

Les toxines bactériennes recombinantes : de nouveaux vecteurs pour la vaccination ?

Pierre Guernonprez
Daniel Ladant
Catherine Fayolle
Agnès Ullmann
Claude Leclerc

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) sont des composants-clés de la réponse immunitaire. Ils reconnaissent de courts peptides antigéniques de 8 à 10 acides aminés, associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Ces peptides sont généralement issus de la dégradation de protéines cytosoliques. De ce fait, l'activation de réponses des CTL requiert, dans la majorité des cas, la synthèse ou l'introduction préalable de la protéine antigénique dans le cytosol des cellules présentatrices d'antigènes. De nouvelles stratégies ont été récemment développées pour délivrer les antigènes dans ces cellules. Ces stratégies sont fondées sur les capacités naturelles de toxines bactériennes à pénétrer dans les cellules eucaryotes. Il est maintenant possible, en utilisant des toxines recombinantes génétiquement détoxifiées, de délivrer des antigènes hétérologues dans les cellules présentatrices d'antigènes et d'activer ainsi des réponses CTL spécifiques et protectrices *in vivo*. Dans cet article, nous discuterons les perspectives de ces nouvelles stratégies vaccinales.

ADRESSES

P. Guernonprez, C. Fayolle, C. Leclerc : Unité de biologie des régulations immunitaires, Institut Pasteur, 25, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. D. Ladant, A. Ullmann : Unité de biochimie cellulaire, Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) reconnaissent un antigène (Ag) sous la forme de peptides de 8 à 10 résidus présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), qui sont exprimées à la surface de la plupart des cellules. Grâce à leur activité lytique, les CTL jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules tumorales ou des cellules infectées par des virus, des bactéries ou des parasites. L'activation de réponses mémoires impliquant des CTL constitue donc un

objectif majeur pour le vaccinologiste. Cependant, contrairement à ce que l'on observe pour les réponses immunitaires humorales, il est généralement impossible d'induire la production de CTL après immunisation par des protéines solubles. En effet, les CTL reconnaissent des complexes CMH-I-peptides formés à partir d'antigènes d'origine cytosolique [1, 2]. Les épitopes présentés dans ce contexte sont issus de la dégradation de protéines par le complexe multicatalytique du protéasome (*figure 1*). Les peptides ainsi produits sont

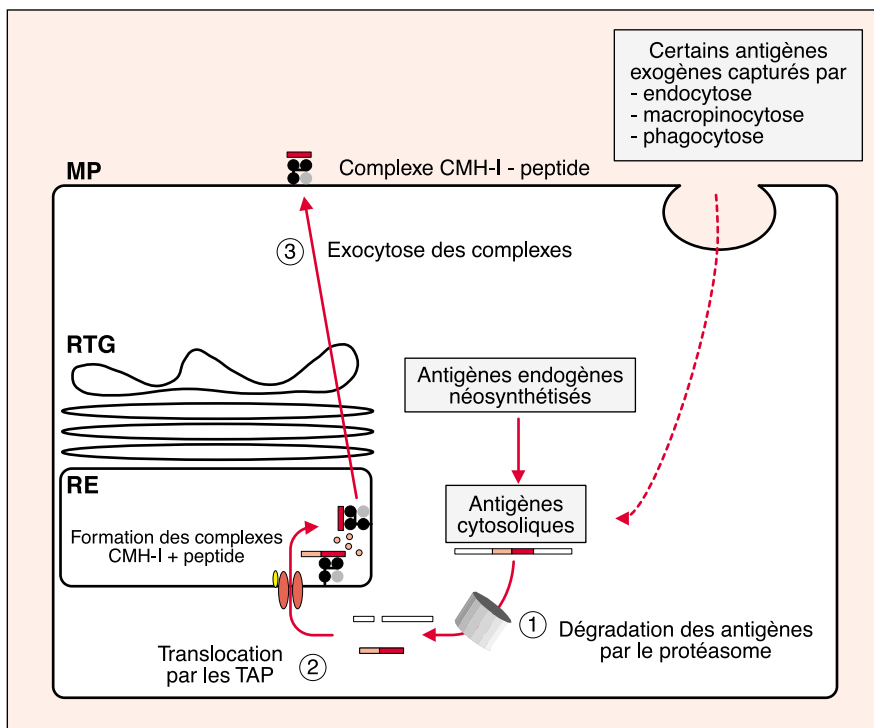


Figure 1. **Présentation antigénique par les molécules du CMH-I.** Au sein du cytosol, l'antigène nouvellement synthétisé (ou importé par divers mécanismes dans certaines cellules présentatrices spécialisées, telles les cellules dendritiques) est dégradé en peptides par le protéasome. Les peptides ainsi formés sont transportés dans le réticulum endoplasmique (RE) où ils s'assemblent avec les molécules du CMH I néosynthétisées. Les complexes CMH-I-peptide sont ensuite exportés vers la membrane plasmique. La présentation des antigènes cytosoliques peut être inhibée expérimentalement par: (1) des inhibiteurs du protéasome comme la lactacystine; (2) l'absence des TAP; (3) la bréfeldine A (BFA) qui bloque l'exocytose des complexes nouvellement formés dans la lumière du RE. MP: membrane plasmique; RTG: réseau transgolgien; TAP: transporteur associé à la présentation antigénique.

transportés par l'intermédiaire des TAP (transporteurs associés à la présentation antigénique) vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où ils s'associent aux molécules du CMH I nouvellement synthétisées et à la β -2 microglobuline. Les complexes ainsi formés rejoignent alors la membrane plasmique (MP) *via* la voie exocytique [1].

Parallèlement à la voie « classique » de présentation antigénique par le CMH-I, certains antigènes exogènes peuvent également être présentés par la voie cytosolique dans les cellules dendritiques ou les macrophages, en utilisant différents mécanismes d'endocytose caractéristiques des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) « professionnelles » : endocytose de complexes immuns,

macropinocytose de protéines solubles, phagocytose de corps apoptotiques ou de particules inertes [3] (figure 1).

