPSA89, a strain producing Fha44 instead of FHA. The



312 Fig. 3. Immunoblot analysis of the Fha44–TTFC chimera produced by  
 313 *B. pertussis* BPNR19. Concentrated culture supernatants of BPNR19 (lanes  
 314 1 and 3) or BPNR19 (lanes 2 and 4) were analysed by 10% SDS-PAGE  
 315 and immunoblotting using anti-Fha44 IgY (A) or anti-TTFC polyclonal  
 316 antiserum (B). Approximately 20 µg of total protein was loaded in each  
 317 lane. The sizes of the molecular mass markers are given in kDa in the  
 318 right margin.



319 Fig. 4. Colonisation by *B. pertussis*. OF1 mice were infected intranasally  
 320 with  $5 \times 10^6$  CFU of *B. pertussis* BPNR23 (solid circles), BPNR19 (open  
 321 squares) and BPSA89 (solid squares). The lungs were harvested at in-  
 322 dicated time points, and total CFUs were counted after plating serial  
 323 dilutions of the lung homogenates onto BG agar.

324 total CFUs in the lung homogenates were measured 3 h, and  
 325 3, 5, 10 and 14 days after infection. As shown in Fig. 4, the  
 326 number of CFUs in the lungs of mice infected with BPNR23  
 327 or BPNR19 increased during the first 5 days and decreased  
 328 slowly over the next 10 days.

329 3.3. TTFC-specific priming after infection with  
 330 recombinant *B. pertussis*

331 Mice were infected by the nasal route with  $5 \times 10^6$  CFU  
 332 of BPNR19, BPNR23 or BPSA89. Control mice received  
 333 20 µl PBS by the nasal route. Three months later, the mice  
 334 received a second identical administration. After an addi-  
 335 tional 3 months, the mice were boosted intranasally with  
 336 2 µg of purified TTFC. Anti-Fha44 and anti-TTFC antibod-  
 337 ies in sera were measured over time, after the first and sec-  
 338 ond administrations and after the boost with purified TTFC.  
 339 No anti-Fha44 IgG response was detected in mice infected  
 340 with either *B. pertussis* strain, neither before nor after the  
 341 TTFC boost (data not shown).

342 No anti-TTFC antibodies were detected in mice infected  
 343 with BPSA89 with or without TTFC boost, nor in the control  
 344 mice that had received PBS and were subsequently  
 345 boosted with TTFC (Fig. 5). In contrast, significant amounts  
 346 of anti-TTFC antibodies were detected in the sera of mice  
 347 that were primed with either BPNR19 or BPNR23 and  
 348 subsequently boosted with TTFC. These antibodies were  
 349 only detected after the TTFC boost, indicating that neither  
 350 BPNR19, nor BPNR23 induced a detectable primary re-  
 351 sponse, but that both were able to efficiently prime the mice  
 352 by the nasal route. The mice primed with BPNR23 pro-

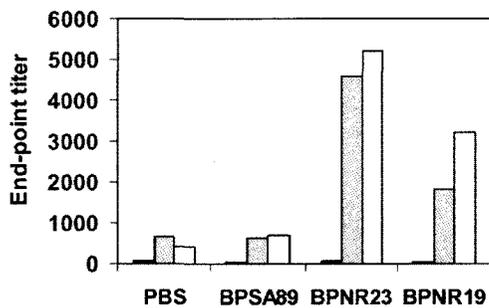


Fig. 5. Serum anti-TTFC antibody responses following intranasal administration with recombinant *B. pertussis* and intranasal boost with TTFC. OF1 mice were infected intranasally with  $5 \times 10^6$  CFU of *B. pertussis* BPNR23, BPNR19 or BPSA89. Control mice received PBS. Three months later, the mice received a second identical administration. Each group was intranasally boosted with 2  $\mu$ g of purified TTFC. Sera of five mice in each group were collected 1 week after the second administration (solid bars), and 1 (grey bars) and 2 weeks (white bars) after TTFC boost and pooled before antibody detection.

341 duced a slightly higher anti-TTFC antibody response than  
 342 mice infected with BPNR19, indicating that, in contrast to  
 343 previous studies using full-length FHA instead of Fha44 to  
 344 display heterologous antigens [13], the presence of pertus-  
 345 sis toxin did not appear to diminish the immune response  
 346 upon infection with the recombinant *B. pertussis*. None  
 347 of the mice produced detectable anti-TTFC or anti-Fha44  
 348 antibodies in the bronchoalveolar lavage fluids.

349 **4. Discussion**

350 Childhood vaccination would benefit tremendously from  
 351 the possibility to immunise mucosally. It would certainly in-  
 352 crease the compliance, because non-invasive immunisation  
 353 is less painful than injection and because it is associated with  
 354 less risk of contamination occasionally encountered through  
 355 the use of needles. In addition, the ease of mucosal vac-  
 356 cination over parenteral immunisation makes it less depen-  
 357 dent on trained medical personnel. One of the most widely  
 358 used childhood vaccines is the diphtheria–tetanus–pertussis  
 359 (DTP) vaccine. Full immunisation against these three dis-  
 360 eases requires several vaccine doses and boosters. In addi-  
 361 tion, this vaccine has met with typical problems of compli-  
 362 ance over the last 20 years.

363 In order to address some of these problems, we have ini-  
 364 tiated efforts to develop novel DTP vaccines that can be  
 365 administered by the nasal route. This approach is based on  
 366 the use of live attenuated *B. pertussis* that we have previ-  
 367 ously shown to provide protection against challenge after a  
 368 single intranasal administration [13]. As an initial attempt  
 369 to add the tetanus valence to the attenuated live pertussis  
 370 vaccine, we evaluated here the potential of the N-terminal  
 371 80 kDa fragment of FHA, named Fha44, to target TTFC into  
 372 the supernatant of *B. pertussis*, in order to induce an im-

373 mune response against TTFC after intranasal administration  
 374 of the recombinant *B. pertussis* strain. Although infection  
 375 with the recombinant strain did not induce detectable titers  
 376 of anti-TTFC antibodies in the serum, it was able to prime  
 377 mice for a serum response against TTFC after an intranasal  
 378 boost with the purified protein.

379 Since vaccination should at least induce priming, such  
 380 that a secondary immune response is rapidly mounted as  
 381 soon as the actual pathogen is encountered, these results  
 382 constitute a promising first step towards the development  
 383 of a novel nasal DTP vaccine. However, since tetanus toxin  
 384 is in itself a potent antigen, there is certainly room for im-  
 385 provement. Compared to other antigens [11], the fusion of  
 386 TTFC to Fha44 resulted in rather low levels of extracellular  
 387 TTFC production, especially when the hybrid gene was in-  
 388 troduced as a single copy into the *B. pertussis* chromosome.  
 389 The level of expression was somewhat higher when the hy-  
 390 brid gene was expressed from a multi-copy plasmid, such  
 391 as pMEC68. However, due to instabilities of this plasmid  
 392 in the absence of selective pressure, the immune response  
 393 against TTFC could not be assessed after immunisation  
 394 with a *B. pertussis* strain containing pMEC68. In addition  
 395 to low levels of expression, the chimeric Fha44–TTFC  
 396 protein was rather unstable as it was secreted into the cul-  
 397 ture supernatant. Whether the hybrid gene was expressed  
 398 from a multi-copy plasmid or from a single copy in the  
 399 chromosome, most of the anti-TTFC reactive proteins  
 400 were smaller than expected from the calculated molecular  
 401 weight.

402 It is possible that some of these problems are related to  
 403 the mechanism of secretion by the FHA secretory machin-  
 404 ery. Although proteins larger than TTFC have been effi-  
 405 ciently secreted through the FHA secretion pathway [11],  
 406 and the size may, thus, not be a problem, proteins contain-  
 407 ing disulfide bonds have recently been shown to be difficult  
 408 to secrete [29]. The FHA secretion mechanism requires an  
 409 outer membrane accessory protein named FhaC [30], which  
 410 is believed to form pores in the outer membrane allowing  
 411 the secretory protein to reach the outer surface of *B. per-  
 412 tussis* [31]. However, secretion of FHA through FhaC most  
 413 likely occurs in an extended conformation, and the addi-  
 414 tion of a globular domain, such as the B subunit of cholera  
 415 toxin, to Fha44 hampers secretion [29]. Disruption of the  
 416 cholera toxin B subunit disulfide bond improved secretion.  
 417 It is, therefore, clear that the globular structure of TTFC [32]  
 418 containing several cysteines, some of which being involved  
 419 in disulfide bond formation, strongly interferes with secre-  
 420 tion. The mutational alterations of the cysteines in TTFC or  
 421 the use of *B. pertussis dsbA* mutants deficient in their abil-  
 422 ity to catalyse disulfide bonds may improve the secretion of  
 423 the Fha44–TTFC chimera, but will most likely destroy the  
 424 protective epitopes of TTFC. Future research will, therefore,  
 425 be directed towards the identification of alternative ways to  
 426 produce TTFC in attenuated *B. pertussis*, hoping that higher  
 427 levels of production will lead to stronger immune responses  
 428 after intranasal administration.

429 The absence of serum antibodies against TTFC after a  
 430 primary immunisation with the recombinant *B. pertussis*  
 431 strain is reminiscent of previous results obtained with a  
 432 recombinant *B. pertussis* strain producing the *Schistosoma*  
 433 *mansonii* Sm28GST antigen fused to FHA [10]. Similar to  
 434 the results described here, intranasal administration with  
 435 Sm28GST-producing *B. pertussis* did not induce serum  
 436 antibodies against the passenger protein, but was able to  
 437 prime mice against the foreign antigen [33]. However,  
 438 in contrast to what is observed here, the deletion of the  
 439 pertussis toxin gene from the Sm28GST-producing *B. per-*  
 440 *tussis* increased the immunogenicity of the foreign antigen  
 441 to an extent that a single intranasal immunisation with  
 442 the attenuated recombinant *B. pertussis* strain resulted in  
 443 high levels of serum antibodies against Sm28GST and  
 444 in protection against parasite challenge [13]. Deletion of  
 445 the pertussis toxin gene from the TTFC-producing *B. per-*  
 446 *tussis* strain did not result in a detectable increase in the  
 447 anti-TTFC immune response. One important difference  
 448 between the two types of constructs lies in the carrier pro-  
 449 tein. Whereas Sm28GST was fused to full-length FHA,  
 450 TTFC was fused to Fha44, the truncated N-terminal por-  
 451 tion of FHA. Although Fha44 contains the entire secretion  
 452 determinant and is secreted even better than full-length  
 453 FHA [26], important functional sites present in FHA are  
 454 missing in Fha44 [34]. It is possible that some of these  
 455 functional sites are involved in the immunogenicity of  
 456 FHA and proteins fused to FHA, although at present it is  
 457 difficult to speculate which additional structure of FHA  
 458 might be responsible for the difference in immunogenicity  
 459 of the passenger protein. We have previously described  
 460 that full-length FHA expresses adjuvant activity for anti-  
 461 gens that are co-delivered with it by the intranasal route  
 462 [35]. In addition, we found recently that Fha44, when  
 463 produced by *B. pertussis* instead of full-length FHA, to-  
 464 tally lacks immunogenicity upon intranasal infection of  
 465 the corresponding *B. pertussis* strain [Alonso et al., un-  
 466 published data], confirming that the two molecules dif-  
 467 fer substantially in their immunogenic properties. Future  
 468 studies will certainly address this important issue. We  
 469 hope that this will shed new light on the mechanism of  
 470 interaction of *B. pertussis* with the immune system of  
 471 the host and ultimately help to optimise attenuated *B.*  
 472 *pertussis* for the presentation of protective heterologous  
 473 antigens.

#### 474 Acknowledgements

475 We wish to thank A.-S. Debrie for her excellent techni-  
 476 cal assistance. This work was supported by a grant from the  
 477 European Community (QLRT-PL1999-0429), INSERM, In-  
 478 stitut Pasteur de Lille and Région Nord-Pas de Calais. N.R.  
 479 holds a fellowship of the Institut Pasteur de Lille, S.A. holds  
 480 a postdoctoral fellowship of Aventis Pasteur, and F.J.-D. is  
 481 a researcher of the CNRS.

#### References

- [1] Mestecky J. The common mucosal immune system and current 483  
strategies for induction of immune responses in external secretions. 484  
*J Clin Immunol* 1987;7:265–76. 485
- [2] Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. 486  
*Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S175–178. 487
- [3] de Haan L, Hirst TR. Cholera toxin and related enterotoxins: a cell 488  
biological and immunological perspective. *J Nat Toxins* 2000;9:281– 489  
97. 490
- [4] van Ginkel FW, Jackson RJ, Yuki Y, McGhee JR. Cutting edge: 491  
the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into 492  
olfactory tissues. *J Immunol* 2000;165:4778–82. 493
- [5] Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for 494  
antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 2001;19:1573–80. 495
- [6] Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schödel F, Potts A, Peterson D, et 496  
al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local 497  
immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* 498  
1995;63:3279–86. 499
- [7] Loch C. Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective 500  
antigens. *Pharm Sci Technol Today* 2000;3:121–8. 501
- [8] Tomoda T, Ogura H, Kurashige T. Immune responses to *Bordetella* 502  
*pertussis* infection and vaccination. *J Infect Dis* 1991;163:559–63. 503
- [9] Gearing AJ, Bird CR, Redhead K, Thomas M. Human cellular 504  
immune responses to *Bordetella pertussis* infection. *FEMS Microbiol* 505  
*Immunol* 1989;1:205–11. 506
- [10] Renaud-Mongé G, Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, 507  
Capron A, et al. Induction of mucosal immune responses against 508  
a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after 509  
intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc* 510  
*Natl Acad Sci USA* 1996;93:7944–9. 511
- [11] Coppens I, Alonso S, Antoine R, Jacob-Dubuisson F, Renaud- 512  
Mongé G, et al. Production of the *Neisseria meningitidis* 513  
transferrin-binding protein B by recombinant *Bordetella pertussis*. 514  
*Infect Immun* 2001;69, in press. 515
- [12] Loch C, Antoine R. *Bordetella pertussis* protein toxins. In: Alouf JE, 516  
Freer JH, editors. The comprehensive source book of bacterial protein 517  
toxins, 2nd edition. London: Academic Press, 1999. p. 130–46. 518
- [13] Mielcarek N, Riveau G, Remoue F, Antoine R, Capron A, et al. 519  
Homologous and heterologous protection after single intranasal 520  
administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. 521  
*Nat Biotechnol* 1998;16:454–7. 522
- [14] Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur* 523  
1906;20:731–41. 524
- [15] Stainer DW, Scholte MJ. A simple chemically defined medium for 525  
the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 526  
1970;63:211–20. 527
- [16] Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y. Effect of heptakis 528  
(2,6-*O*-dimethyl)-beta-cyclodextrin on the production of pertussis 529  
toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1983;41:1138–43. 530
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory 531  
manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor 532  
Laboratory, 1989. 533
- [18] Reizenstein E, Johansson B, Mardin L, Abens J, Mollby R, et al. 534  
Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for 535  
*Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. *Diagn* 536  
*Microbiol Infect Dis* 1993;17:185–91. 537
- [19] Baulard A, Bertin P, Dartois V, Loch C. Reincarnation of 538  
plasmids from dead bacteria by electroduction. *Meth Mol Cell Biol* 539  
1993;4:177–9. 540
- [20] Stibitz S. Use of conditionally counter selectable suicide vectors for 541  
allelic exchange. *Methods Enzymol* 1994;235:458–65. 542
- [21] Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization 543  
system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in 544  
gram negative bacteria. *Biotechnology* 1983;1:784–91. 545
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of 546  
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye 547  
binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. 548