Les problèmes de sécurité et/ou d'efficacité soulevés par l'utilisation de vecteurs réplcatifs permettant la synthèse d'antigènes dans le cytosol des CPA (vecteurs viraux ou injection d'ADN plasmidique nu) ont incité plusieurs équipes à mettre au point des vecteurs non réplcatifs, de type protéique, capables de délivrer ces mêmes antigènes dans le cytoplasme des CPA.

Certaines toxines bactériennes possèdent la capacité d'envahir les cellules eucaryotes cibles afin d'exercer leur activité catalytique dans le cytosol. Le développement de l'ingénierie génétique de ces toxines a permis: (1)

d'inactiver leur activité toxique par mutations de résidus essentiels dans leur site catalytique; (2) d'identifier au sein de ces toxines des sites dits « permissifs » dans lesquels des polypeptides hétérologues peuvent être insérés sans affecter l'entrée de la toxine dans les cellules cibles (Tableau I). De telles toxines recombinantes représentent donc potentiellement de très bons vecteurs pour délivrer des antigènes d'intérêt vaccinal dans la voie de présentation par le CMH-I. Par ailleurs, certains peptides hydrophobes ou cationiques, issus de protéines traversant spontanément la membrane plasmique, sont capables de transporter des polypeptides hétérologues dans le cytosol des cellules eucaryotes, et pourraient également être utilisés pour délivrer des antigènes dans le cytosol des CPA (Tableau I). Dans cette revue, nous discuterons les différentes stratégies d'activation de réponses T cytotoxiques, fondées sur l'utilisation de ces différentes toxines recombinantes et de ces peptides « de transport », leur efficacité vaccinale et plus généralement les perspectives, mais aussi les problèmes liés à ce type d'approches.

Pour pénétrer dans les cellules eucaryotes où elles exercent leur activité toxique, les toxines bactériennes utilisent diverses stratégies (figure 2), exploitant les mécanismes naturels d'endocytose des cellules eucaryotes. Les différentes toxines utilisées comme vecteurs d'antigènes sont présentées ci-dessous selon leur voie d'entrée dans les cellules.

Toxines à transport antérograde vers le réticulum endoplasmique

Après liaison à un récepteur membranaire glycolipidique ou glycoprotéique, ces toxines sont internalisées par endocytose et suivent un transport antérograde vers le RE *via* l'appareil de Golgi [4] (figure 2). L'entrée de ces toxines dans le cytosol est en effet inhibée par la bréfeldine A (BFA), une molécule qui altère l'appareil de Golgi. La plupart de ces toxines subissent une étape de protéolyse et de réduction d'un pont disulfure intrachaine, qui libère le domaine catalytique. Ce dernier peut

Tableau I

EXEMPLES DE VECTORISATION DE PROTÉINES HÉTÉROLOGUES DANS LE CYTOSOL
À L'AIDE DE TOXINES BACTÉRIENNES OU DE PEPTIDES DOUÉS D'ACTIVITÉ DE TRANSLOCATION

Type de vecteur	Vecteur	Protéine Délivrée	Référence
Toxines bactériennes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	– ribonucléase extracellulaire de <i>Bacillus amyloquefaciens</i>	[4]
	Exotoxine A (PE)	– dihydrofolate réductase	[34]
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	– domaine de la protéine A	[32]
	Toxine diphtérique (DT)	– apolipoprotéine AI	[33]
	<i>Bacillus anthracis</i>	– domaine catalytique de PE	[10]
	Toxine létale (LT)	– dihydrofolate réductase – fragment A de DT – fragment A de ST – chaîne légère de la toxine tétanique – gp120 du VIH	[11] [11] [11] [11] [12]
–	<i>Bordetella pertussis</i> Adénylcyclase (CyaA)	– dihydrofolate réductase – restrictocine – TAT du VIH	(résultats non publiés)
Peptides doués d'activité de translocation	VIH protéine TAT	– β -galactosidase – peroxydase de raifort – RNase A – ovalbumine	[29, 31] [29] [29] [30]
	<i>Drosophila</i> Homéodomaine d'Antennapedia	– divers polypeptides allant jusqu'à une cinquantaine d'acides aminés	[27] [28]
	Séquence signal d'un facteur de croissance fibroblastique <i>membrane translocating sequence</i>	– glutathione S-transférase couplée au domaine SH2 de Grb2	[35]
	régions variables d'anticorps naturels anti-ADN	– peroxydase de raifort	[37]
	Virus Herpès protéine VP22	– GFP – p53	[36]

alors traverser la membrane du RE pour rejoindre le cytosol, vraisemblablement en utilisant une voie de rétrotranslocation endogène du RE.

L'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE)

Cette toxine de 64 kDa est composée de 3 domaines: un domaine de liaison au récepteur, un domaine de translocation et un domaine catalytique responsable de l'ADP ribosylation du facteur d'élongation EF-2, entraînant ainsi l'inhibition de la syn-

thèse protéique et la mort cellulaire [4]. Après liaison à son récepteur cellulaire (l' α -2 macroglobuline) et endocytose, la toxine PE est protéolysée par la furine puis réduite, afin de produire un fragment carboxy-terminal de 37 kDa contenant le domaine catalytique, qui rejoindra le cytosol. L'extrémité carboxy-terminale de la toxine comprend un motif de rétention dans le RE, nécessaire pour l'intoxication [4].

En 1991, Prior *et al.* [5] ont montré qu'une protéine hétérologue de 110 acides aminés, la barnase, pouvait

être fusionnée à une forme détoxifiée de PE et être délivrée dans le cytoplasme de cellules sensibles à la toxine PE. Plus récemment, Donnelly *et al.* [6-7] ont construit des toxines PE recombinantes dans lesquelles le domaine catalytique a été remplacé par des épitopes spécifiquement reconnus par les cellules T-CD8⁺. Ces toxines recombinantes sont capables, *in vitro*, de sensibiliser des cellules cibles à la lyse par des CTL spécifiques des épitopes insérés. La présentation de ces épitopes nécessite le clivage des toxines recombinantes par

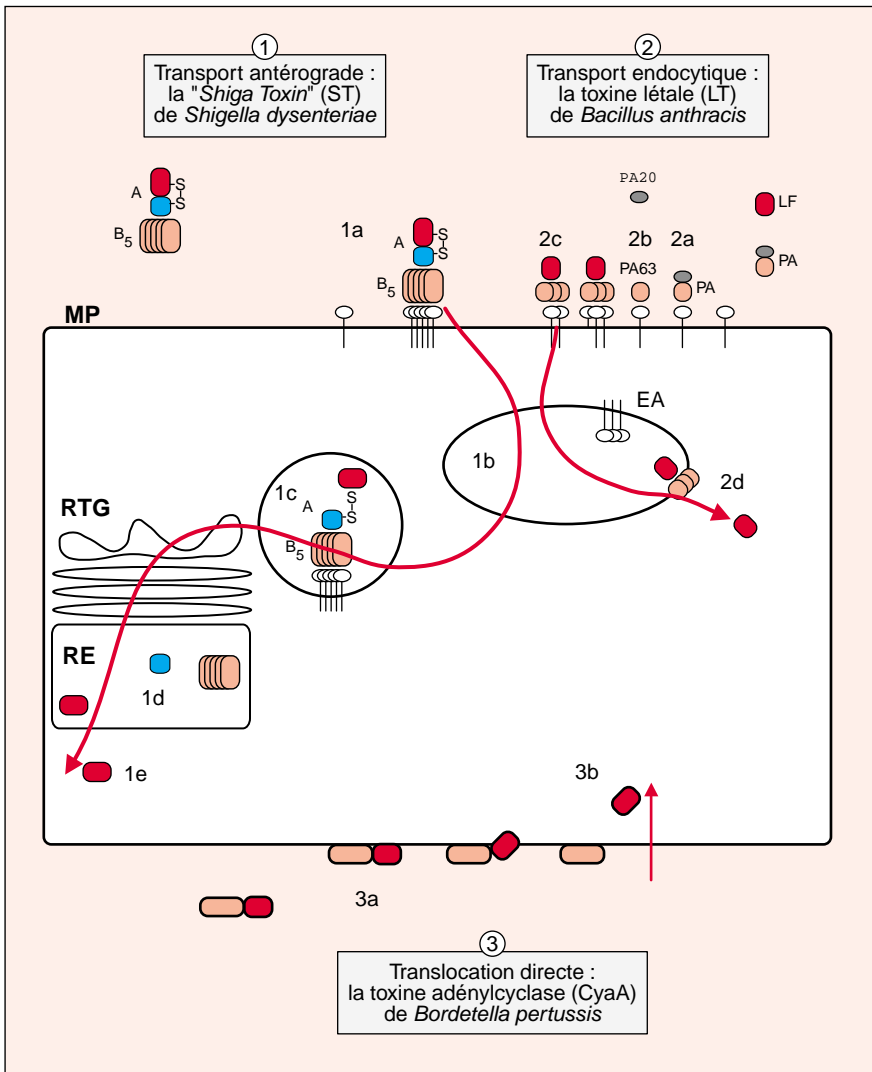


Figure 2. **Différents modes d'entrée des toxines bactériennes dans les cellules eucaryotes.** Pour chacune des 3 voies principales, les étapes du processus de translocation sont illustrées. **1) Transport antérograde.** La toxine de *Shigella dysenteriae*: **1A.** Liaison au récepteur de la toxine AB5. **1B.** Endocytose, **1C.** Clivage par la furine. **1D.** Transport antérograde vers le RE puis le RE, **1E.** Translocation dans le RE. Ce type de transport est bloqué par la BFA. **2) Transport endocytique.** La toxine létale de *Bacillus anthracis*: **2A.** Fixation de l'antigène protecteur (PA). **2B.** Clivage de PA en PA63 et PA20. **2C.** Oligomérisation de PA63 et fixation du facteur létal (LF) sur PA63. **2D.** Endocytose et translocation de LF d'un compartiment acide vers le cytosol. Ce type de transport est bloqué par des inhibiteurs de l'acidification des endosomes. **3) Translocation directe.** La toxine adénylcyclase de *Bordetella pertussis*: **3A.** Ancrage dans la membrane plasmique par la partie carboxy-terminale, **3B.** Translocation du domaine catalytique dans le cytosol.

la furine mais elle est indépendante des transporteurs TAP (figure 3). Ces résultats, ainsi que d'autres observations (telles que l'insensibilité de la présentation à l'action de la BFA et à

l'inhibition de l'acidification des vésicules par le NH_4Cl), suggèrent que la dégradation des toxines recombinantes et l'apprêtage des épitopes insérés n'ont pas lieu dans le cyto-

plasme des cellules cibles, mais plutôt au sein d'un compartiment postgolgien.

Les toxines AB5

La toxine de *Shigella dysenteriae* (ST), la « shiga-like toxine » d'*E. coli* (SLT-1), la toxine thermolabile d'*E. coli* (LT), la toxine cholérique (CT), et la toxine pertussique (PT) présentent une même structure quaternaire. Ces toxines, appelées toxines AB5, sont constituées d'une sous-unité A qui porte l'activité enzymatique toxique (différente selon les toxines), associée à un pentamère de sous-unités B, responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires spécifiques. Toutes ces toxines pénètrent dans la cellule selon une voie antérograde (sensible à la BFA) avant d'atteindre le RE, d'où a probablement lieu leur translocation dans le cytoplasme. Différentes toxines AB5 ont déjà été utilisées comme vecteurs pour des épitopes particuliers.