- 549 [23] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly  
550 of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- 551 [24] Lambert-Buisine C, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F.  
552 N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous  
553 haemagglutinin. *Mol Microbiol* 1998;28:1283–93.
- 554 [25] Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM.  
555 Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*  
556 1998;22:163–8.
- 557 [26] Renaud-Mongénie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD,  
558 Loch C. Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor  
559 domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous  
560 haemagglutinin. *J Bacteriol* 1996;178:1053–60.
- 561 [27] Antoine R, Loch C. Isolation and molecular characterization of a  
562 novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with  
563 sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol*  
564 *Microbiol* 1992;6:1785–99.
- 565 [28] Loch C, Geoffroy MC, Renaud-Mongénie G. Common accessory  
566 genes for the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and  
567 fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene  
568 families. *EMBO J* 1992;11:3175–83.
- 569 [29] Guedin S, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F. Evidence that  
570 a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated  
571 secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol*  
572 *Microbiol* 1998;29:763–74.
- 573 [30] Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, Renaud-Mongénie G,  
574 Bertin P, et al. Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fimI/fha*  
575 gene cluster: identification of a gene with sequence similarities  
576 to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol*  
577 *Microbiol* 1994;11:337–47.
- [31] Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, et al. 578  
Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in 579  
the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. 580  
*J Biol Chem* 1999;274:37731–5. 581
- [32] Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, Furey WF, Schmidt JJ, 582  
et al. Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus 583  
neurotoxin. *Nat Struct Biol* 1997;4:788–92. 584
- [33] Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce R, Loch C, et al. 585  
Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the 586  
induction of a systemic immune response against a heterologous 587  
antigen. *Infect Immun* 1997;65:544–50. 588
- [34] Loch C, Bertin P, Menozzi FD, Renaud-Mongénie G. The 589  
filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by 590  
virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* 1993;9:653–60. 591
- [35] Poulain-Godefroy O, Mielcarek N, Ivanoff N, Remoué F, Schacht 592  
AM, et al. *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin enhances 593  
the immunogenicity of liposome-delivered antigen administered 594  
intranasally. *Infect Immun* 1998;66:1764–7. 595
- [36] Menozzi FD, Mutombo R, Renaud-Mongénie G, Gantiez C, Hannah 596  
J, et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous 597  
haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 598  
1994;62:769–78. 599
- [37] Antoine R, Loch C. The role of the disulfide bond and the 600  
carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly 601  
and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* 1990;58:1518– 602  
26. 603
- [38] Quant J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct 604  
selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 605  
1993;127:15–21. 606

*Conclusions et perspectives*

Depuis les expériences de Jenner, de nombreux vaccins ont été développés permettant de prévenir et de contrôler plusieurs maladies infectieuses. Dans la majorité des cas, ces vaccins sont injectés par voie parentérale, stimulant principalement le système immunitaire systémique ; mais ils sont souvent peu efficaces pour induire une protection au niveau des muqueuses. Or, la plupart des agents pathogènes, à l'origine de ces infections entrent dans l'organisme via les surfaces muqueuses. La stimulation du système immunitaire associé aux muqueuses devrait donc permettre de neutraliser l'agent pathogène dès son entrée dans l'organisme. La principale approche proposée pour induire une réponse immunitaire locale est l'administration d'antigènes par voie muqueuse, ce qui nécessite le développement de systèmes de délivrance efficaces.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à utiliser des bactéries vivantes comme vecteurs d'antigènes. Notre choix s'est porté sur deux bactéries en particulier : *Bordetella pertussis*, un pathogène respiratoire et *Lactobacillus plantarum*, un microorganisme non pathogène. Le but de notre étude était de mesurer l'intensité et le type de réponse immunitaire induite en fonction du vecteur utilisé et de la voie d'administration testée. A cet effet, nous avons choisi de travailler avec un antigène modèle unique, la TTFC. La construction de souches « vaccinales » candidates a nécessité de prendre en compte les systèmes d'expression propres à chacun des deux vecteurs.

### **1. *L. plantarum* comme vecteur vivant de vaccination**

Dans la première partie du travail, la construction de souches de *L. plantarum* productrices de TTFC dans trois localisations cellulaires différentes a été réalisée. Les souches recombinantes capables d'induire de fortes réponses immunitaires après administration systémique (titre  $>10^5$ ) ont été retenues pour la suite de l'étude. La production d'antigène, la stabilité et l'immunogénicité des trois souches utilisées pour réaliser des immunisations par voie muqueuse ont été comparées (articles 1 et 2). La production de TTFC était 4 et 12 fois moins élevée en surface de la bactérie et dans le milieu extracellulaire, respectivement, que dans le cytoplasme. Les trois souches sélectionnées se sont révélées être instables à différents degrés. Alors qu'aucune production d'antigène n'est détectée au delà de 9 ou 15 générations, respectivement, pour les souches productrices de TTFC dans le milieu extracellulaire ou à leur surface respectivement, la souche *L. plantarum* (pMEC127) est stable pendant 60 générations. On peut donc noter que de hauts niveaux de production sont relativement bien tolérés par la bactérie lorsque la TTFC est produite dans le cytoplasme mais pas lorsqu'elle

doit être exportée. La présence de séquences du gène *emm6* en plus du gène codant la TTFC dans pMEC160 et pMEC139 semble augmenter l'instabilité des constructions. La toxicité des signaux d'export et d'ancrage de la protéine M6 a déjà été démontrée lorsqu'elles sont fusionnées à la protéine NucA chez *Lactobacillus fermentum* (Hautefort, 1998).

L'instabilité génétique observée dans notre étude est sans doute renforcée par l'utilisation combinée d'un promoteur fort (*Pldh*) et d'un plasmide à haut nombre de copies (pLAB1000). En effet, il a été montré que l'utilisation du vecteur haut nombre de copies pIL253, avec deux promoteurs forts P23 et P59, pour l'expression de *emm6* chez *Lc. lactis* conduit à deux types d'évènements : avec P23, la protéine est tronquée alors qu'avec P59, le nombre de copies du plasmide est réduit (Piard, communication personnelle). La surproduction d'un antigène recombinant toxique peut donc être contournée par la bactérie soit en éliminant le gène de structure hétérologue, soit en réduisant le nombre de copies du gène. Nous avons donc transféré les séquences codant les chimères M6<sup>N</sup>::TTFC et M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> sous le contrôle d'un promoteur de force moyenne, P32 dans le vecteur pMG36e (constructions pMEC131 et pMEC132). Les études de stabilité n'ont pas été menées sur ces constructions car l'analyse par Western blot a révélé que les quantités de chimères M6<sup>N</sup>::TTFC::M6<sup>C</sup> et M6<sup>N</sup>::TTFC obtenues étaient faibles. Or, il est établi que l'administration sous-cutanée de souches faiblement productrices d'antigène conduit à une réponse immunitaire moins élevée que l'administration de souches produisant plus d'antigène.

L'administration des souches recombinantes par voie muqueuse a montré que les taux d'anticorps les plus élevés étaient obtenus avec la souche produisant de grandes quantités de TTFC dans le cytoplasme. Néanmoins, les souches structurellement instables portant le plasmide pMEC160 ou pMEC139 mais productrices des quantités « suffisantes » d'antigène étaient capables d'induire de nettes réponses immunitaires après administration par voies intra-nasale (titre de 10<sup>4</sup>) et intra-gastrique (titre de 10<sup>3</sup>). Il serait donc intéressant de pouvoir réguler la production d'antigène à un niveau suffisant pour induire une réponse immunitaire sans entraîner d'effet toxique pour la bactérie. Pour contourner ce problème, l'utilisation d'un promoteur inductible *in vivo* peut être proposée. Un tel système a été utilisé, par exemple, pour l'expression de la TTFC chez *Salmonella typhimurium* administrée par voie orale (Chatfield et al., 1992).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet de conclure que malgré l'instabilité génétique, la quantité initiale d'antigène délivré par les souches recombinantes de

*L. plantarum* que nous avons construites, est suffisante pour stimuler le tissu lymphoïde associé aux muqueuses et développer une réponse immunitaire. Dans le cas de la TTFC, l'expression cytoplasmique à haut niveau semble être la stratégie la plus efficace et la moins contraignante. Cependant, dans le cadre du développement de systèmes de délivrance de molécules biologiquement actives, basés sur l'utilisation des bactéries lactiques, il peut être nécessaire d'ancrer ou de sécréter la protéine hétérologue comme l'ont montré Steidler et al. et Beninati et al. (Steidler et al., 1998 ; Beninati et al., 2000).

Malgré les résultats positifs obtenus avec les bactéries lactiques comme vecteurs vivants, des questions importantes, dont certaines sont en cours d'études au laboratoire, restent à élucider :

- Quels sont les médiateurs de l'interaction des bactéries lactiques avec le système immunitaire muqueux ?
- La réplication d'une souche dans l'organisme est-elle plus importante que sa survie ou sa viabilité ?
- L'adhésion au mucus ou aux cellules épithéliales influence-t-elle la réponse immunitaire ?
- Quels sont les moyens permettant d'améliorer l'efficacité du système ?

La réponse à ces questions permettra de mieux appréhender le potentiel des bactéries lactiques comme vecteurs vivants de vaccination, en particulier de diminuer le nombre et la fréquence des administrations.

## **2. *B. pertussis*, comme vecteur vivant de vaccination**

La deuxième partie de ce travail consistait à construire des souches recombinantes de *Bordetella pertussis* productrices de TTFC et à évaluer leur immunogénicité après administration par voie muqueuse. Nous avons choisi d'exploiter la machinerie de sécrétion de la FHA en utilisant sa partie N-terminale, appelée Fha44, comme molécule porteuse de l'antigène. Le gène codant la TTFC a donc été fusionné au gène *fha44* et la construction a été intégrée dans le chromosome de *B. pertussis*. Deux souches ont ainsi été transformées : la souche sauvage productrice de la toxine pertussique (PT) et une souche atténuée déficiente pour la production de la PT. Nous avons montré que les deux souches recombinantes étaient capables de sécréter une protéine hybride Fha44::TTFC, mais à une taille inférieure à celle attendue. La forme globulaire de la partie TTFC, incompatible avec la machinerie de sécrétion de FHA, pourrait être à l'origine de la dégradation de la chimère. En effet, le passage de la

protéine à travers la membrane externe, via FhaC, doit se faire sous forme « dépliée » (non globulaire).

Nous avons montré que l'administration intra-nasale des deux souches recombinantes n'induisait pas de réponse immunitaire primaire mais qu'elles sont capables d'induire une mémoire systémique contre la TTFC.

Ce travail nous a permis de montrer que *B. pertussis* était capable de présenter la TTFC au système immunitaire muqueux. Vu les résultats obtenus avec *L. plantarum*, nous envisageons d'étudier la réponse immunitaire induite par des souches recombinantes de *B. pertussis* productrices de TTFC, non plus sous forme sécrétée, mais dans le cytoplasme.

L'utilisation de *B. pertussis* comme vecteur vivant de vaccination nécessite également de poursuivre son atténuation. A ce titre, la toxine dermonécrotique (DNT) et la cytotoxine trachéale (TCT) font l'objet d'études au laboratoire.

### 3. Conclusion générale

D'une manière globale, le travail réalisé au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence plusieurs points importants.

Les bactéries lactiques, en particulier *L. plantarum*, représentent effectivement une alternative intéressante à l'utilisation de bactéries pathogènes comme vecteurs de vaccination. Si la faisabilité de l'approche « bactéries lactiques » était établie au moment où notre travail a été initié, aucune comparaison n'avait été menée avec d'autres systèmes de délivrance d'antigènes. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un antigène unique comme modèle, la TTFC, dans notre étude.

La stratégie de « comparaison contrôlée » que nous avons proposé s'est avérée relativement difficile à mettre en œuvre. En effet, des problèmes d'expression et de stabilité génétique ont limité le nombre et la qualité des souches recombinantes nécessaires à l'étude envisagée. Il est clair néanmoins que des résultats probants (induction de réponses immunitaires importantes et spécifiques) ont été obtenus avec *L. plantarum* par rapport à un système tel que *B. pertussis*, qui avait déjà fait ses preuves. Ceci est une observation intéressante, car les connaissances immunologiques actuelles n'auraient pas désigné à priori les bactéries lactiques comme « candidats vaccins efficaces ».

Il faut noter d'ailleurs que les problèmes qui ont limité notre travail ont surtout été liés aux difficultés rencontrées dans la construction de souches recombinantes de *L. plantarum* et *B. pertussis*. En d'autres termes, les résultats d'immunisation que nous avons rapportés se sont avérés dépendants des caractéristiques génétiques de la bactérie utilisée comme vecteur (expression de gènes hétérologues) plus que du caractère pathogène ou non-pathogène de celle-ci.

L'étude de stabilité menée sur les souches recombinantes de *L. plantarum* a montré que, pour cet hôte, les systèmes d'expression hétérologue peuvent encore être améliorés. La corrélation entre la stabilité des souches « vaccinales » *in vitro* ou *in vivo* et l'induction de réponses immunitaires est rarement rapportée dans la littérature. Or, nous avons clairement mis en évidence qu'aucune conclusion sur la présentation optimale d'un antigène (localisation cellulaire) ne peut être tirée sans étudier en parallèle le comportement de la souche.

En ce qui concerne *B. pertussis*, un avantage de poids est qu'une administration unique suffit à induire une colonisation efficace des voies respiratoires de l'hôte. De manière remarquable, il a été montré au laboratoire que la délétion de la toxine pertussique chez une souche recombinante permettait d'augmenter la réponse immunitaire contre un antigène fusionné à la FHA. Nos résultats montrent que ce n'est pas le cas lorsque l'antigène est fusionné à la Fha44. Ceci suggère que des sites fonctionnels importants présents sur la FHA mais absents sur la Fha44 sont impliqués dans l'immunogénicité. De plus, nos travaux, ainsi que d'autres réalisés récemment au laboratoire, ont mis en évidence que le système de présentation basé sur la machinerie de sécrétion de la FHA n'était pas approprié à la sécrétion d'antigène comportant des ponts disulfures.

En conclusion, les deux types de vecteurs bactériens étudiés dans ce travail présentent des avantages et des inconvénients. Si les réponses immunitaires anti-TTFC générées par administration de souches recombinantes de *L. plantarum* se sont révélées supérieures à celles induites avec *B. pertussis*, elles ont néanmoins nécessité des administrations répétées. Il faut noter également que, par manque de temps, les constructions génétiques réalisées chez *B. pertussis* n'ont pas été optimisées. A ce stade du travail, nos résultats confirment ce qui est généralement évoqué dans la littérature : la nature du vecteur de délivrance et la voie d'immunisation devront probablement être adaptées à la maladie ciblée. La facilité de mise en œuvre du système apparaît, dans notre étude, comme un facteur prépondérant. Nous n'avons pour le moment aucune indication que les deux vecteurs bactériens étudiés induisent des

réponses immunitaires de nature radicalement différentes. Ceci nous amène à poser la question suivante : la présentation d'un antigène diffère-t-elle, dans ses étapes précoces, selon que le vecteur bactérien est d'origine pathogène ou non-pathogène ?

Malgré les difficultés évoquées plus haut, l'utilisation de vecteurs bactériens pour délivrer des antigènes, des immunomodulateurs ou des enzymes au niveau des différentes muqueuses correspond à une approche de choix. Elle permet, entre autres, d'induire des effets biologiques probants en délivrant des quantités réduites de molécules thérapeutiques.