- La toxine pertussique de *Bordetella pertussis* (PT)

La sous-unité A ou S1 catalyse le transfert covalent d'un groupement ADP-ribosyle sur des sous-unités α de différentes protéines G eucaryotes (dont la protéine $\text{G}\alpha_i$); la liaison au récepteur cellulaire formé de protéines sialylées est assurée par un pentamère B constitué de quatre polypeptides différents (S2, 2 x S3, S4, S5) [4]. Carbonetti *et al.* [8] ont construit des toxines recombinantes constituées d'une sous-unité S1 génétiquement inactivée, portant un épitope CTL inséré dans différents sites permissifs. *In vitro*, ces protéines S1 recombinantes s'assemblent avec les sous-unités S2-S5 en holotoxines fonctionnelles présentées par le CMH I selon un processus sensible à la BFA, mais indépendant de l'activité du protéasome ou des transporteurs TAP [8] (figure 3). Une activité protéolytique présente au sein du RE serait responsable de l'apprêtage du peptide inséré.

- La toxine de *Shigella dysenteriae* (ST)

La sous-unité A de cette toxine bloque la synthèse protéique en inactivant l'ARNr 28S par dépurination

Toxine	Activité toxique Cible cellulaire Effet biologique	Structure et insertion antigénique	Caractérisation des mécanismes de présentation des inserts antigéniques par le CMH-I. Implication de :				Induction de réponses CTL <i>in vivo</i> et d'une immunité protectrice	Vectorisation de protéines entières <i>in vitro</i>
			Protéasome	TAP	Golgi fonctionnel	Acidification des vésicules		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxine A (PE)	- ADP-ribosyl transférase - EF-2 - Bloque la synthèse protéique		Non	Non	Non	Non	Oui	
<i>Bordetella pertussis</i> Toxine pertussique (PT)	- ADP-ribosyl transférase - Gi, Gt - Augmente l'AMPc		Non	Non	Oui			
<i>Shigella dysenteriae</i> Toxine «Shiga» (ST)	- Adénine glycohydrolase - rRNA 28S - Bloque la synthèse protéique				Oui	Non		
<i>Escherichia coli</i> Toxine «Shiga-like 1» (SLT1)	- Adénine glycohydrolase - rRNr 28S - Bloque la synthèse protéique				Oui			
<i>Bacillus anthracis</i> Toxine létale (LT)	- Métalloprotéase - MEK1,2 - Augmente la production de cytokines inflammatoires		Oui				Oui	
<i>Bordetella pertussis</i> Toxine adénylcyclase (CyaA)	- Adénylcyclase dépendante de la calmoduline - Pas de cible - Augmente l'AMPc		Oui	Oui	Oui	Non	Oui	

Figure 3. **Présentation antigénique par des toxines recombinantes détoxifiées portant des antigènes hétérologues.** Le domaine catalytique des toxines sauvages (gris foncé), le domaine d'interaction avec les cellules ou les récepteurs des toxines (gris clair), l'emplacement des épitopes T-CD8⁺ insérés permettant (triangles noirs) ou non (triangles blancs) leur présentation par les molécules du CMH-I sont représentés. PE et LF sont inactivées par délétion du domaine catalytique. Le fragment B de ST est utilisé en l'absence du fragment A qui porte le domaine catalytique. PT, SLT1 et CyaA sont détoxifiées par des mutations ponctuelles dans leur domaine catalytique. Pour chacune des toxines étudiées, les principales caractéristiques de la présentation des épitopes insérés sont rapportées. La dépendance de la présentation vis-à-vis de l'activité du protéasome, des TAP (transporteurs associés à la présentation antigénique) et du Golgi définit la voie de présentation cytosolique des antigènes endogènes.

sélective d'une adénosine essentielle. L'homopentamère de sous-unités B interagit avec les globotriaosyl céramides (principalement le Gb3), et rejoint, après endocytose, le RE des cellules cibles (le ou les signaux de rétention permettant ce transport antérograde ne sont pas connus) [4] (figure 2). Lee *et al.* [9] ont montré qu'un épitope reconnu par des CTL humains spécifiquement dirigés contre des cellules tumorales et inséré dans la partie carboxy-terminale du fragment B, est correctement présenté par les molécules du CMH-I de diverses CPA. La présentation, comme l'intoxication par la toxine ST sauvage, est sensible à la BFA mais insensible à l'action de la chloro-

quine (figure 3). Cependant, dans ce système, la capacité de translocation de la sous-unité B dans le cytosol n'a pas été établie.

- La « Shiga-Like Toxin » 1 d'*Escherichia coli* (SLT-1)

Cette toxine est très similaire à ST. Noakes *et al.* [10] ont montré qu'un épitope reconnu par des CTL peut être inséré dans la partie amino-terminale de la sous-unité A détoxifiée après introduction d'une mutation dans le site catalytique. Après association avec l'homopentamère formé de sous-unités B, l'holotoxine recombinante est capable de délivrer l'épitope inséré dans la voie de présenta-

tion par le CMH-I, selon un processus sensible à l'action de la BFA. En revanche, ce même épitope n'est pas présenté correctement lorsque il est inséré à l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A (c'est-à-dire en aval du site de clivage par la furine). La translocation du fragment amino-terminal de la sous-unité A dans le cytosol est donc probablement requise pour la présentation [10]. En dépit de la capacité de ces diverses toxines recombinantes à délivrer des épitopes hétérologues dans la voie de présentation par le CMH-I, aucune induction de réponse CTL par ces toxines recombinantes n'a été rapportée *in vivo* à notre connaissance.

Toxines à transport endocytaire : le facteur létal de *Bacillus anthracis* (LF)

Bacillus anthracis sécrète deux protéines, le facteur létal, LF (83 kDa), et le facteur œdémateux, EF (89 kDa), qui s'associent chacun avec un troisième composant, l'antigène protecteur (PA, 85 kDa), pour former respectivement la toxine létale et la toxine œdémateuse. EF est une adénylcyclase activée par la calmoduline, alors que LF est une métalloprotéase capable de cliver les protéine-kinases MEK1 et MEK2 [4]. Après liaison à un récepteur cellulaire non identifié à ce jour, PA est clivé par la furine en un fragment amino-terminal de 20 kDa (PA20) et un fragment carboxy-terminal de 63 kDa (PA63). Le relargage de PA20 permet l'oligomérisation de PA63 et la fixation de LF (ou EF) (figure 2). Après internalisation, l'acidification des endosomes provoque l'insertion d'un segment de PA dans la membrane et la translocation de LF (ou EF) vers le cytosol [4]. La partie amino-terminale de LF, LFn, contient le domaine de fixation à PA63; la partie carboxy-terminale correspond au domaine catalytique. Ce dernier peut être délété et remplacé par des protéines hétérologues qui pourront ainsi être délivrées, en présence de PA, dans le cytosol de cellules eucaryotes cibles [11, 12]. Golez *et al.* [13] ont montré que la protéine gp120 de VIH1 fusionnée avec LFn en position carboxy-terminale peut être présentée *in vitro* par le CMH I en présence de PA. La présentation dépend de l'activité du protéasome (figure 3). Starnbach *et al.* [14, 15] ont également étudié *in vitro* la présentation d'épitopes fusionnés à l'extrémité carboxy-terminale de LFn, et montré qu'elle dépend de PA et de son activation par la furine. Dans le cas de plusieurs modèles antigéniques, des réponses CTL PA-dépendantes ont été obtenues *in vivo*, après une seule injection intrapéritonéale de ces toxines et sans adjuvant. Deux études ont récemment montré que ces toxines LFn recombinantes sont capables d'induire une immunité protectrice: (1) chez la souris, l'immunisation par une toxine portant un épitope CTL de la listeriolyse O (*Listeria monocy-*

togenes) réduit la charge bactérienne mesurée deux jours après une injection létale de cette bactérie [16]; (2) l'immunisation par une toxine portant un épitope de la nucléoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) induit une réduction de la charge virale splénique et pulmonaire après une infection aiguë par la souche LCMV Armstrong. Dans un modèle d'infection chronique par le LCMV, la charge virale sanguine est réduite à 7 et 14 jours après l'infection [14, 17].

L'adénylcyclase de *Bordetella pertussis* (CyaA)

L'adénylcyclase (CyaA) constitue l'une des toxines essentielles de *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche [18]. Elle est sécrétée par *B. pertussis* et possède la capacité de pénétrer dans les cellules eucaryotes cibles où, activée par la calmoduline (CaM), elle synthétise activement de l'AMPc et altère ainsi le métabolisme cellulaire. L'adénylcyclase est synthétisée et sécrétée sous forme d'un polypeptide de 1 706 acides aminés. L'activité catalytique calmoduline-dépendante est contenue dans les 400 premiers acides aminés. La partie carboxy-terminale de 1 300 résidus environ est responsable de la liaison avec les cellules cibles et de la translocation du domaine catalytique amino-terminal à travers la membrane cytoplasmique de ces cellules. En outre, le domaine carboxy-terminal possède une faible activité hémolytique que lui confère sa capacité à former des canaux ioniques, lorsqu'elle s'insère dans les membranes des cellules cibles [18]. L'originalité de la toxine CyaA réside dans son mécanisme d'entrée dans les cellules. En effet, il est maintenant bien établi que la toxine est capable de délivrer son domaine catalytique amino-terminal dans le cytoplasme des cellules cibles directement à travers la membrane cytoplasmique. Cette capacité requiert l'intégrité du polypeptide, l'acylation spécifique (catalysée par le produit du gène *cyaC* de *B. pertussis*) d'une lysine en position 983, et la présence d'ions calcium qui se fixent sur la partie carboxy-terminale de la toxine. Les mécanismes moléculaires impliqués

dans ce processus sont encore inconnus [18].

L'identification de sites « permissifs » pour l'insertion de polypeptides hétérologues dans le domaine catalytique ainsi que la caractérisation de mutations abolissant l'activité enzymatique adénylcyclase nous ont incités à développer une stratégie vaccinale fondée sur l'utilisation de toxines CyaA recombinantes comme vecteur d'épitopes reconnus par les cellules T-CD8⁺ [18].

Nous avons montré que des épitopes insérés dans le domaine catalytique de CyaA sont délivrés dans le cytosol des cellules cibles et présentés par le CMH I *via* la voie cytosolique « classique » [19, 20]. En effet, la présentation dépend: (1) de l'activité du protéasome; (2) des transporteurs TAP; (3) de la synthèse *de novo* des protéines du CMH-I et de la voie exocytaire (figure 3). En outre, la présentation des épitopes insérés, comme la translocation de la toxine CyaA, est dépendante du Ca²⁺ extracellulaire, indépendante de l'acidification des endosomes et restreinte à la partie amino-terminale de la protéine [21]. Des études réalisées *in vivo* chez la souris ont démontré que des toxines CyaA recombinantes portant un épitope T CD8⁺ de la nucléoprotéine du LCMV (épitope NP 118-132) sont capables d'induire des réponses CTL spécifiques. Les CTL anti-LCMV ainsi induits reconnaissent spécifiquement les cellules cibles chargées en peptides spécifiques et sont capables de lyser des cellules infectées par le virus (figures 4A et 4B, [22, 23]). La capacité de ces toxines à délivrer l'épitope dans le cytosol des cellules présentatrices est essentielle pour l'induction de réponses CTL *in vivo* et *in vitro* [22-24]. Bien que les réponses CTL décrites dans ces travaux aient été obtenues après deux injections intrapéritonéales de toxines adsorbées sur de l'hydroxyde d'aluminium (un adjuvant d'usage courant chez l'homme), des résultats plus récents indiquent qu'il est possible d'induire efficacement des réponses CTL sans adjuvant après une seule injection intra-veineuse. La capacité des CyaA recombinantes d'induire une immunité protectrice a été établie dans un modèle particulièrement contrôlé d'infection par le LCMV chez la souris [23]. Les ani-