*Références bibliographiques*

1. **Abomoelak, B., Huygen, K., Kremer, L., Turneer, M. & Locht, C. (1999).** Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* *Bacillus* Calmette-Guerin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein. *Infect Immun* **67**, 5100-5.
2. **Abramson, T., Kedem, H. & Relman, D. A. (2001).** Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* **69**, 2650-8.
3. **ACIP (1997).** Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **46**, 1-25.
4. **Agterberg, M., Adriaanse, H. & Tommassen, J. (1987).** Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **59**, 145-50.
5. **Ahrne, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A. E. & Molin, G. (1998).** The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J Appl Microbiol* **85**, 88-94.
6. **Aichele, P., Kyburz, D., Ohashi, P. S., Odermatt, B., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. & Pircher, H. (1994).** Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 444-8.
7. **Akerley, B. J. & Miller, J. F. (1996).** Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol* **4**, 141-6.
8. **Anderson, R., Gao, X. M., Papakonstantinou, A., Fairweather, N., Roberts, M. & Dougan, G. (1997).** Immunization of mice with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Vaccine* **15**, 827-9.
9. **Andreoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Samuelson, P., Nguyen, T. N., Robert, A., Uhlen, M., Binz, H. & Stahl, S. (1997).** Flow cytometric quantification of surface-displayed recombinant receptors on staphylococci. *Biotechniques* **23**, 696-702, 704.
10. **Antoine, R. & Locht, C. (1990).** Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* **58**, 1518-26.
11. **Antoine, R. & Locht, C. (1992).** Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* **6**, 1785-99.
12. **Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2000).** New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **182**, 5902-5.
13. **Antonio, M. A., Hawes, S. E. & Hillier, S. L. (1999).** The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* **180**, 1950-6.
14. **Arico, B., Nuti, S., Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1993).** Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9204-8.
15. **Arnau, J., Hjerl-Hansen, E. & Israelsen, H. (1997).** Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 331-8.
16. **Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. (1999).** An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995-1004.
17. **Asseman, C., Fowler, S. & Powrie, F. (2000).** Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, S185-9.

18. Autenrieth, I. B. & Firsching, R. (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* **44**, 285-94.
19. Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M. & Snider, M. (1999). Induction of mucosal immune responses by administration of liposome- antigen formulations and interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 455-62.
20. Baras, B., Benoit, M. A., Dupre, L., Poulain-Godefroy, O., Schacht, A. M., Capron, A., Gillard, J. & Riveau, G. (1999). Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a *Schistosoma mansoni* antigen. *Infect Immun* **67**, 2643-8.
21. Barenkamp, S. J. & St Geme, J. W., 3rd (1996). Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **19**, 1215-23.
22. Barnes, M. G. & Weiss, A. A. (2001). BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* **69**, 3067-72.
23. Barrett, D. J., Sleasman, J. W., Schatz, D. A. & Steinitz, M. (1992). Human anti-pneumococcal polysaccharide antibodies are secreted by the CD5- B cell lineage. *Cell Immunol* **143**, 66-79.
24. Barry, E. M., Weiss, A. A., Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Hewlett, E. L. & Goodwin, M. S. (1991). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol* **173**, 720-6.
25. Baulard, A., Bertin, P., Dartois, V. & Locht, C. (1993). Reincarnation of plasmids from dead bacteria by electroduction. *Methods in molecular and cellular biology* **4**, 177-179.
26. Baum, J. A., Coyle, D. M., Gilbert, M. P., Jany, C. S. & Gawron-Burke, C. (1990). Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3420-8.
27. Beattie, D. T., Shahin, R. & Mekalanos, J. J. (1992). A vir-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence. *Infect Immun* **60**, 571-7.
28. Beattie, D. T., Mahan, M. J. & Mekalanos, J. J. (1993). Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (*vrg* genes) in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **175**, 519-27.
29. Begue, P. (1993). La coqueluche : actualités et prévention. *Arch. Fr. Pédiatr.* **50**, 843-846.
30. Bejerano, M., Nisan, I., Ludwig, A., Goebel, W. & Hanski, E. (1999). Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* **31**, 381-92.
31. Belyakov, I. M., Wyatt, L. S., Ahlers, J. D., Earl, P., Pendleton, C. D., Kelsall, B. L., Strober, W., Moss, B. & Berzofsky, J. A. (1998). Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. *J Virol* **72**, 8264-72.
32. Beninati, C., Oggioni, M. R., Boccanera, M., Spinosa, M. R., Maggi, T., Conti, S., Magliani, W., De Bernardis, F., Teti, G., Cassone, A., Pozzi, G. & Polonelli, L. (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* **18**, 1060-4.
33. Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1995). SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* **17**, 123-35.
34. Bergerot, I., Ploix, C., Petersen, J., Moulin, V., Rask, C., Fabien, N., Lindblad, M., Mayer, A., Czerkinsky, C., Holmgren, J. & Thivolet, C. (1997). A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4610-4.
35. Bernardini, M. L., Arondel, J., Martini, I., Aidara, A. & Sansonetti, P. J. (2001). Parameters underlying successful protection with live attenuated mutants in experimental shigellosis. *Infect Immun* **69**, 1072-83.

36. Bessen, D. & Fischetti, V. A. (1988). Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci. *Infect Immun* **56**, 2666-72.
37. Betsou, F., Sebo, P. & Guiso, N. (1995). The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* **63**, 3309-15.
38. Bienenstock, J., Johnston, N. & Perey, D. Y. (1973). Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab Invest* **28**, 686-92.
39. Biet, F. (1997). Développement de vecteurs plasmidiques de bactéries lactiques. Application à l'expression hétérologue de la mésentéricine. *Thèse de Doctorat. Université de Poitiers*.
40. Bland, P. W. & Warren, L. G. (1986). Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology* **58**, 9-14.
41. Boe, L. & Tolker-Nielsen, T. (1997). Plasmid stability: comments on the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol* **23**, 247-53.
42. Bordet, J. & Gengou, O. (1906a). Le microbe de la coqueluche. *Ann. Pasteur (Paris)* **20**, 731-741.
43. Bordet, J. & Gengou, O. (1906b). L'endotoxine coquelucheuse. *Ann. Inst. Pasteur* **23**, 415-419.
44. Boucher, P. E., Menozzi, F. D. & Locht, C. (1994). The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**, 363-77.
45. Boucher, P. E., Murakami, K., Ishihama, A. & Stibitz, S. (1997). Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *pha* promoter. *J Bacteriol* **179**, 1755-63.
46. Bouia, A., Bringel, F., Frey, L., Kammerer, B., Belarbi, A., Guyonvarch, A. & Hubert, J. C. (1989). Structural organization of pLP1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904. *Plasmid* **22**, 185-92.
47. Boursaux-Eude, C. & Guiso, N. (2000). Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* **68**, 4815-7.
48. Bowersock, T. L., Shalaby, W. S., Levy, M., Samuels, M. L., Lallone, R., White, M. R., Borie, D. L., Lehmeier, J. & Park, K. (1994). Evaluation of an orally administered vaccine, using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica*, in cattle. *Am J Vet Res* **55**, 502-9.
49. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
50. Brandtzaeg, P., Baekkevold, E. S., Farstad, I. N., Jahnsen, F. L., Johansen, F. E., Nilsen, E. M. & Yamanaka, T. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* **20**, 141-51.
51. Bron, S., Holsappel, S., Venema, G. & Peeters, B. P. (1991a). Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol Gen Genet* **226**, 88-96.
52. Bron, S., Meijer, W., Holsappel, S. & Haima, P. (1991b). Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **142**, 875-83.
53. Brossier, F., Weber-Levy, M., Mock, M. & Sirard, J. C. (2000). Protective antigen-mediated antibody response against a heterologous protein produced In vivo by *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **68**, 5731-4.

54. Burns, D. L. (1999). Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**, 25-9.
55. Cahill, E. S., O'Hagan, D. T., Illum, L. & Redhead, K. (1993). Mice are protected against *Bordetella pertussis* infection by intra- nasal immunization with filamentous haemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett* **107**, 211-6.
56. Calmette, A. & Guérin, C. (1911). Recherches expérimentales sur la défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Ann. Inst. Pasteur* **25**, 625-641.
57. Calmette, A. (1927). La vaccination préventive contre la tuberculose par le BCG avec la collaboration de C. Guérin, A. Boquet et L. Negre. *Masson et Cie. Paris*, pp.250.
58. Cano, F., Liljeqvist, S., Nguyen, T. N., Samuelson, P., Bonnefoy, J. Y., Stahl, S. & Robert, A. (1999). A surface-displayed cholera toxin B peptide improves antibody responses using food-grade *staphylococci* for mucosal subunit vaccine delivery. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**, 289-98.
59. Cano, F., Plotnicky-Gilquin, H., Nguyen, T. N., Liljeqvist, S., Samuelson, P., Bonnefoy, J., Stahl, S. & Robert, A. (2000). Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface- displayed RSV-peptides. *Vaccine* **18**, 2743-52.
60. Cardenas, L. & Clements, J. D. (1993). Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* **11**, 126-35.
61. Caroff, M., Brisson, J., Martin, A. & Karibian, D. (2000). Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett* **477**, 8-14.
62. Casadevall, A. & Scharff, M. D. (1994). Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1695-702.
63. Cersini, A., Salvia, A. M. & Bernardini, M. L. (1998). Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun* **66**, 549-57.
64. Chamberlain, L., Wells, J. M., K., R., Schofield, K. M. & Le Page, R. W. (1997). Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*. In: Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. G. Pozzi and J.M. Wells (eds). Springer-Verlag, Berlin., pp 83-106.
65. Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two- component regulators. *Science* **262**, 539-44.
66. Chanock, R. M. & Murphy, B. R. (1980). Use of temperature-sensitive and cold-adapted mutant viruses in immunoprophylaxis of acute respiratory tract disease. *Rev Infect Dis* **2**, 421-32.
67. Charbit, A., Sobczak, E., Michel, M. L., Molla, A., Tiollais, P. & Hofnung, M. (1987). Presentation of two epitopes of the preS2 region of hepatitis B virus on live recombinant bacteria. *J Immunol* **139**, 1658-64.
68. Charles, I. G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P. & Fairweather, N. F. (1989). Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3554-8.
69. Charles, I. G., Fairweather, N., Pickard, D., Beesley, J., Anderson, R., Dougan, G. & Roberts, M. (1994). Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* **140**, 3301-8.
70. Chatfield, S. N., Charles, I. G., Makoff, A. J., Oxe, M. D., Dougan, G., Pickard, D., Slater, D. & Fairweather, N. F. (1992). 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 (N Y)* **10**, 888-92.
71. Chen, H. (2000). Recent advances in mucosal vaccine development. *J Control Release* **67**, 117-28.

72. **Chen, I., Finn, T. M., Yanqing, L., Guoming, Q., Rappuoli, R. & Pizza, M. (1998).** A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and *Bordetella pertussis* tracheal colonization factor. *Infect Immun* **66**, 1648-53.
73. **Chen, S. C., Jones, D. H., Fynan, E. F., Farrar, G. H., Clegg, J. C., Greenberg, H. B. & Herrmann, J. E. (1998).** Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J Virol* **72**, 5757-61.
74. **Cherry, J., Brunell, P. & Golden, G. (1988).** Report of the task force on pertussis and pertussis immunization. *Pediatrics* **81**, 939-984.
75. **Cherry, J. D. (1996).** Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis* **174 Suppl 3**, S259-63.
76. **Childers, N. K., Zhang, S. S. & Michalek, S. M. (1994).** Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing *Streptococcus mutans* glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses. *Oral Microbiol Immunol* **9**, 146-53.
77. **Choi, S. H. & Greenberg, E. P. (1991).** The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11115-9.
78. **Chudwin, D. S. (1989).** Prophylaxis and treatment of pneumococcal bacteremia by immune globulin intravenous in a mouse model. *Clin Immunol Immunopathol* **50**, 62-71.
79. **Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L. & Hirst, B. H. (1994).** Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* **145**, 543-52.
80. **Clark, M. A., Hirst, B. H. & Jepson, M. A. (1998).** M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**, 1237-43.
81. **Cleland, J. L. (1995).** Design and production of single-immunization vaccines using polylactide polyglycolide microsphere systems. *Pharm Biotechnol* **6**, 439-62.
82. **Clewell, D. B., Yagi, Y., Dunny, G. M. & Schultz, S. K. (1974).** Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J Bacteriol* **117**, 283-9.
83. **Cochi, S. L., Hull, H. F., Sutter, R. W., Wilfert, C. M. & Katz, S. L. (1997).** Commentary: the unfolding story of global poliomyelitis eradication. *J Infect Dis* **175 Suppl 1**, S1-3.
84. **Conley, M. E. & Delacroix, D. L. (1987).** Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med* **106**, 892-9.
85. **Conway, M. A., Madrigal-Estebas, L., McClean, S., Brayden, D. J. & Mills, K. H. (2001).** Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells. *Vaccine* **19**, 1940-50.
86. **Cookson, B. T., Vandamme, P., Carlson, L. C., Larson, A. M., Sheffield, J. V., Kersters, K. & Spach, D. H. (1994).** Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol* **32**, 2569-71.
87. **Coote, J. (1992).** Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**, 137-161.
88. **Coppens, I., Alonso, S., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., Renaud-Mongenie, G., Jacobs, E. & Locht, C. (2001).** Production of *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein B by recombinant *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **69**, sous presse.

89. Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., van Dijk, J. M. & Bron, S. (1996). The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 5235-42.
90. Corinti, S., Medaglini, D., Cavani, A., Rescigno, M., Pozzi, G., Ricciardi-Castagnoli, P. & Girolomoni, G. (1999). Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **163**, 3029-36.
91. Corinti, S., Medaglini, D., Prezzi, C., Cavani, A., Pozzi, G. & Girolomoni, G. (2000). Human dendritic cells are superior to B cells at presenting a major histocompatibility complex class II-restricted heterologous antigen expressed on recombinant *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* **68**, 1879-83.
92. Cortesy, B., Kaufmann, M., Phalipon, A., Peitsch, M., Neutra, M. R. & Kraehenbuhl, J. P. (1996). A pathogen-specific epitope inserted into recombinant secretory immunoglobulin A is immunogenic by the oral route. *J Biol Chem* **271**, 33670-7.
93. Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2001). A subtilisin-like autotransporter protein serves as a maturation protease in the secretion pathway of a Gram negative bacterium. *Embo J*, sous presse.
94. Cowell, J. L., Hewlett, E. L. & Manclark, C. R. (1979). Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**, 896-901.
95. Cox, J. C., Sjolander, A. & Barr, I. G. (1998). ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* **32**, 247-271.
96. Craig-Mylius, K. A., Stenson, T. H. & Weiss, A. A. (2000). Mutations in the S1 subunit of pertussis toxin that affect secretion. *Infect Immun* **68**, 1276-81.
97. Cullinane, L., Alley, M., Marshall, R. & Manktelow, B. (1987). *Bordetella pertussis* from lambs. *NZ Vet. J.* **35**, 175.
98. Darji, A., Guzman, C. A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K. N., Wehland, J., Chakraborty, T. & Weiss, S. (1997). Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**, 765-75.
99. Davidson, B. E., Kordias, N., Dobos, M. & Hillier, A. J. (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 161-83.
100. de Haan, L. & Hirst, T. R. (2000). Cholera toxin and related enterotoxins: a cell biological and immunological perspective. *J Nat Toxins* **9**, 281-97.
101. de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food- grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3662-7.
102. De Simone, C., Vesely, R., Negri, R., Bianchi Salvadori, B., Zanzoglu, S., Cilli, A. & Lucci, L. (1987). Enhancement of immune response of murine Peyer's patches by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **9**, 87-100.
103. De Simone, C., Tzantzoglou, S., Baldinelli, L., Di Fabio, S., Bianchi-Salvadori, B., Jirillo, E. & Vesely, R. (1988). Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **10**, 399-415.
104. de Vos, W. M., Vos, P., de Haard, H. & Boerrigter, I. (1989). Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene* **85**, 169-76.
105. de Vos, W. M. & Simons, G. (1994). Gene cloning and expression systems in lactococci. In: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. M.J. Gasson and W.M. De Vos (eds). Oxford: Chapman and Hall., pp. 52-105.
106. de Vos, W. M. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**, 289-95.

107. de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* **73**, 421S-429S.
108. Decker, M. D., Edwards, K. M., Steinhoff, M. C., Rennels, M. B., Pichichero, M. E., Englund, J. A., Anderson, E. L., Deloria, M. A. & Reed, G. F. (1995). Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* **96**, 557-66.
109. Dedieu, J. F., Ronco, J., van der Werf, S., Hogle, J. M., Henin, Y. & Girard, M. (1992). Poliovirus chimeras expressing sequences from the principal neutralization domain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **66**, 3161-7.
110. Dei-Cas, E., Brun-Pascaud, M., Bille-Hansen, V., Allaert, A. & Aliouat, E. M. (1998). Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **22**, 163-8.
111. Del Giudice, G., Covacci, A., Telford, J. L., Montecucco, C. & Rappuoli, R. (2001). The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* **19**, 523-63.
112. Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 159-84.
113. Delisse-Gathoye, A. M., Locht, C., Jacob, F., Raaschou-Nielsen, M., Heron, I., Ruelle, J. L., de Wilde, M. & Cabezon, T. (1990). Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **58**, 2895-905.
114. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 193-202.
115. Denich, K., Borlin, P., O'Hanley, P. D., Howard, M. & Heath, A. W. (1993). Expression of the murine interleukin-4 gene in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*: persistence and immune response in BALB/c mice and susceptibility to macrophage killing. *Infect Immun* **61**, 4818-27.
116. Deville, J. G., Cherry, J. D., Christenson, P. D., Pineda, E., Leach, C. T., Kuhls, T. L. & Viker, S. (1995). Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis* **21**, 639-42.
117. Devine, K. M., Hogan, S. T., Higgins, D. G. & McConnell, D. J. (1989). Replication and segregational stability of Bacillus plasmid pBAA1. *J Bacteriol* **171**, 1166-72.
118. Di Fabio, S., Medagliani, D., Rush, C. M., Corrias, F., Panzini, G. L., Pace, M., Verani, P., Pozzi, G. & Titti, F. (1998). Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with *Streptococcus gordonii* expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. *Vaccine* **16**, 485-92.
119. Di Tommaso, A., Domenighini, M., Bugnoli, M., Tagliabue, A., Rappuoli, R. & De Magistris, M. T. (1991). Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect Immun* **59**, 3313-5.
120. Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. & Piard, J. C. (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **183**, 4157-66.
121. Dobrzanski, W. T. & Osowiecki, H. (1967). Isolation and some properties of the competence factor from group H *Streptococcus* strain Challis. *J Gen Microbiol* **48**, 299-304.
122. Döderlein, A. (1892). Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. (The vaginal transudate and its significance for chidbed fever). *Centrablatt für Bacteriologie*. **11**, 699-700.
123. Domenighini, M., Relman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1990). Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol* **4**, 787-800.

124. Douce, G., Turcotte, C., Cropley, I., Roberts, M., Pizza, M., Domenghini, M., Rappuoli, R. & Dougan, G. (1995). Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1644-8.
125. Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (1999). Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4881-6.
126. Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2000). Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 588-98.
127. Dunstan, S. J., Simmons, C. P. & Strugnell, R. A. (1999). Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. *Typhimurium*. *Infect Immun* **67**, 5133-41.
128. Dupont, L., Boizet-Bonhoure, B., Coddeville, M., Auvray, F. & Ritzenthaler, P. (1995). Characterization of genetic elements required for site-specific integration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage mv4 and construction of an integration-proficient vector for *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **177**, 586-95.
129. Edelman, R., Palmer, K., Russ, K. G., Secrest, H. P., Becker, J. A., Bodison, S. A., Perry, J. G., Sills, A. R., Barbour, A. G., Luke, C. J., Hanson, M. S., Stover, C. K., Burlein, J. E., Bansal, G. P., Connor, E. M. & Koenig, S. (1999). Safety and immunogenicity of recombinant Bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. *Vaccine* **17**, 904-14.
130. Edwards, K. M. (1993). Acellular pertussis vaccines--a solution to the pertussis problem? *J Infect Dis* **168**, 15-20.
131. Ehrlich, S. D., Bierne, H., d'Alencon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P. & Michel, B. (1993). Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* **135**, 161-6.
132. Ellis, R. W. (2001). Product development plan for new vaccine technologies. *Vaccine* **19**, 1559-66.
133. Else, K. J. & Finkelman, F. D. (1998). Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int J Parasitol* **28**, 1145-58.
134. El-Solh, N., Bouanchaud, D. H., Horodniceanu, T., Roussel, A. & Chabbert, Y. A. (1978). Molecular studies and possible relatedness between R plasmids from groups B and D streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* **14**, 19-23.
135. Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F. & Isaacs, N. W. (1996). Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**, 90-2.
136. Engels, E. A. & Lau, J. (2000). Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst Rev* **2**.
137. Ermak, T. H., Dougherty, E. P., Bhagat, H. R., Kabok, Z. & Pappo, J. (1995). Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells. *Cell Tissue Res* **279**, 433-6.
138. Eskola, J. & Anttila, M. (1999). Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 543-51.
139. Fairweather, N. F., Lyness, V. A. & Maskell, D. J. (1987). Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**, 2541-5.
140. Farizo, K. M., Huang, T. & Burns, D. L. (2000). Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**, 4049-54.
141. Favre, D., Cryz, S. J., Jr. & Viret, J. F. (1996). Development of *Shigella sonnei* live oral vaccines based on defined rfbInaba deletion mutants of *Vibrio cholerae* expressing the *Shigella* serotype D O polysaccharide. *Infect Immun* **64**, 576-84.

142. Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. & Leclerc, C. (1999). Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol* **162**, 4157-62.
143. Feirtag, J. M., Petzel, J. P., Pasalodos, E., Baldwin, K. A. & McKay, L. L. (1991). Thermosensitive plasmid replication, temperature-sensitive host growth, and chromosomal plasmid integration conferred by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* lactose plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 539-48.
144. Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P. & Delcour, J. (1994). *Lactobacillus plantarum* ldhL gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol* **176**, 596-601.
145. Fernandez, R. C. & Weiss, A. A. (1994). Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**, 4727-38.
146. Fernandez, R. C. & Weiss, A. A. (1998). Serum resistance in *bvg*-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* **163**, 57-63.
147. Fine, P. (1997). Adult pertussis: a salesman's dream and an epidemiologist's nightmare. *Biologicals* **25**, 195-198.
148. Fine, P. E. & Clarkson, J. A. (1987). Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* **9**, 866-83.
149. Finn, T. M. & Stevens, L. A. (1995). Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**, 625-34.
150. Finne, J., Leinonen, M. & Makela, P. H. (1983). Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**, 355-7.
151. Fischetti, V. A. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* **2**, 285-314.
152. Fischetti, V. A., Pancholi, V. & Schneewind, O. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* **4**, 1603-5.
153. Fischetti, V. A. (1991). Streptococcal M protein. *Sci Am* **264**, 32-39.
154. Flak, T. A. & Goldman, W. E. (1999). Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* **1**, 51-60.
155. Friedman, R. L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E. T. & Yocum, D. E. (1992). Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* **60**, 4578-85.
156. Fujimura, Y. (1986). Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches-- phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn* **21**, 325-35.
157. Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C. & Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene- gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11478-82.
158. Galazka, A. & Gasse, F. (1995). The present status of tetanus and tetanus vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* **195**, 31-53.
159. Gallichan, W. S. & Rosenthal, K. L. (1996). Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J Exp Med* **184**, 1879-90.
160. Gallichan, W. S. & Rosenthal, K. L. (1998). Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization. *J Infect Dis* **177**, 1155-61.

161. **Garçon, N. (1999)**. Presentation at the World Vaccine Congress, Geneva, 26-28 September.
162. **Gearing, A. J., Bird, C. R., Redhead, K. & Thomas, M. (1989)**. Human cellular immune responses to *Bordetella pertussis* infection. *FEMS Microbiol Immunol* **1**, 205-11.
163. **Gentile, F., Knipling, L. G., Sackett, D. L. & Wolff, J. (1990)**. Invasive adenylyl cyclase of *Bordetella pertussis*. Physical, catalytic, and toxic properties. *J Biol Chem* **265**, 10686-92.
164. **Geoffroy, M. C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M. & Mercenier, A. (2000)**. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol* **66**, 383-91.
165. **Germanier, R. & Fuer, E. (1975)**. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* **131**, 553-8.
166. **Geuijen, C. A., Willems, R. J. & Mooi, F. R. (1996)**. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64**, 2657-65.
167. **Geuijen, C. A., Willems, R. J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H. & Mooi, F. R. (1997)**. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun* **65**, 4222-8.
168. **Geuijen, C. A., Willems, R. J., Hoogerhout, P., Puijk, W. C., Meloen, R. H. & Mooi, F. R. (1998)**. Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **66**, 2256-63.
169. **Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995)**. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**, 1401-12.
170. **Gicquel, B. (1995)**. BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* **23**, 113-8.
171. **Gilbert, C., Robinson, K., Le Page, R. W. & Wells, J. M. (2000)**. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* **68**, 3251-60.
172. **Girard, M., Habel, A. & Chanel, C. (1999)**. New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1. An overview. *C R Acad Sci III* **322**, 959-66.
173. **Giuliani, M. M., Del Giudice, G., Giannelli, V., Dougan, G., Douce, G., Rappuoli, R. & Pizza, M. (1998)**. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *J Exp Med* **187**, 1123-32.
174. **Gizurason, S., Jonsdottir, V. M. & Heron, I. (1995)**. Intranasal administration of diphtheria toxoid. Selecting antibody isotypes using formulations having various lipophilic characteristics. *Vaccine* **13**, 617-21.
175. **Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. & Ullmann, A. (1988)**. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med* **13**, 239-52.
176. **Gold, R. & Artenstein, M. S. (1971)**. Meningococcal infections. 2. Field trial of group C meningococcal polysaccharide vaccine in 1969-70. *Bull World Health Organ* **45**, 279-82.
177. **Gold, R., Scheifele, D., Barreto, L., Wiltsey, S., Bjornson, G., Meekison, W., Guasparini, R. & Medd, L. (1994)**. Safety and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* vaccine (tetanus toxoid conjugate) administered concurrently or combined with diphtheria and tetanus toxoids, pertussis vaccine and inactivated poliomyelitis vaccine to healthy infants at two, four and six months of age. *Pediatr Infect Dis J* **13**, 348-55.

178. **Golding, B. & Scott, D. E. (1995).** Vaccine strategies: targeting helper T cell responses. *Ann N Y Acad Sci* **754**, 126-37.
179. **Grangette, C., Muller-Alouf, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M. C., Turneer, M. & Mercenier, A. (2001).** Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* **69**, 1547-53.
180. **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. (1996).** A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* **334**, 341-8.
181. **Grimpel, E., Bégué, P., Anjak, I., Njamkepo, E., François, P. & Guisi, N. (1996).** Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis in France. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **3**, 93-97.
182. **Gruss, A. & Ehrlich, S. D. (1988).** Insertion of foreign DNA into plasmids from gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. *J Bacteriol* **170**, 1183-90.
183. **Gruss, A. & Ehrlich, S. D. (1989).** The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol Rev* **53**, 231-41.
184. **Gruzza, M., Duval-Iflah, Y. & Ducluzeau, R. (1992).** Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. *Microb Releases* **1**, 165-71.
185. **Gruzza, M., Fons, M., Ouriet, M. F., Duval-Iflah, Y. & Ducluzeau, R. (1994).** Study of gene transfer *in vitro* and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microb Releases* **2**, 183-9.
186. **Guedin, S., Willery, E., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (1998).** Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **29**, 763-74.
187. **Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. & Guiso, N. (1998).** Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun* **66**, 1718-25.
188. **Guiso, N. (1999).** Physiopathologie moléculaire de l'infection par *Bordetella pertussis*. *Méd. Thérap. Pédiatr. Hors Série Janv.*, 19-24.
189. **Gunneriusson, E., Samuelson, P., Uhlen, M., Nygren, P. A. & Stahl, S. (1996).** Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *J Bacteriol* **178**, 1341-6.
190. **Gupta, R. K. & Siber, G. R. (1995).** Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**, 1263-76.
191. **Gurunathan, S., Klinman, D. M. & Seder, R. A. (2000).** DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-74.
192. **Gustafsson, L., Hallander, H. O., Olin, P., Reizenstein, E. & Storsaeter, J. (1996).** A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med* **334**, 349-55.
193. **Guzman, C. A., Molinari, G., Fountain, M. W., Rohde, M., Timmis, K. N. & Walker, M. J. (1993).** Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral vaccination with liposomes coated with filamentous hemagglutinin and pertussis toxoid. *Infect Immun* **61**, 573-9.
194. **Guzman, C. A., Weiss, S. & Chakraborty, T. (1997).** *Listeria monocytogenes* a promising vaccine carrier to evoke cellular immune responses. In: Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicle for Mucosal Immunization. J.M. Wells, G. Pozzi (eds). Berlin/Georgetown, Springer/Landes Bioscience., pp 145-73.

195. Haddad, D., Liljeqvist, S., Kumar, S., Hansson, M., Stahl, S., Perlmann, H., Perlmann, P. & Berzins, K. (1995). Surface display compared to periplasmic expression of a malarial antigen in *Salmonella typhimurium* and its implications for immunogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**, 175-86.
196. Haffkine, W. M. (1897). Remarks on the plague prophylactic fluid. *Br. Med. J.* **1**, 1461.
197. Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W. P. & Schiffrin, E. J. (2000). Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria *in vitro*: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun* **68**, 752-9.
198. Halperin, S. A., Bortolussi, R., Langley, J. M., Eastwood, B. J. & De Serres, G. (1999). A randomized, placebo-controlled trial of erythromycin estolate chemoprophylaxis for household contacts of children with culture-positive *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* **104**, e42.
199. Hamann, L., El-Samalouti, V., Ulmer, A. J., Flad, H. D. & Rietschel, E. T. (1998). Components of gut bacteria as immunomodulators. *Int J Food Microbiol* **41**, 141-54.
200. Hannah, J. H., Menozzi, F. D., Renauld, G., Locht, C. & Brennan, M. J. (1994). Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* **62**, 5010-9.
201. Hansson, M., Stahl, S., Nguyen, T. N., Bachi, T., Robert, A., Binz, H., Sjolander, A. & Uhlen, M. (1992). Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **174**, 4239-45.
202. Hargreaves, R. M., Slack, M. P., Howard, A. J., Anderson, E. & Ramsay, M. E. (1996). Changing patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales after introduction of the Hib vaccination programme. *Bmj* **312**, 160-1.
203. Harokopakis, E., Hajishengallis, G. & Michalek, S. M. (1998). Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infect Immun* **66**, 4299-304.
204. Harvill, E. T., Preston, A., Cotter, P. A., Allen, A. G., Maskell, D. J. & Miller, J. F. (2000). Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* **68**, 6720-8.
205. Hathaway, L. J. & Kraehenbuhl, J. P. (2000). The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* **57**, 323-32.
206. Hautefort, I. (1998). Facteurs de colonisation et expression de protéines hétérologues chez *Lactobacillus fermentum*. Thèse de Doctorat. Université Paris XI.
207. Havenaar, R., Ten Brink, B. & Huis in't Veld, J. H. J. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Probiotics: the scientific basis. R. Fuller (ed). Chapman and Hall, London., pp 209-24.
208. Hayes, F., Daly, C. & Fitzgerald, G. (1990). Identification of the minimal replicon of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 plasmid pCI305. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 202-209.
209. Hazenbos, W. L., van den Berg, B. M., Geuijen, C. W., Mooi, F. R. & van Furth, R. (1995). Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* **155**, 3972-8.
210. Heiss, L. N., Moser, S. A., Unanue, E. R. & Goldman, W. E. (1993). Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* **61**, 3123-8.
211. Heiss, L. N., Lancaster, J. R., Jr., Corbett, J. A. & Goldman, W. E. (1994). Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 267-70.