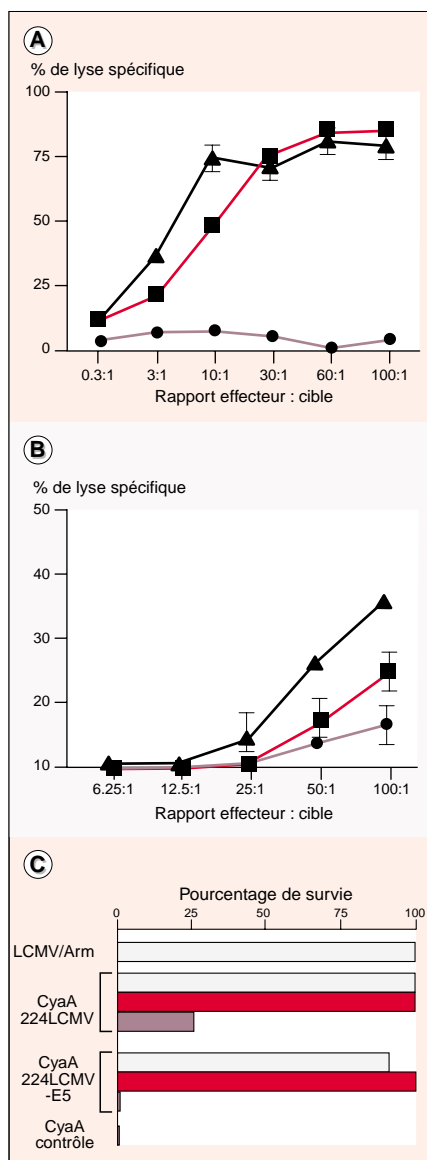


Figure 4. **Induction d'une immunité protectrice contre le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) grâce à l'adénylcyclase de Bordetella pertussis utilisée comme vecteur.** Des souris BALB/c ($H-2^d$) ont été vaccinées par voie intrapéritonéale (2 fois $50 \mu\text{g}$ de protéine à jours 0 et 21) en présence de l'adjuvant hydroxide d'aluminium, avec CyaA non recombinante (CyaA, ronds noirs), CyaA portant l'épitope NP 118-132 dérivé de la nucléoprotéine du LCMV (restreint par la molécule du CMH I H-2L^d) inséré en position 224 du domaine catalytique de CyaA (CyaA224LCMV, carrés noirs) ou CyaA détoxifiée (par insertion du dipeptide LQ en position 188) et portant l'épitope NP 118-132 (CyaA224LCMV-E5, triangles noirs).

A et B. Induction de réponses CTL spécifiques de la nucléoprotéine de LCMV par CyaA224LCMV et CyaA224LCMV-E5. L'activité cytotoxique des splénocytes a été évaluée 7 jours après la dernière immunisation (après 5 jours de restimulation antigénique *in vitro*), contre des cellules cibles chargées avec le peptide synthétique NP 118-132 (A) ou bien infectées par le virus LCMV (B). La lyse spécifique des cibles non chargées avec le peptide ou non infectées est inférieure à 10%. **C.** Induction d'une immunité protectrice par CyaA-LCMV conférée par les lymphocytes CD8⁺. Des souris contrôles (barres blanches) ou déplétées en lymphocytes T CD4⁺ (barres grisées) ou CD8⁺ (barres noires), ont été vaccinées par voie intrapéritonéale avec CyaA224LCMV, CyaA224LCMV-E5, CyaA non recombinante ou le virus LCMV. Ces animaux ont été infectés par voie intracérébrale 7 jours après la dernière immunisation par $10^{1.7}$ foci du virus LCMV. La survie est évaluée 21 jours après l'infection.

(OVA) dérivé de l'ovalbumine, sont capables d'induire des réponses CTL CD8⁺ spécifiques. Chez la souris, lors d'une greffe de cellules d'un mélanome syngénique (B16) exprimant l'ovalbumine, la survie est améliorée de façon très significative par des injections prophylactiques ou thérapeutiques de ces toxines. Ces résultats prometteurs nous ont amenés à développer une série de toxines CyaA portant des épitopes de mélanomes humains restreints par HLA-A2. Nous testons actuellement chez des souris transgéniques pour HLA-A2 [26] si la présentation de ces protéines se fait correctement *in vivo*. En parallèle, nous envisageons de tester si des clones T isolés chez des patients atteints de mélanome peuvent reconnaître ces protéines *in vitro* lorsqu'elles sont présentées par des CPA humaines (cellules dendritiques).

Les peptides doués d'activité de translocation

Une approche alternative à l'utilisation de toxines pour délivrer un antigène dans le cytosol des CPA consiste à « greffer » un antigène ayant un intérêt vaccinal sur des peptides capables de traverser spontanément les membranes biologiques (Tableau I). Chez la drosophile, l'homéodomaine du facteur de transcription Antennapedia possède une activité de translocation intrinsèque qui dépend essentiellement d'un peptide hydrophobe dont la conformation est celle d'une hélice α . Des peptides hétérologues couplés ou fusionnés à ce peptide de translocation peuvent être délivrés dans les cellules par un mécanisme insensible à la température, et qui n'implique ni récepteur ni endocytose. Ce peptide pourrait déstabiliser la face externe de la membrane plasmique et former des micelles qui libéreraient leur contenu au niveau de la face interne de la membrane [27]. Ce système a été utilisé pour délivrer un épitope reconnu par des CTL dans une voie de présentation cytosolique sensible à la BFA [28]. Bien que ce système fonctionne *in vitro* avec deux épitopes différents, *in vivo*, pour des raisons encore mal comprises, l'induction de réponses CTL requiert la présence de détergent, ce qui limite son utilisation pour la vaccination.

maux vaccinés avec des protéines CyaA (détoxifiées ou non) portant l'épitope NP 118-132 sont protégées très efficacement contre une injection intracérébrale de virus, qui se révèle létale pour toutes les souris des groupes contrôles (figure 4C). Cette protection est strictement dépendante de l'activité des CTL CD8⁺ (figure 4C). Ainsi, ce travail a permis d'établir très clairement le potentiel de CyaA comme vecteur vaccinal antiviral. Il faut souligner

que le potentiel protecteur des toxines CyaA recombinantes a été déterminé par l'évaluation directe de la survie des animaux vaccinés et non pas seulement par le suivi de la charge virale comme cela était le cas dans les travaux réalisés avec les toxines LF recombinantes [16]. Nous avons également mis en évidence la capacité de toxines CyaA recombinantes à induire une immunité antitumorale [25]. Des toxines CyaA portant un épitope modèle

La protéine TAT du VIH ainsi que certains peptides cationiques issus de cette protéine, possèdent également une activité de translocation intrinsèque qui a été exploitée pour délivrer des protéines hétérologues dans des cellules eucaryotes [29]. Ainsi l'ovalbumine peut être présentée *in vitro* par les molécules du CMH-I après couplage chimique à l'un de ces peptides (fragments 49-57 de TAT) [30]. L'efficacité de cette méthode pour induire des CTL *in vivo* n'a pas été évaluée, à notre connaissance, mais une étude très récente montre que la β -galactosidase peut être délivrée dans les cellules *in vivo* [31], lorsqu'elle est couplée génétiquement à un fragment de TAT.

Contraintes posées par l'utilisation de vecteurs de translocation

Taille des inserts antigéniques et capacité de translocation

Un vecteur idéal doit être capable de délivrer une variété d'épitopes suffisante pour faire face à la diversité antigénique de certains pathogènes ou de certaines tumeurs d'une part, et au polymorphisme du CMH-I, d'autre part. La plupart des études de présentation d'antigène décrites ont utilisé des inserts peptidiques de petite taille contenant un seul épitope reconnu par des CTL. Les toxines bactériennes évoquées ici, PE, LF, CyaA, ou encore la toxine diphtérique sont capables, *in vitro*, de délivrer des protéines entières dans les cellules (Tableau I) [32-34], mais avec certaines contraintes structurales. En particulier, les modules protéiques insérés doivent pouvoir se déplier pour traverser la membrane. La compréhension fine des mécanismes de translocation de ces toxines recombinantes devrait permettre d'améliorer l'efficacité de transport des polypeptides greffés dans les cellules cibles. En ce qui concerne les peptides de translocation, plusieurs études récentes attestent de leur capacité à délivrer des protéines entières dans le cytosol des cellules *in vitro* mais également *in vivo* [29, 35-37].

Dégradation intracellulaire des toxines et présentation

Les épitopes, normalement générés dans la voie cytosolique, ne doivent pas être dégradés avant d'atteindre le cytosol des CPA lorsqu'ils sont insérés génétiquement dans des toxines bactériennes. Une dégradation inadéquate dans les compartiments intracellulaires non cytosoliques par lesquels transitent les toxines PE, PT, SLT-1, ST, LF/PA est donc potentiellement problématique. Ceci semble être le cas pour les toxines PE et PT pour lesquelles la dégradation aboutissant à la libération des épitopes insérés semble être le fait de protéases présentes dans le RE.

A l'opposé, une trop grande stabilité des toxines recombinantes pourrait empêcher leur dégradation dans le cytosol. Ainsi, l'absence de lysines dans la sous-unité A de PT (et leur faible représentation dans d'autres toxines) a été interprétée comme un avantage évolutif permettant à ces protéines d'échapper à l'ubiquitination. Cette limitation pourrait expliquer l'absence de présentation cytosolique des épitopes insérés dans la PT. Une étude récente a montré qu'il est possible de contrôler la stabilité intracellulaire de la toxine diphtérique en modifiant son extrémité amino-terminale et ainsi sa propension à l'ubiquitination selon la règle appelée *N-end rule* [38]. Ce type de manipulation pourrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de l'apprêtement des antigènes insérés dans les toxines servant de vecteurs. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'insertion d'un épitope CTL en dehors de son contexte protéique d'origine peut compromettre sa libération par le protéasome et, en conséquence, sa présentation. En effet, les régions encadrant l'épitope influent sur la spécificité de clivage du protéasome [39]. Ce type de contrainte est donc à prendre en compte dans le développement rationnel de ces nouveaux vecteurs.

Activités biologiques résiduelles et caractère adjuvant des toxines après détoxification

Les toxines utilisées comme vecteurs d'antigène sont généralement détoxifiées par inactivation ou délétion de

leur activité cytotoxique principale. Cependant, ces toxines détoxifiées sont souvent loin d'être des molécules inertes, puisque leurs capacités de liaison aux récepteurs cellulaires demeurent intactes. A ce titre, l'utilisation de toxines bactériennes comme adjuvants dans l'obtention de réponses contre des antigènes hétérologues est exemplaire: en effet, les sous unités B de la CT ou de LT génétiquement détoxifiées conservent certaines des propriétés adjuvantes des holotoxines [40]. Il semble donc essentiel de définir le rôle éventuel de tels effets adjuvants dans l'immunogénicité des toxines.

Ciblage cellulaire des toxines et CPA impliquées dans la présentation *in vivo*

La majorité des types cellulaires expriment le CMH-I et possèdent la machinerie cellulaire requise pour la présentation d'un antigène par ces récepteurs. Néanmoins, de nombreuses observations concordent pour attribuer aux seules cellules dendritiques (CD) matures la capacité d'induire une réponse T CD8⁺ primaire *in vitro* comme *in vivo*. L'induction efficace de réponses CTL par des toxines recombinantes pourrait donc dépendre de la capacité de ces vecteurs à délivrer les antigènes vaccinaux dans les cellules dendritiques. *In vitro*, il a été montré que CyaA (19) et ST (8) sont capables de délivrer des antigènes dans la voie de présentation des CD. En revanche, il est possible que ce type de contraintes puisse expliquer l'absence d'induction de réponses CTL *in vivo* par des toxines recombinantes, telles que PE, pourtant présentées efficacement *in vitro* par d'autres types cellulaires que les CD. Le ciblage sélectif des toxines recombinantes vers les CD pourrait donc éventuellement permettre d'augmenter l'efficacité de ces nouveaux vecteurs.