212. **Heritage, P. L., Underdown, B. J., Brook, M. A. & McDermott, M. R. (1998).** Oral administration of polymer-grafted starch microparticles activates gut-associated lymphocytes and primes mice for a subsequent systemic antigen challenge. *Vaccine* **16**, 2010-7.
213. **Hessle, C., Hanson, L. A. & Wold, A. E. (1999).** Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* **116**, 276-82.
214. **Hewlett, E. (1995).** *Bordetella* species. In: Principles and practice of infectious diseases. G.L. Mandell, R.G.Jr. Douglas, J.E. Bennett (eds): Churchill Livingstone, New York., pp2078-2084.
215. **Hoch, D. H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., DasGupta, B. R. & Simpson, L. L. (1985).** Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1692-6.
216. **Hoffman, S. L. & Doolan, D. L. (2000).** Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. *Nat Med* **6**, 1218-9.
217. **Holland, B. (1998).** Autotransporters: protein contortionists whose carboxyl termini translocate their own amino-terminal domains. *Trends Microbiol* **6**, 388-9.
218. **Hollingshead, S. K., Fischetti, V. A. & Scott, J. R. (1986).** Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A *Streptococcus*. Repetitive structure and membrane anchor. *J Biol Chem* **261**, 1677-86.
219. **Holmgren, J., Lycke, N. & Czerkinsky, C. (1993).** Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* **11**, 1179-84.
220. **Hols, P., Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Chabot, P., Delplace, B., Delcour, J. & Mercenier, A. (1997).** Efficient secretion of the model antigen M6-gp41E in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Microbiology* **143**, 2733-41.
221. **Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A. & McMenamin, P. G. (1990).** Dendritic cells in the respiratory tract. *Int Rev Immunol* **6**, 139-49.
222. **Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis in't Veld, J. H. (1998).** Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* **41**, 85-101.
223. **Hopkins, S., Kraehenbuhl, J. P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., de Grandi, P. & Nardelli-Haeffliger, D. (1995).** A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* **63**, 3279-86.
224. **Hoppe, J. E. (1992).** Comparison of erythromycin estolate and erythromycin ethylsuccinate for treatment of pertussis. The Erythromycin Study Group. *Pediatr Infect Dis J* **11**, 189-93.
225. **Horaud, T., Le Bouguenec, C. & Pepper, K. (1985).** Molecular genetics of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS) in streptococci. *J Antimicrob Chemother* **16 Suppl A**, 111-35.
226. **Horodniceanu, T., Bouanchaud, D. H., Bieth, G. & Chabbert, Y. A. (1976).** R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother* **10**, 795-801.
227. **Hsu, K. H., Lubeck, M. D., Davis, A. R., Bhat, R. A., Selling, B. H., Bhat, B. M., Mizutani, S., Murphy, B. R., Collins, P. L., Chanock, R. M. & et al. (1992).** Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5, and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. *J Infect Dis* **166**, 769-75.
228. **Hu, K. F., Ekstrom, J., Merza, M., Lovgren-Bengtsson, K. & Morein, B. (1999).** Induction of antibody responses in the common mucosal immune system by respiratory syncytial virus immunostimulating complexes. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**, 191-8.

229. Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. & Sato, Y. (1983). Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl) beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **41**, 1138-43.
230. Imler, J. L. (1995). Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* **13**, 1143-51.
231. Inman, L. R. & Cantey, J. R. (1983). Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest* **71**, 1-8.
232. Ishibashi, Y., Claus, S. & Relman, D. A. (1994). *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med* **180**, 1225-33.
233. Ishibashi, Y., Relman, D. A. & Nishikawa, A. (2001). Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: Possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb Pathog* **30**, 279-88.
234. Ishii, H., Kobayashi, Y., Kuroki, M. & Kodama, Y. (1988). Protection of mice from lethal infection with Aujeszky's disease virus by immunization with purified gVI. *J Gen Virol* **69**, 1411-4.
235. Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* **73**, 444S-450S.
236. Iwaki, M., Okahashi, N., Takahashi, I., Kanamoto, T., Sugita-Konishi, Y., Aibara, K. & Koga, T. (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* **58**, 2929-34.
237. Jabbal-Gill, I., Fisher, A. N., Rappuoli, R., Davis, S. S. & Illum, L. (1998). Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine* **16**, 2039-46.
238. Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clement, E., Menozzi, F. D. & Locht, C. (1996). Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **19**, 65-78.
239. Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renaud-Mongenie, G. & Locht, C. (1997). Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. *J Bacteriol* **179**, 775-83.
240. Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guedin, S., Willery, E., Molle, G. & Locht, C. (1999). Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **274**, 37731-5.
241. Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Antoine, R. (2001). Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**, 306-13.
242. Jahns, A., Schafer, A., Geis, A. & Teuber, M. (1991). Identification, cloning and sequencing of the replication region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetylactis Bu2 citrate plasmid pSL2. *FEMS Microbiol Lett* **64**, 253-8.
243. Janniere, L., Bruand, C. & Ehrlich, S. D. (1990). Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene* **87**, 53-61.
244. Jenner, E. (1798). An inquiry into the causes and effects of the Variolae vaccine. Low, London.
245. Johansson, E. L., Rask, C., Fredriksson, M., Eriksson, K., Czerkinsky, C. & Holmgren, J. (1998). Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. *Infect Immun* **66**, 514-20.
246. Jones, B. D., Ghorri, N. & Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**, 15-23.

247. Josson, K., Scheirlinck, T., Michiels, F., Platteeuw, C., Stanssens, P., Joos, H., Dhaese, P., Zabeau, M. & Mahillon, J. (1989). Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid* **21**, 9-20.
248. Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H. & Mahillon, J. (1990). *Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists of two functional cassettes commonly found in other gram-positive organisms. *J Bacteriol* **172**, 3089-99.
249. Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E. & Kagnoff, M. F. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95**, 55-65.
250. Kaetzel, C. S., Robinson, J. K. & Lamm, M. E. (1994). Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J Immunol* **152**, 72-6.
251. Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S. & Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* **32**, 141-4.
252. Kamata, Y., Kimura, Y., Hiroi, T., Sakaguchi, G. & Kozaki, S. (1993). Purification and characterization of the ganglioside-binding fragment of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin. *Biochim Biophys Acta* **1156**, 213-8.
253. Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds). Williams and Wilkins, Baltimore M.D., pp 1209-1234.
254. Kaufmann, S. H. & Hess, J. (2000). Immune response against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for vaccine development. *J Biotechnol* **83**, 13-7.
255. Kerneis, S., Bogdanova, A., Colucci-Guyon, E., Kraehenbuhl, J. P. & Pringault, E. (1996). Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. *Gastroenterology* **110**, 515-21.
256. Kersters, K., Hinz, K., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegmann, O. & De Ley, J. (1984). *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 56-70.
257. Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N. (1992). Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* **12**, 227-35.
258. Khelef, N., Zychlinsky, A. & Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* **61**, 4064-71.
259. Khelef, N., Bachelet, C. M., Vargaftig, B. B. & Guiso, N. (1994). Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun* **62**, 2893-900.
260. Kiewiet, R., Bron, S., de Jonge, K., Venema, G. & Seegers, J. F. (1993). Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2. *Mol Microbiol* **10**, 319-27.
261. Kilian, M., Mestecky, J. & Russell, M. W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* **52**, 296-303.
262. Killeen, K., Sprigos, D. & Mekalanos, J. (1998). Bacterial mucosal vaccines: *Vibrio cholerae* as a live attenuated vaccine/vector paradigm. *Curr Top Microbiol Immunol* **236**, 237-254.

263. Kimura, A., Mountzouros, K. T., Relman, D. A., Falkow, S. & Cowell, J. L. (1990). *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* **58**, 7-16.
264. Kinnear, S. M., Boucher, P. E., Stibitz, S. & Carbonetti, N. H. (1999). Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **181**, 5234-41.
265. Kjellen, L. & Lindhal, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
266. Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-49.
267. Klaenhammer, T. R. (1995). Genetics of intestinal lactobacilli. *International Dairy Journal* **5**, 1019-1058.
268. Klein, J. R., Ulrich, C. & Plapp, R. (1993). Characterization and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683 and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors. *Plasmid* **30**, 14-29.
269. Klijn, N., Weerkamp, A. H. & de Vos, W. M. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2771-4.
270. Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. & Krieg, A. M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2879-83.
271. Klinman, D. M., Barnhart, K. M. & Conover, J. (1999). CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* **17**, 19-25.
272. Koivula, T., Sibakov, M. & Palva, I. (1991). Isolation and characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* promoters. *Appl Environ Microbiol* **57**, 333-40.
273. Kolle, W. (1896). Zur aktiven immunisierung der menschen gegen cholera. *Cent. bl. Bakteriologie. I. Abt.* **19**, 97-104.
274. Kozaki, S., Ogasawara, J., Shimote, Y., Kamata, Y. & Sakaguchi, G. (1987). Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids. *Infect Immun* **55**, 3051-6.
275. Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* **72**, 853-79.
276. Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. & Loch, C. (1995). Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol* **177**, 642-53.
277. Kullen, M. J. & Klaenhammer, T. R. (1999). Genetic modification of lactobacilli and bifidobacteria. In: Probiotics: a critical review, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
278. Kurikka, S., Olander, R. M., Eskola, J. & Kayhty, H. (1996). Passively acquired anti-tetanus and anti-*Haemophilus* antibodies and the response to *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy. *Pediatr Infect Dis J* **15**, 530-5.
279. Kurland, C. & Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 489-93.
280. Lacey, B. (1960). Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.* **58**, 57-93.
281. Ladant, D. (1988). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem* **263**, 2612-8.

282. **Ladant, D. & Ullmann, A. (1999).** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**, 172-6.
283. **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
284. **Lambert, C., Jacob-Dubuisson, F. & Locht, C. (1999).** Les aspects moléculaires des facteurs de virulence de *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Méd. Thérap. Pédiatr. Hors Série Janv.*, 25-31.
285. **Lambert-Buisine, C., Willery, E., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (1998).** N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **28**, 1283-93.
286. **Lamm, M. E. (1997a).** Review article: Epithelial disposition of antigen. *Aliment Pharmacol Ther* **11 Suppl** **3**, 40-4; discussion 44-6.
287. **Lamm, M. E. (1997b).** Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* **51**, 311-40.
288. **Larsen, D. L., Dybdahl-Sissoko, N., McGregor, M. W., Drape, R., Neumann, V., Swain, W. F., Lunn, D. P. & Olsen, C. W. (1998).** Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol* **72**, 1704-8.
289. **Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T. C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M. & Kagnoff, M. F. (1997).** *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun* **65**, 5067-73.
290. **Lauterslager, T. G., Florack, D. E., van der Wal, T. J., Molthoff, J. W., Langeveld, J. P., Bosch, D., Boersma, W. J. & Hilgers, L. A. (2001).** Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* **19**, 2749-55.
291. **LeBlanc, D. J., Lee, L. N. & Abu-Al-Jaibat, A. (1992).** Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid* **28**, 130-45.
292. **Leclerc, C., Charbit, A., Martineau, P., Deriaud, E. & Hofnung, M. (1991).** The cellular location of a foreign B cell epitope expressed by recombinant bacteria determines its T cell-independent or T cell-dependent characteristics. *J Immunol* **147**, 3545-52.
293. **Leenhouts, K., Buist, G. & Kok, J. (1999).** Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 367-76.
294. **Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. & Seegers, J. F. (1991).** Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid* **26**, 55-66.
295. **Leenhouts, K. J. & Venema, G. (1993).** Lactococcal plasmid vectors. *Plasmids. A practical Approach*. Edited by Hardy, K.G. Oxford University Press, New York, 65-94.
296. **Leer, R. J., van Luijk, N., Posno, M. & Pouwels, P. H. (1992).** Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Mol Gen Genet* **234**, 265-74.
297. **Lehner, T., Brookes, R., Panagiotidi, C., Tao, L., Klavinskis, L. S., Walker, J., Walker, P., Ward, R., Hussain, L., Gearing, J. H. & et al. (1993).** T- and B-cell functions and epitope expression in nonhuman primates immunized with simian immunodeficiency virus antigen by the rectal route. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8638-42.
298. **Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J. G., Charles, I. G., Fairweather, N., Novotny, P. & Brennan, M. J. (1991).** Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 345-9.

299. Leininger, E., Bowen, S., Renauld-Mongenie, G., Rouse, J. H., Menozzi, F. D., Locht, C., Heron, I. & Brennan, M. J. (1997). Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J Infect Dis* **175**, 1423-31.
300. Leusch, M. S., Paulaitis, S. & Friedman, R. L. (1990). Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: production, purification, and partial characterization. *Infect Immun* **58**, 3621-6.
301. Levine, M. M. & Noriega, F. (1995). A review of the current status of enteric vaccines. *P N G Med J* **38**, 325-31.
302. Levine, M. M., Galen, J., Barry, E., Noriega, F., Chatfield, S., Szein, M., Dougan, G. & Tacket, C. (1996). Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. *J Biotechnol* **44**, 193-6.
303. Li, J., Fairweather, N. F., Novotny, P., Dougan, G. & Charles, I. G. (1992). Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J Gen Microbiol* **138**, 1697-705.
304. Liljeqvist, S., Samuelson, P., Hansson, M., Nguyen, T. N., Binz, H. & Stahl, S. (1997). Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2481-8.
305. Liljeqvist, S., Cano, F., Nguyen, T. N., Uhlen, M., Robert, A. & Stahl, S. (1999). Surface display of functional fibronectin-binding domains on *Staphylococcus carnosus*. *FEBS Lett* **446**, 299-304.
306. Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O. & Aeschlimann, J. M. (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10**, 55-63.
307. Liu, D. F., Phillips, E., Wizemann, T. M., Siegel, M. M., Tabei, K., Cowell, J. L. & Tuomanen, E. (1997). Characterization of a recombinant fragment that contains a carbohydrate recognition domain of the filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* **65**, 3465-8.
308. Livey, I. & Wardlaw, A. C. (1984). Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol* **17**, 91-103.
309. Livingston, J. B., Lu, S., Robinson, H. & Anderson, D. J. (1998). Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect Immun* **66**, 322-9.
310. Lobet, Y., Feron, C., Dequesne, G., Simoen, E., Hauser, P. & Locht, C. (1993). Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. *J Exp Med* **177**, 79-87.
311. Locht, C., Barstad, P. A., Coligan, J. E., Mayer, L., Munoz, J. J., Smith, S. G. & Keith, J. M. (1986). Molecular cloning of pertussis toxin genes. *Nucleic Acids Res* **14**, 3251-61.
312. Locht, C., Geoffroy, M. C. & Renauld, G. (1992). Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *Embo J* **11**, 3175-83.
313. Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renauld, G. (1993). The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella spp.* *Mol Microbiol* **9**, 653-60.
314. Locht, C. & Antoine, R. (1995). A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* **77**, 333-40.
315. Locht, C. (1999). Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int Microbiol* **2**, 137-44.
316. Locht, C. & Antoine, R. (1999). *Bordetella pertussis* protein toxins. In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 2nd edition. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds). Academic Press., pp 130-146.

317. **Locht, C. (2000).** Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective antigens. *Pharmaceutical Science and Technology Today. Current trends* **3**, 121-128.
318. **Locht, C., Antoine, R., Veithen, A. & Raze, D. (2000).** Pertussis toxin: structure-function relationship. *Handbook of Experimental Pharmacology* **145**, 167-185.
319. **Locht, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F. (2001).** *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* **4**, 82-9.
320. **Lockyer, C. R. & Gillatt, D. A. (2001).** BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *J R Soc Med* **94**, 119-23.
321. **Lopez, M. (1952).** El genero *Bordetella*. *Microbiol. Esp.* **5**, 177-183.
322. **Luker, K. E., Tyler, A. N., Marshall, G. R. & Goldman, W. E. (1995).** Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* **16**, 733-43.
323. **Lynch, A. S. & Wang, J. C. (1993).** Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* **175**, 1645-55.
324. **Ma, D., Mellon, J. & Niederkorn, J. Y. (1998).** Conditions affecting enhanced corneal allograft survival by oral immunization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 1835-46.
325. **Maassab, H. F. & DeBorde, D. C. (1985).** Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine* **3**, 355-69.
326. **Maassen, C. B., Laman, J. D., den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. J., van Holten-Neelen, J. C., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R. J., Pouwels, P. H., Boersma, W. J. & Shaw, D. M. (1999).** Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* **17**, 2117-28.
327. **Maassen, C. B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., Heijne den Bak-Glashouwer, M., Leer, R. J., Laman, J. D., Boersma, W. J. & Claassen, E. (2000).** Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* **18**, 2613-23.
328. **MacGregor, R. R., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Lacy, K. E., Gluckman, S. J., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Baine, Y., Higgins, T. J., Ciccarelli, R. B., Coney, L. R., Ginsberg, R. S. & Weiner, D. B. (1998).** First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* **178**, 92-100.
329. **Makhov, A. M., Hannah, J. H., Brennan, M. J., Trus, B. L., Kocsis, E., Conway, J. F., Wingfield, P. T., Simon, M. N. & Steven, A. C. (1994).** Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol* **241**, 110-24.
330. **Makoff, A. J., Oxeer, M. D., Ballantine, S. P., Fairweather, N. F. & Charles, I. G. (1990).** Protective surface antigen P69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **8**, 1030-3.
331. **Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J. & Schrezenmeir, J. (2001).** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* **73**, 430S-436S.
332. **Martin, M. C., Alonso, J. C., Suarez, J. E. & Alvarez, M. A. (2000).** Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2599-604.

333. Mason, H. S., Lam, D. M. & Arntzen, C. J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11745-9.
334. Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K. & Arntzen, C. J. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5335-40.
335. Mazanec, M. B., Kaetzel, C. S., Lamm, M. E., Fletcher, D. & Nedrud, J. G. (1992). Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6901-5.
336. Mazengia, E., Silva, E. A., Peppe, J. A., Timperi, R. & George, H. (2000). Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol* **38**, 2330-3.
337. McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J. & Hilleman, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178-80.
338. McDermott, M. R. & Snider, D. P. (1997). Nasal-associated lymphoid tissue in rodents: a unique structure. *Mucosal Immunol. Update* **5**, 10-12.
339. McGhee, D. W., Beagley, K. W., Aicher, W. K. & McGhee, J. R. (1992). Transforming growth factor-beta enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Immunology* **77**, 7-12.
340. McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M. & Kiyono, H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**, 75-88.
341. McGuirk, P. & Mills, K. H. (2000). Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* **30**, 415-22.
342. Medaglini, D., Pozzi, G., King, T. P. & Fischetti, V. A. (1995). Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6868-72.
343. Medaglini, D., Ricci, S., Maggi, T., Rush, C. M., Manganelli, R., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (1997a). Recombinant Gram-positive bacteria as vehicles vaccine antigens. *Biotechnology Annual Review* **3**, 297-312.
344. Medaglini, D., Rush, C. M., Sestini, P. & Pozzi, G. (1997b). Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine* **15**, 1330-7.
345. Medaglini, D., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (1998). Vaginal immunization with recombinant gram-positive bacteria. *Am J Reprod Immunol* **39**, 199-208.
346. Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, M. R., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (2001). Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* **19**, 1931-9.
347. Medina, E., Talay, S. R., Chhatwal, G. S. & Guzman, C. A. (1998a). Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur J Immunol* **28**, 1069-77.
348. Medina, E., Talay, S. R., Chhatwal, G. S. & Guzman, C. A. (1998b). Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* promotes T cell-independent proliferation of murine B lymphocytes and enhances the expression of MHC class II molecules on antigen-presenting cells. *Int Immunol* **10**, 1657-64.
349. Medina, E., Paglia, P., Nikolaus, T., Muller, A., Hensel, M. & Guzman, C. A. (1999). Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun* **67**, 1093-9.

350. **Medina, E. & Guzman, C. A. (2000).** Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**, 305-11.
351. **Medina, E. & Guzman, C. A. (2001).** Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**, 1573-1580.
352. **Mekalanos, J. J. (1992).** Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**, 1-7.
353. **Menozi, F. D., Gantiez, C. & Locht, C. (1991).** Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 59-64.
354. **Menozi, F. D., Boucher, P. E., Riveau, G., Gantiez, C. & Locht, C. (1994a).** Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**, 4261-9.
355. **Menozi, F. D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J. H., Leininger, E., Brennan, M. J. & Locht, C. (1994b).** Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**, 769-78.
356. **Mercenier, A., Pouwels, P. H. & Chassy, B. M. (1994).** Genetic engineering of lactobacilli, leuconostocs and *Streptococcus thermophilus*. In: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. M.J. Gasson and W.M. De Vos (eds). Chapman and Hall, Oxford., pp 252-293.
357. **Mercenier, A. (1996).** Development of lactic acid bacteria as live vectors for oral or local vaccines. *Adv Food Sci* **18**, 73-77.
358. **Mercenier, A., Müller-Alouf, H. & Grangette, C. (2000).** Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues in Molecular Biology* **2**, 17-25.
359. **Merkel, T. J. & Stibitz, S. (1995).** Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **177**, 2727-36.
360. **Merkel, T. J., Stibitz, S., Keith, J. M., Leef, M. & Shahin, R. (1998).** Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **66**, 4367-73.
361. **Mestecky, J. (1987).** The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* **7**, 265-76.
362. **Mestecky, J. & McGhee, J. R. (1987).** Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* **40**, 153-245.
363. **Mestecky, J. & McGhee, J. R. (1992).** Prospects for human mucosal vaccines. *Adv Exp Med Biol* **327**, 13-23.
364. **Mestecky, J., Michalek, S. M., Moldoveanu, Z. & Russell, M. W. (1997).** Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt*, 33-43.
365. **Metchnikoff, E. (1908).** Prolongation of life. New York: Putman.
366. **Meydani, S. N. & Ha, W. K. (2000).** Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* **71**, 861-72.
367. **Michalek, S. M., Eldrige, J. H., Curtiss III, R. & Rosenthal, K. L. (1994).** Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In: Handbook of Mucosal Immunology. P.L. Ogra, M.D. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J.R. McGhee, J. Bienenstock (eds). San Diego, Academic Press Inc., pp 373-90.
368. **Michetti, P., Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. & Neutra, M. R. (1992).** Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **60**, 1786-92.

369. **Middendorf, B. & Gross, R. (1999).** Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet* **262**, 189-98.
370. **Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A. M., Pierce, R. J., Locht, C., Capron, A. & Riveau, G. (1997).** Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect Immun* **65**, 544-50.
371. **Mielcarek, N., Riveau, G., Remoue, F., Antoine, R., Capron, A. & Locht, C. (1998).** Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nat Biotechnol* **16**, 454-7.
372. **Mielcarek, N., Nordstrom, I., Menozzi, F. D., Locht, C. & Holmgren, J. (2000).** Genital antibody responses in mice after intranasal infection with an attenuated candidate vector strain of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**, 485-91.
373. **Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M. & Julkunen, I. (1998).** Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* **66**, 6058-62.
374. **Miller, L. A., Johns, B. E., Elias, D. J. & Killian, G. J. (1999).** Oral vaccination of white-tailed deer using a recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* vaccine expressing the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: prospects for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* **41**, 279-85.
375. **Miller, L. H. & Hoffman, S. L. (1998).** Research toward vaccines against malaria. *Nat Med* **4**, 520-4.
376. **Mills, K. H., Ryan, M., Ryan, E. & Mahon, B. P. (1998).** A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **66**, 594-602.
377. **Minton, N. (1995).** In: Clostridial neurotoxins: the molecular pathogenesis of tetanus and botulism. Montecucco C (ed). Springer, Berlin, Germany., pp 161-194.
378. **Mock, M. & Ullmann, A. (1993).** Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol* **1**, 187-92.
379. **Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M. L., Ahrne, S., Nobaek, S., Stahl, M. & Bengmark, S. (1993).** Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J Appl Bacteriol* **74**, 314-23.
380. **Mollenkopf, H., Dietrich, G. & Kaufmann, S. H. (2001).** Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol Chem* **382**, 521-32.
381. **Montecucco, C. & Schiavo, G. (1993).** Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* **18**, 324-7.
382. **Montecucco, C. & Schiavo, G. (1995).** Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys* **28**, 423-72.
383. **Mooi, F. (1994).** Gene for the filamentous hemagglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*: colocation, coregulation, and cooperation? In: Molecular genetics of bacterial pathogenesis. V.L. Miller (ed). Washington, ASM Press., pp 145-55.
384. **Mor, T. S., Gomez-Lim, M. A. & Palmer, K. E. (1998).** Perspective: edible vaccines--a concept coming of age. *Trends Microbiol* **6**, 449-53.
385. **Moreau, M. & Gaboriau-Routhiau, V. (2000).** Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue. In: Probiotics vol 3. R. Fuller and G. Perdigon (eds). Kluwer academic publishers., pp 69-114.

386. **Mortimer, E. A. (1994).** Pertussis vaccine. In: Vaccines, 2nd edn. S.A. Plotkin, E.A. Mortimer (eds). Saunders, Philadelphia., pp 91-136.
387. **Mosmann, T. R. & Sad, S. (1996).** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**, 138-46.
388. **Mukamoto, M., Watanabe, I., Kobayashi, Y., Icatlo, F. C., Jr., Ishii, H. & Kodama, Y. (1991).** Immunogenicity in Aujeszky's disease virus structural glycoprotein gVI (gp50) in swine. *Vet Microbiol* **29**, 109-21.
389. **Muller-Alouf, H., Grangette, C., Goudercourt, D., Reveneau, N. & Mercenier, A. (1999).** Comparative cytokine inducing pattern of lactic acid bacteria used for mucosal vaccine development. *Immunology Letters* **69**, 33.
390. **Munoz, J. (1985).** Biological activities of pertussis toxin. In: Pertussis Toxin. R.D. Sekura, J. Moss, M. Vaughn (eds). Orlando, FL: Academic Press., pp1-18.
391. **Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1994).** Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **14**, 115-21.
392. **Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1999).** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 174-229.
393. **Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 113-28.
394. **Neutra, M. R., Frey, A. & Kraehenbuhl, J. P. (1996).** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**, 345-8.
395. **Nguyen, T. N., Hansson, M., Stahl, S., Bachi, T., Robert, A., Domzig, W., Binz, H. & Uhlen, M. (1993).** Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene* **128**, 89-94.
396. **Nguyen, T. N., Gourdon, M. H., Hansson, M., Robert, A., Samuelson, P., Libon, C., Andreoni, C., Nygren, P. A., Binz, H., Uhlen, M. & et al. (1995).** Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *J Biotechnol* **42**, 207-19.
397. **Norton, P. M., Le Page, R. W. F. & Wells, J. M. (1995).** Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol* **40**, 225-30.
398. **Norton, P. M., Brown, H. W., Wells, J. M., Macpherson, A. M., Wilson, P. W. & Le Page, R. W. (1996).** Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**, 167-77.
399. **Norton, P. M., Wells, J. M., Brown, H. W., Macpherson, A. M. & Le Page, R. W. (1997).** Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* **15**, 616-9.
400. **Novick, R. P. (1989).** Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol* **43**, 537-65.
401. **Nugent, J., Po, A. L. & Scott, E. M. (1998).** Design and delivery of non-parenteral vaccines. *J Clin Pharm Ther* **23**, 257-85.
402. **O'Donnell, M. A. (1997).** The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic tool. *Trends Biotechnol* **15**, 512-7.
403. **Ogawa, T., Suda, Y., Kashihara, W., Hayashi, T., Shimoyama, T., Kusumoto, S. & Tamura, T. (1997).** Immunobiological activities of chemically defined lipid A from *Helicobacter pylori* LPS in comparison with *Porphyromonas gingivalis* lipid A and *Escherichia coli*-type synthetic lipid A (compound 506). *Vaccine* **15**, 1598-605.

404. **Oggioni, M. R., Manganelli, R., Contorni, M., Tommasino, M. & Pozzi, G. (1995).** Immunization of mice by oral colonization with live recombinant commensal streptococci. *Vaccine* **13**, 775-9.
405. **Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (1996).** A host-vector system for heterologous gene expression in *Streptococcus gordonii*. *Gene* **169**, 85-90.
406. **Orrhage, K. & Nord, C. E. (2000).** Bifidobacteria and lactobacilli in human health. *Drugs Exp Clin Res* **26**, 95-111.
407. **Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. & Sebo, P. (2000).** Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* **68**, 247-56.
408. **Owen, R. L. & Jones, A. L. (1974).** Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* **66**, 189-203.
409. **Owen, R. L. (1977).** Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* **72**, 440-51.
410. **Owen, R. L., Pierce, N. F., Apple, R. T. & Cray, W. C., Jr. (1986).** M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis* **153**, 1108-18.
411. **Pappo, J. & Ermak, T. H. (1989).** Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol* **76**, 144-8.
412. **Pardigon, N. & Laouini, D. (1999).** New millenium. The need for new vaccines. *C R Acad Sci III* **322**, 913-7.
413. **Parton, R., Hall, E. & Wardlaw, A. C. (1994).** Responses to *Bordetella pertussis* mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis. *J Med Microbiol* **40**, 307-12.
414. **Pasteur, L. (1880).** De l'atténuation du virus du cholera des poules. *C.R. Acad. Sci. Paris* **91**, 673-680.
415. **Pasteur, L., Chamberland, C. E. & Roux, R. (1881).** Sur la vaccination charbonneuse. *C.R. Acad. Sci. Paris* **92**, 1378-1383.
416. **Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M. C., Grangette, C., Kleerebezem, M. & Mercenier, A. (2000).** Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool To study In vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4427-32.
417. **Peeters, B. P., de Boer, J. H., Bron, S. & Venema, G. (1988).** Structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*: effect of direct and inverted repeats. *Mol Gen Genet* **212**, 450-8.
418. **Peijnenburg, A. C., Bron, S. & Venema, G. (1988).** Plasmid deletion formation in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **20**, 23-32.
419. **Peijnenburg, A. C., Breed, P. V., Bron, S. & Venema, G. (1989).** Plasmid deletion formation in recE4 and addB72 mutants of *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **21**, 205-15.
420. **Peyer, H. C. (1677).** Exercitatio anatomico-medica de glandulis intestinorum, earumque usu et affectionibus. Schafhausen Switzerland, Onophrius et Waldkirch.
421. **Piard, J. C., Hautefort, I., Fischetti, V. A., Ehrlich, S. D., Fons, M. & Gruss, A. (1997).** Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **179**, 3068-72.

422. Piatti, G. (1999). Identification of immunodominant epitopes in the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**, 235-41.
423. Plotkin, S. A. & Cadoz, M. (1997). Acellular vaccine efficacy trials. *Pediatr Infect Dis J* **16**, 913-4.
424. Plotkin, S. A. (1999). Vaccination against the major infectious diseases. *C R Acad Sci III* **322**, 943-51.
425. Pollock, T. M., Miller, E., Mortimer, J. Y. & Smith, G. (1984). Symptoms after primary immunisation with DTP and with DT vaccine. *Lancet* **2**, 146-9.
426. Popoff, M. & Marvaud, J. (1999). Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 2nd edition. J.E. Alouf and J.H. Freer (eds). Academic Press., pp 174-201.
427. Poquet, I., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**, 1904-12.
428. Porter, D. C., Wang, J., Moldoveanu, Z., McPherson, S. & Morrow, C. D. (1997). Immunization of mice with poliovirus replicons expressing the C- fragment of tetanus toxin protects against lethal challenge with tetanus toxin. *Vaccine* **15**, 257-64.
429. Posno, M., Leer, R. J., Van Luik, K., Van Giesen, N. M. J. F., Heuvelmans, B. C., Lockman, P. T. H. M. & Pouwels, P. H. (1991). Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1822-1828.
430. Poulain-Godefroy, O., Mielcarek, N., Ivanoff, N., Remoue, F., Schacht, A. M., Phillips, N., Loch, C., Capron, A. & Riveau, G. (1998). *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin enhances the immunogenicity of liposome-delivered antigen administered intranasally. *Infect Immun* **66**, 1764-7.
431. Pouwels, P. H. & Leer, R. J. (1993). Genetics of lactobacilli: plasmids and gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 85-107.
432. Pouwels, P. H., Leer, R. J. & Boersma, W. J. (1996). The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* **44**, 183-92.
433. Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J. & Conway, P. L. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol* **41**, 155-67.
434. Pozzi, G., Musmanno, R. A., Renzoni, E. A., Oggioni, M. R. & Cusi, M. G. (1988). Host-vector system for integration of recombinant DNA into chromosomes of transformable and nontransformable streptococci. *J Bacteriol* **170**, 1969-72.
435. Pozzi, G., Contorni, M., Oggioni, M. R., Manganelli, R., Tommasino, M., Cavalieri, F. & Fischetti, V. A. (1992a). Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infect Immun* **60**, 1902-7.
436. Pozzi, G., Oggioni, M. R., Manganelli, R. & Fischetti, V. A. (1992b). Expression of M6 protein gene of *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus gordonii* after chromosomal integration and transcriptional fusion. *Res Microbiol* **143**, 449-57.
437. Pozzi, G., Oggioni, M. R., Manganelli, R., Medaglini, D., Fischetti, V. A., Fenoglio, D., Valle, M. T., Kunkl, A. & Manca, F. (1994). Human T-helper cell recognition of an immunodominant epitope of HIV-1 gp120 expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Vaccine* **12**, 1071-7.
438. Pozzi, G., Oggioni, M. R. & Medaglini, D. (1997). Recombinant *Streptococcus gordonii* as a live vehicle for vaccine antigens. In: Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. G. Pozzi and J.M. Wells (eds). Springer-Verlag, Berlin., pp 35-60.

439. Prasad, S. M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E. I. & Masure, H. R. (1993). Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**, 2780-5.
440. Premi, L., Sandine, W. E. & Elliker, P. R. (1972). Lactose-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus* species. *Appl Microbiol* **24**, 51-7.
441. Preston, N. (1988). Pertussis today. In: Pathogenesis and immunity in pertussis. A.C. Wardlaw, R. Parton (eds). John Wiley, London., pp 1-18.
442. Pridmore, D., Stefanova, T. & Mollet, B. (1994). Cryptic plasmids from *Lactobacillus helveticus* and their evolutionary relationship. *FEMS Microbiol Lett* **124**, 301-5.
443. Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
444. Quandt, J. & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21.
445. Rasmussen, S. J., Eckmann, L., Quayle, A. J., Shen, L., Zhang, Y. X., Anderson, D. J., Fierer, J., Stephens, R. S. & Kagnoff, M. F. (1997). Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest* **99**, 77-87.
446. Raychaudhuri, S. & Rock, K. L. (1998). Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nat Biotechnol* **16**, 1025-31.
447. Reid, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* **73**, 437S-443S.
448. Reizenstein, E., Johansson, B., Mardin, L., Abens, J., Mollby, R. & Hallander, H. O. (1993). Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **17**, 185-91.
449. Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukkonen, K. & Wright, S. D. (1990). Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1375-82.
450. Remoue, F., Poulain-Godefroy, O., Mielcarek, N., Pierce, R., Capron, A., Loch, C. & Riveau, G. (1997). Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* **22**, 305-13.
451. Renaud-Mongenien, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F. D. & Loch, C. (1996a). Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol* **178**, 1053-60.
452. Renaud-Mongenien, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A. M., Capron, A., Riveau, G. & Loch, C. (1996b). Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7944-9.
453. Rescigno, M., Citterio, S., Thery, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S. & Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Aug 17;96(17):9666]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5229-34.
454. Ricci, S., Medaglini, D., Rush, C. M., Marcello, A., Peppoloni, S., Manganelli, R., Palu, G. & Pozzi, G. (2000). Immunogenicity of the B monomer of *Escherichia coli* heat-labile toxin expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* **68**, 760-6.

455. Riveau, G., Poulain-Godefroy, O. P., Dupre, L., Remoue, F., Mielcarek, N., Locht, C. & Capron, A. (1998). Glutathione S-transferases of 28kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**, 87-94.
456. Robbe-Saule, V., Coynault, C. & Norel, F. (1995). The live oral typhoid vaccine Ty21a is a rpoS mutant and is susceptible to various environmental stresses. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 171-6.
457. Robert, A., Samuelson, P., Andreoni, C., Bachi, T., Uhlen, M., Binz, H., Nguyen, T. N. & Stahl, S. (1996). Surface display on staphylococci: a comparative study. *FEBS Lett* **390**, 327-33.
458. Roberts, M., Maskell, D., Novotny, P. & Dougan, G. (1990). Construction and characterization *in vivo* of *Bordetella pertussis aroA* mutants. *Infect Immun* **58**, 732-9.
459. Roberts, M., Cropley, I., Chatfield, S. & Dougan, G. (1993). Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine* **11**, 866-72.
460. Robinson, J. H. & Kehoe, M. A. (1992). Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. *Immunol Today* **13**, 362-7.
461. Robinson, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., Wells, J. M. & Le Page, R. W. (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* **15**, 653-7.
462. Rogel, A., Schultz, J. E., Brownlie, R. M., Coote, J. G., Parton, R. & Hanski, E. (1989). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J* **8**, 2755-60.
463. Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. & Ladant, D. (1995). Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* **270**, 26370-6.
464. Rosenbach, F. J. (1884). Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J.F. Bergan, Wiesbaden.
465. Roy, M. J. & Varvayanis, M. (1987). Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. *Cell Tissue Res* **248**, 645-51.
466. Rush (1997). Expression of vaccine antigens in *Lactobacillus*. In: Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. G. Pozzi and J.M. Wells (eds). Springer-Verlag, Berlin., pp 107-144.
467. Salminen, S., Isolauri, E. & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 347-58.
468. Salmon, D. E. & Smith, T. (1886). On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Am. Vet. Rev.* **10**, 63-69.
469. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
470. Samuelson, P., Hansson, M., Ahlberg, N., Andreoni, C., Gotz, F., Bachi, T., Nguyen, T. N., Binz, H., Uhlen, M. & Stahl, S. (1995). Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **177**, 1470-6.
471. Sansonetti, P. J. (1989). Atténuation de la virulence et construction de vaccins vivants. *Med. Maladies Infect.* **11**, 554-559.
472. Saron, M. F., Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A. & Leclerc, C. (1997). Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3314-9.

473. Sato, Y., Izumiya, K., Sato, H., Cowell, J. & Manclark, C. (1981). Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. *Infect Immun* **31**, 1223-1231.
474. Satoh, E., Ito, Y., Sasaki, Y. & Sasaki, T. (1997). Application of the extracellular alpha-amylase gene from *Streptococcus bovis* 148 to construction of a secretion vector for yogurt starter strains. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4593-6.
475. Saukkonen, K., Cabellos, C., Burroughs, M., Prasad, S. & Tuomanen, E. (1991). Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* **173**, 1143-9.
476. Savijoki, K., Kahala, M. & Palva, A. (1997). High level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals. *Gene* **186**, 255-62.
477. Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. (1991). Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *Embo J* **10**, 3971-5.
478. Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R. & Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832-5.
479. Schiffrin, E. J., Brassart, D., Servin, A. L., Rochat, F. & Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* **66**, 515S-520S.
480. Schlegel, L., Lemerle, S. & Geslin, P. (1998). *Lactobacillus* species as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**, 887-8.
481. Schleifer, K. & Kloos, W. (1975). Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and description of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 50-61.
482. Schleifer, K. & Fischer, U. (1982). Description of a new species in the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 153-156.
483. Schmidt, G., Goehring, U. M., Schirmer, J., Lerm, M. & Aktories, K. (1999). Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem* **274**, 31875-81.
484. Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D. & Model, P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *Embo J* **12**, 4803-11.
485. Schneewind, O., Fowler, A. & Faull, K. F. (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* **268**, 103-6.
486. Schroder, U. & Stahl, A. (1984). Crystallized dextran nanospheres with entrapped antigen and their use as adjuvants. *J Immunol Methods* **70**, 127-32.
487. Shahin, R. D., Witvliet, M. H. & Manclark, C. R. (1990). Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect Immun* **58**, 4063-8.
488. Shahin, R. D., Amsbaugh, D. F. & Leef, M. F. (1992). Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect Immun* **60**, 1482-8.
489. Shahin, R. D., Leef, M., Eldridge, J., Hudson, M. & Gilley, R. (1995). Adjuvant activity and protective immunity elicited by *Bordetella pertussis* antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun* **63**, 1195-200.

490. Shannon, J. L. & Fernandez, R. C. (1999). The C-terminal domain of the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* **181**, 5838-42.
491. Sharpe, M. (1981). The genus *Lactobacillus*. In: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schelgel (eds). Springer, New York., pp 1653-1679.
492. Shaw, D. M., Gaerthe, B., Leer, R. J., Van Der Stap, J. G., Smittenaar, C., Heijne Den Bak-Glashouwer, M., Thole, J. E., Tielen, F. J., Pouwels, P. H. & Havenith, C. E. (2000). Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing lactobacilli. *Immunology* **100**, 510-8.
493. Shyjan, A. M., Bertagnolli, M., Kenney, C. J. & Briskin, M. J. (1996). Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) demonstrates structural and functional similarities to the alpha 4 beta 7-integrin binding domains of murine MAdCAM-1, but extreme divergence of mucin-like sequences. *J Immunol* **156**, 2851-7.
494. Sicinski, P., Rowinski, J., Warchol, J. B., Jarzabek, Z., Gut, W., Szczygiel, B., Bielecki, K. & Koch, G. (1990). Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* **98**, 56-8.
495. Siegrist, C. A. (2000). Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol* **19**, 195-219.
496. Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *BioTechnology* **1**, 784-791.
497. Simons, G., Rutten, G., Hornes, M., Nijhuis, M. & van Asseldonk, M. (1991). Production of prochymosin in lactococci. *Adv Exp Med Biol* **306**, 115-9.
498. Sirard, J. C., Niedergang, F. & Kraehenbuhl, J. P. (1999). Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* **171**, 5-26.
499. Sjolander, A., Cox, J. C. & Barr, I. G. (1998). ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* **64**, 713-23.
500. Skaugen, M. (1989). The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* **22**, 175-9.
501. Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Kleinpeter, P., Prozzi, D., Kieny, M. P., Delcour, J., Mercenier, A. & Hols, P. (1998). Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 29-36.
502. Smith, A. M., Guzman, C. A. & Walker, M. J. (2001). The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 309-33.
503. Snider, D. P., Marshall, J. S., Perdue, M. H. & Liang, H. (1994). Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J Immunol* **153**, 647-57.
504. Song, Y. L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C. X., Kato, H. & Watanabe, K. (1999). Identification of *Lactobacillus* species of human origin by a commercial kit, API50CHL. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* **10**, 77-82.
505. Staats, H. F. & McGhee, J. R. (1996). Application of basic principles of mucosal immunity to vaccine development. In: Mucosal Vaccines. H. Kiyono, P. L. Ogra and J. R. McGhee (eds). Academic Press, San Diego., pp 17-39.
506. Staats, H. F. & Ennis, F. A., Jr. (1999). IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens. *J Immunol* **162**, 6141-7.

507. Stahl, S., Samuelson, P., Hansson, M., Andreoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Liljeqvist, S., Gunneriusson, E., Binz, H., Nguyen, T. N. & Ulhen, M. (1997). Development of non-pathogenic *Staphylococci* as vaccine delivery vehicles. In: Pozzi G, Wells JM, editors. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicles for Mucosal Immunization*. Berlin/Georgetown, Springer/Landes Bioscience., 61-81.
508. Stahl, S., Robert, A., Gunneriusson, E., Wernerus, H., Cano, F., Liljeqvist, S., Hansson, M., Nguyen, T. N. & Samuelson, P. (2000). Staphylococcal surface display and its applications. *Int J Med Microbiol* **290**, 571-7.
509. Stainer, D. W. & Scholte, M. J. (1970). A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* **63**, 211-20.
510. Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W. & Wells, J. M. (1998a). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* **66**, 3183-9.
511. Steidler, L., Viaene, J., Fiers, W. & Remaut, E. (1998b). Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A. *Appl Environ Microbiol* **64**, 342-5.
512. Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. & Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-5.
513. Stein, P. E., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Cockle, S. A., Klein, M. H. & Read, R. J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45-57.
514. Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. & Falkow, S. (1989). Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**, 266-9.
515. Stibitz, S. & Yang, M. S. (1991). Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **173**, 4288-96.
516. Stibitz, S. (1994). Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol* **235**, 458-65.
517. Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* **36**, 1-29.
518. Strauss, A. & Gotz, F. (1996). *In vivo* immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*. *Mol Microbiol* **21**, 491-500.
519. Summers, D. K. (1991). The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol* **9**, 273-8.
520. Tacket, C. O., Mason, H. S., Losonsky, G., Clements, J. D., Levine, M. M. & Arntzen, C. J. (1998). Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* **4**, 607-9.
521. Takada, A., Shimizu, Y. & Kida, H. (1994). Protection of mice against Aujeszky's disease virus infection by intranasal vaccination with inactivated virus. *J Vet Med Sci* **56**, 633-7.
522. Takiguchi, R., Hashiba, H., Aoyama, K. & Ishii, S. (1989). Complete nucleotide sequence and characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1653-5.
523. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. & Ishii, S. (1982). Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**, 5516-22.

524. Tamura, S., Hatori, E., Tsuruhara, T., Aizawa, C. & Kurata, T. (1997). Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. *Vaccine* **15**, 225-9.
525. Tang, S., van Rij, R., Silvera, D. & Andino, R. (1997). Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity. *J Virol* **71**, 7841-50.
526. Tango, M., Suzuki, E., Gejyo, F. & Ushiki, T. (2000). The presence of specialized epithelial cells on the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the mouse. *Arch Histol Cytol* **63**, 81-9.
527. Tao, L., LeBlanc, D. J. & Ferretti, J. J. (1992). Novel streptococcal-integration shuttle vectors for gene cloning and inactivation. *Gene* **120**, 105-10.
528. Taylor, D. N., Sanchez, J. L., Castro, J. M., Lebron, C., Parrado, C. M., Johnson, D. E., Tacket, C. O., Losonsky, G. A., Wasserman, S. S., Levine, M. M. & Cryz, S. J. (1999). Expanded safety and immunogenicity of a bivalent, oral, attenuated cholera vaccine, CVD 103-HgR plus CVD 111, in United States military personnel stationed in Panama. *Infect Immun* **67**, 2030-4.
529. te Riele, H., Michel, B. & Ehrlich, S. D. (1986a). Are single-stranded circles intermediates in plasmid DNA replication? *Embo J* **5**, 631-7.
530. te Riele, H., Michel, B. & Ehrlich, S. D. (1986b). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2541-5.
531. Teitelbaum, R., Schubert, W., Gunther, L., Kress, Y., Macaluso, F., Pollard, J. W., McMurray, D. N. & Bloom, B. R. (1999). The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* **10**, 641-50.
532. Teuber, M., Geis, A. & Neve, H. (1991). The genus *Lactococcus*. In: The prokaryotes, Vol. II, 2nd edition. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (eds). Springer, New York., pp 1482-1501.
533. Thomas, M. G., Redhead, K. & Lambert, H. P. (1989). Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J Infect Dis* **159**, 211-8.
534. Thompson, H., McCandlish, I. A. & Wright, N. G. (1976). Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. *Res Vet Sci* **20**, 16-23.
535. Thomssen, R., Gerlich, W. H., Bottcher, U., Legler, K., Ritter, S., Stibbe, W., Weinmann, W., Klinge, O. & Pfeifer, U. (1983). Safety and potency aspects in the preparation of an experimental HBsAg vaccine. *Dev Biol Stand* **54**, 23-31.
536. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 515-47.
537. Tobio, M., Schwendeman, S. P., Guo, Y., McIver, J., Langer, R. & Alonso, M. J. (1999). Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine* **18**, 618-22.
538. Tomoda, T., Ogura, H. & Kurashige, T. (1991). Immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *J Infect Dis* **163**, 559-63.
539. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
540. Trinchieri, G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* **9**, 17-23.

541. **Tschernig, T. & Pabst, R. (2000).** Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* **68**, 1-8.
542. **Tuomanen, E. (1986).** Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **54**, 905-8.
543. **Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G., Braun, D., Larson, G., Hansson, G. C. & Hill, R. (1988).** Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med* **168**, 267-77.
544. **Uhl, M. A. & Miller, J. F. (1994).** Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1163-7.
545. **Uhl, M. A. & Miller, J. F. (1995).** *Bordetella pertussis* BvgAS virulence control system. In: HochJ, Silhavy T (eds) Two-Component Signal Transduction. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 333-349.
546. **Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A. & et al. (1993).** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-9.
547. **Umland, T. C., Wingert, L. M., Swaminathan, S., Furey, W. F., Schmidt, J. J. & Sax, M. (1997).** Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin [letter]. *Nat Struct Biol* **4**, 788-92.
548. **Urisu, A., Cowell, J. L. & Manclark, C. R. (1986).** Filamentous hemagglutinin has a major role in mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. *Infect Immun* **52**, 695-701.
549. **van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R. J., de Vos, W. M. & Simons, G. (1990).** Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* **95**, 155-60.
550. **van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J. & Venema, G. (1989).** Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 224-8.
551. **van den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Willems, R. J., Mooi, F. R. & van Furth, R. (1999).** Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun* **67**, 1056-62.
552. **van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Yuki, Y. & McGhee, J. R. (2000).** Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol* **165**, 4778-82.
553. **VanCott, J. L., Chatfield, S. N., Roberts, M., Hone, D. M., Hohmann, E. L., Pascual, D. W., Yamamoto, M., Kiyono, H. & McGhee, J. R. (1998).** Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat Med* **4**, 1247-52.
554. **Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K. & Hinz, K. H. (1996).** *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 849-58.
555. **van't Wout, J., Burnette, W. N., Mar, V. L., Rozdzinski, E., Wright, S. D. & Tuomanen, E. I. (1992).** Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun* **60**, 3303-8.
556. **Veithen, A., Raze, D. & Locht, C. (2000).** Intracellular trafficking and membrane translocation of pertussis toxin into host cells. *Int J Med Microbiol* **290**, 409-413.
557. **Vesa, T., Pochart, P. & Marteau, P. (2000).** Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* **14**, 823-8.

558. Viret, J. F., Cryz, S. J., Jr. & Favre, D. (1996). Expression of *Shigella sonnei* lipopolysaccharide in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **19**, 949-63.
559. Vitini, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., de Budeguer, M. V. & Perdigon, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* **24**, 223-32.
560. Vujcic, M. & Topisirovic, L. (1993). Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of *Lactobacillus plantarum* A112. *Appl Environ Microbiol* **59**, 274-80.
561. Wahdan, M. H., Rizk, F., el-Akkad, A. M., el-Ghoroury, A. A., Hablas, R., Girgis, N. I., Amer, A., Boctar, W., Sippel, J. E., Gotschlich, E. C., Triaui, R., Sanborn, W. R. & Cvjetanovic, B. (1973). A controlled field trial of a serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine. *Bull World Health Organ* **48**, 667-73.
562. Walmsley, A. M. & Arntzen, C. J. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 126-9.
563. Wang, B., Ugen, K. E., Srikantan, V., Agadjanyan, M. G., Dang, K., Refaeli, Y., Sato, A. I., Boyer, J., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4156-60.
564. Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A. & Hoffman, S. L. (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **282**, 476-80.
565. Wang, T. T. & Lee, B. H. (1997). Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit Rev Biotechnol* **17**, 227-72.
566. Ward, S. J., Douce, G., Figueiredo, D., Dougan, G. & Wren, B. W. (1999). Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium aroA aroD* vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* **67**, 2145-52.
567. Watts, A. M. & Kennedy, R. C. (1999). DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int J Parasitol* **29**, 1149-63.
568. Weiss, A. A. & Falkow, S. (1984). Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **43**, 263-9.
569. Weiss, A. A., Johnson, F. D. & Burns, D. L. (1993). Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2970-4.
570. Wells, J. M., Wilson, P. W., Norton, P. M., Gasson, M. J. & Le Page, R. W. (1993a). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* **8**, 1155-62.
571. Wells, J. M., Wilson, P. W., Norton, P. M. & Le Page, R. W. (1993b). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3954-9.
572. Wells, J. M., Norton, P. M. & Le Page, R. W. (1995). Progress in the development of mucosal vaccines based on *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal* **5**, 1071-1079.
573. Wells, J. M. & Pozzi, G. (1997). An overview of gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. In: Pozzi G, Wells JM, editors. *Gram-positive Bacteria as Vaccine Vehicles for Mucosal Immunization*. Berlin/Georgetown, Springer/Landes Bioscience., 1-8.
574. Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. & Stephensen, C. B. (2000). Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol* **74**, 6358-67.

575. Weyant, R. S., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Amin, M. F., Steigerwalt, A. G., O'Connor, S. P., Whitney, A. M., Daneshvar, M. I., Moss, C. W. & Brenner, D. J. (1995). *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* **33**, 1-7.
576. WHO (1999). The World Health Report, 1999: Making in difference, World Health Organization, Geneva.
577. Willems, R. J., van der Heide, H. G. & Mooi, F. R. (1992). Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol* **6**, 2661-71.
578. Willems, R. J., Geuijen, C., van der Heide, H. G., Matheson, M., Robinson, A., Versluis, L. F., Ebberink, R., Theelen, J. & Mooi, F. R. (1993). Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. *Mol Microbiol* **9**, 623-34.
579. Willems, R. J., Geuijen, C., van der Heide, H. G., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W. M., Locht, C. & Mooi, F. R. (1994). Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol* **11**, 337-47.
580. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-8.
581. Wollowski, I., Rechkemmer, G. & Pool-Zobel, B. L. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* **73**, 451S-455S.
582. Wright, P. F., Kim-Farley, R. J., de Quadros, C. A., Robertson, S. E., Scott, R. M., Ward, N. A. & Henderson, R. H. (1991). Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *N Engl J Med* **325**, 1774-9.
583. Yamamoto, S., Takeda, Y., Yamamoto, M., Kurazono, H., Imaoka, K., Fujihashi, K., Noda, M., Kiyono, H. & McGhee, J. R. (1997). Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvanticity. *J Exp Med* **185**, 1203-10.
584. Yanagishita, M. & Hascall, V. (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **267**, 9451-9454.
585. Yougman, P. (1987). Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn917 transpositions in *Bacillus* and other gram-positive bacteria. IRL, Oxford.
586. Zhang, J. M., Cowell, J. L., Steven, A. C., Carter, P. H., McGrath, P. P. & Manclark, C. R. (1985). Purification and characterization of fimbriae isolated from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **48**, 422-7.
587. Zhang, W. W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* **6**, 113-38.
588. Zhou, F., Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. (1995). Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. *Vaccine* **13**, 637-44.
589. Zu, T., Manetti, R., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (1996). Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol* **21**, 557-65.

*Annexe :*  
*Publications et communications*

---

## Articles

**Reveneau N.**, Alonso S., Jacob-Dubuisson F., Mercenier A. and Locht C. – 2001. Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*. Vaccine, sous presse.

Jacob-Dubuisson F., Kehoe B., Willery E., **Reveneau N.**, Locht C and Relman D. A. - 2000. Molecular characterisation of *Bordetella bronchiseptica*, filamentous hemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology*. 46:1211-1221

Alonzo S., **Reveneau N.**, Mercenier A. and Locht C. – 1999. Heterologous antigen presentation by filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Immunology Letters*. 69(1):176

Müller-Alouf H., Grangette C., Goudercourt D., **Reveneau N.** and Mercenier A. – 1999. Comparative cytokine inducing pattern of lactic acid bacteria used for mucosal vaccine development. *Immunology Letters*. 69(1):33

**Reveneau N.**, Geoffroy M.C., Locht C., Chagnaud P. and Mercenier A. Comparative Immunogenicity by local routes of recombinant *Lactobacillus plantarum* strains producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. Soumis.

**Reveneau N.**, Chagnaud P., Smal E. and Mercenier A. Study of the structural stability of plasmid constructions targeting the production of tetanus toxin fragment C in three different locations in *Lactobacillus plantarum*. En préparation.

Alonso S., **Reveneau N.**, Pethe K and Locht C. The 80 kDA N-terminal moiety of filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: immunogenicity, adherence and protective role. En préparation

Chagnaud P., Geoffroy M.C., Grangette C., Müller-Alouf H., **Reveneau N.**, Raze D. and Mercenier A. Intracellular plasmidic- or genomic-based expression of tetanus toxin fragment

C in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 induces similar systemic responses in mice. En préparation.

## Posters

**Reveneau N.**, Chagnaud P., Alonzo S., Geoffroy M. C., Locht C. and Mercenier A. - Comparison of two live vectors, *Bordetella pertussis* and *Lactobacillus plantarum*. 100th General Meeting of American Society for Microbiology. Los Angeles, May 2000.

Pavan S., Geoffroy M. C., **Reveneau N.**, Chagnaud P. and Mercenier A. - Expression of antigens in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Veldhoven, September 1999.

Grangette C., Müller-Alouf H., Pavan S., **Reveneau N.**, Coutte L., Goudercourt D., Marteau P. and Mercenier A. - Development of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 as live mucosal vaccin vector. 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Veldhoven, September 1999.

Geoffroy M. C., Chagnaud P., Pavan S., **Reveneau N.**, Goudercourt D., Grangette C., Müller-Alouf H. et Mercenier A. - Evaluation de *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 comme vecteur de vaccination. 5<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie, Avril 1998.

Alexandre H., **Reveneau N.**, Charpentier C. - Effets de différents stress sur le pH intracellulaire et l'accumulation de tréhalose chez *Saccharomyces cerevisiae*. Colloque de la Société Française de Microbiologie 1996 : microbiologie industrielle et environnement. Narbonne, Avril 1996.

## Communications orales

**Reveneau N.**, Alonso S., Jacob-Dubuisson F., Mercenier A. and Locht C. - Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*. Second Neovac plenary meeting. Annecy, September 2001.

**Reveneau N.**, Chagnaud P, Jacob-Dubuisson F, Locht C and Mercenier A. - Utilisation de *Bordetella pertussis* et de *Lactobacillus plantarum* comme vecteurs vivants de vaccination. Formation Doctorale en Immunologie (Université libre de Bruxelles et Université de Lille). Gosselie, Mars 2001.

**Reveneau N.**, Mercenier A. and Locht C. - Vectorisation mucoale, comparaison de *Bordetella pertussis* et de *Lactobacillus plantarum* comme vecteurs vivants de vaccination. Formation Doctorale en Immunologie (Université libre de Bruxelles et Université de Lille). Bruxelles, Novembre 1998.

## Résumé

Le développement de vaccins capables de stimuler le système immunitaire muqueux représente l'un des objectifs majeurs pour la recherche en vaccinologie. Cet objectif peut être atteint par administration d'antigènes protecteurs au niveau des muqueuses. Nous avons choisi d'utiliser des bactéries vivantes afin de délivrer l'antigène localement sous forme protégée et immunogénique. Dans cette étude, deux vecteurs vivants différents ont été testés pour leurs propriétés immunologiques : un mutant atténué de *Bordetella pertussis*, et *Lactobacillus plantarum*, une bactérie non pathogène. Les potentialités de chacun d'entre eux ont été évaluées en utilisant un antigène modèle, le fragment C de la toxine tétanique (TTFC). Chez *B. pertussis*, la TTFC a été produite sous forme sécrétée en fusion avec le tiers N-terminal de l'héماغlutinine filamenteuse (Fha 44) de *B. pertussis*. Les expériences d'immunodétection ont révélé que la taille de la protéine hybride Fha44::TTFC chez *B. pertussis* est nettement inférieure à celle attendue, suggérant une importante dégradation protéolytique. Aucune réponse primaire n'a été détectée après administration intra-nasale des souches productrices de la chimère, chez la souris. Néanmoins, une réponse anticorps anti-TTFC significative a été obtenue après un rappel intra-nasal avec la TTFC purifiée.

Chez *L. plantarum*, la TTFC a été produite dans trois compartiments cellulaires différents (cytoplasme, paroi, milieu extracellulaire) grâce aux motifs de sécrétion et/ou d'ancrage de la protéine M6 de *Streptococcus pyogenes*. L'administration intra-nasale ou intra-gastrique des différentes souches recombinantes a permis d'induire de fortes réponses immunes chez la souris.

Ce travail démontre qu'une bactérie non-pathogène peut être utilisée tout comme une bactérie pathogène atténuée, comme vecteur vivant de vaccination et ouvre d'importantes perspectives quant à la lutte contre les infections des muqueuses respiratoires, intestinales et urogénitales.

## Title

Mucosal vaccines : use of *Lactobacillus plantarum* and *Bordetella pertussis* as live vaccine vectors

## Abstract

The development of live vaccine vehicles able to stimulate the mucosal immune system represents one of the main objectives in vaccine research. In this study, two different live vectors were tested for their immunological properties : an attenuated mutant of *Bordetella pertussis*, and *Lactobacillus plantarum*, a non pathogenic bacterium. These two live vectors were compared using fragment C of tetanus toxin (TTFC), a potent immunogen that allows assessments of the induction of toxin neutralizing immunity. In *B. pertussis*, TTFC was secreted as a fusion with the N-terminal moiety of the filamentous haemagglutinin (FHA), whereas in *L. plantarum*, TTFC was produced in three different cell compartments (cytoplasmic, cell-surface anchored or secreted) using the signal sequence and/or anchoring motif of M6 protein from *Streptococcus pyogenes*. Immunoblots demonstrated that the production of TTFC was weak in *B. pertussis* and the apparent size of the hybrid protein was smaller than expected, suggesting proteolytic degradation. A immune response was detected by intranasal administration of the purified protein after administration of the recombinant *B. pertussis* strains. *L. plantarum* produced the heterologous antigen at the expected size in the three cellular compartments, and strong anti-TTFC immune responses were detected after intranasal or intragastric administration of recombinant *L. plantarum* strains.

This study demonstrate that a non-pathogenic as an attenuated bacteria can be used as live vaccine vector and perspectives are opened to fight against respiratory, intestinal and urogenital infections.

## Discipline

Sciences de la Vie et de la Santé

## Mots-clés

Vaccination muqueuse, vecteurs vivants de vaccination, bactéries lactiques, *Lactobacillus plantarum*, *Bordetella pertussis*, fragment C de la toxine tétanique, expression hétérologue, localisation cellulaire de l'antigène.

## Laboratoires de rattachement

Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes et  
Unité Inserm U447, « Mécanismes moléculaires de la pathogénie bactérienne »  
Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille  
1, rue du Professeur Calmette BP245  
59019 Lille cedex