Réponses immunitaires contre l'insert antigénique et contre le vecteur

Des réponses immunitaires impliquant les cellules B, T-CD4⁺, ou T-CD8⁺ et dirigées contre le vecteur sont susceptibles d'apparaître pour

deux raisons: l'administration répétée du vecteur et le développement d'une immunité contre les agents pathogènes dont sont issues les toxines qui servent de vecteurs. L'influence de ces réponses sur l'établissement d'une réponse spécifique contre les épitopes insérés dans les toxines recombinantes apparaît donc comme un point particulièrement important à étudier. En effet, les anticorps circulants produits par les cellules B pourraient inhiber l'entrée des toxines recombinantes dans les CPA ou, à l'inverse, favoriser leur présentation *via* les récepteurs pour la partie constante des anticorps [3]. Les réponses CD4⁺ pourraient jouer un rôle positif sur l'activation des CD8⁺ spécifiques de l'insert notamment en activant la différenciation des CD40L-CD40. Pourtant, si l'induction de réponses CD8⁺ dirigées contre les épitopes insérés est dépendante des CD4⁺ dans le cas de LF [14], elle est indépendante des CD4⁺ dans le cas de CyaA [22]. Cette dernière observation suggère l'existence d'un mécanisme alternatif d'activation de la différenciation des CD au cours de l'immunisation par CyaA qui reste à élucider. Dans le cas de CyaA (résultats non publiés) et de LF [14], les réponses CTL dirigées contre les inserts ne sont pas modifiées chez des animaux immunisés contre la toxine sauvage.

Conclusions et perspectives

Alors que de nombreux vecteurs protéiques non réplicatifs, toxines ou peptides, permettent de délivrer *in vitro* des antigènes dans les cellules présentatrices, seul un petit nombre d'entre eux est capable d'activer des CTL *in vivo*. Il semble donc important de mieux comprendre les bases physiologiques de l'immunogénicité de tels vecteurs, afin d'améliorer leur efficacité ou mieux encore d'en concevoir de nouveaux. Parmi les différentes toxines testées, l'adénylcyclase de *Bordetella pertussis* et le facteur létal de *Bacillus anthracis* paraissent les candidats les plus prometteurs à ce jour. En effet, leur capacité à délivrer des antigènes hétérologues dans le cytosol des CPA et à induire des réponses CTL pro-

tectrices *in vivo* est maintenant clairement établie. En outre, la capacité de CyaA à induire une immunité protectrice a été démontrée dans des modèles très spécifiques de pathologies expérimentales chez la souris. Ces toxines représentent donc des vecteurs potentiels particulièrement intéressants pour les essais d'immunothérapie anticancéreuse ■

RÉFÉRENCES

1. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 323-58.
2. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 739-50.
3. Amigorena S. Présentation antigénique par les cellules dendritiques. *Med Sci* 1999; 15: 931-8.
4. Rappuoli R, Montecucco C. Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. Sambrook and Tooze publications. Oxford: Oxford University Press, 1997: 256.
5. Prior TI, FitzGerald DJ, Pastan I. Barnase toxin: a new chimeric toxin composed of *Pseudomonas* exotoxin A and barnase. *Cell* 1991; 5: 1017-23.
6. Donnelly JJ, Ulmer JB, Hawe LA, et al. Targeted delivery of peptide epitopes to class I major histocompatibility molecules by a modified *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 8: 3530-4.
7. Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol* 1994; 7: 1590-6.
8. Carbonetti NH, Irish TJ, Chen CH, et al. Intracellular delivery of a cytolytic T-lymphocyte epitope peptide by pertussis toxin to major histocompatibility complex class I without involvement of the cytosolic class I antigen processing pathway. *Infect Immun* 1999; 2: 602-7.
9. Lee RS, Tartour E, van der Bruggen P, et al. Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumor antigen fused to the B-fragment of Shiga toxin. *Eur J Immunol* 1998; 9: 2726-37.
10. Noakes KL, Teisserenc HT, Lord JM, Dunbar PR, Cerundolo V, Roberts LM. Exploiting retrograde transport of Shiga-like toxin 1 for the delivery of exogenous antigens into the MHC class I presentation pathway. *FEBS Lett* 1999; 453: 95-9.
11. Arora N, Klimpel KR, Singh Y, Leppla SH. Fusions of anthrax toxin lethal factor to the ADP-ribosylation domain of *Pseudomonas* exotoxin A are potent cytotoxins which are translocated to the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem* 1992; 22: 15542-8.
12. Leppla SH, Arora N, Varughese M. Anthrax toxin fusion proteins for intracellular delivery of macromolecules. *J Appl Microbiol* 1999; 2: 284.
13. Goletz TJ, Klimpel KR, Arora N, Leppla SH, Keith JM, Berzofsky JA. Targeting HIV proteins to the major histocompatibility complex class I processing pathway with a novel gp120-anthrax toxin fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 22: 12059-64.
14. Ballard JD, Collier RJ, Starnbach M.N. Anthrax toxin as a molecular tool for stimulation of cytotoxic T lymphocytes: disulfide-linked epitopes, multiple injections, and role of CD4(+) cells. *Infect Immun* 1998; 10: 4696-9.
15. Ballard JD, Doling AM, Beauregard K, Collier RJ, Starnbach MN. Anthrax toxin-mediated delivery *in vivo* and *in vitro* of a cytotoxic T-lymphocyte epitope from ovalbumin. *Infect Immun* 1998; 2: 615-9.
16. Ballard JD, Collier RJ, Starnbach MN. Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 22: 12531-4.
17. Doling AM, Ballard JD, Shen H, et al. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes fused to anthrax toxin induce protective antiviral immunity. *Infect Immun* 1999; 7: 3290-6.
18. Ladant D, Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 1999; 4: 172-6.
19. Guernonprez P, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* 1999; 4: 1910-6.
20. Sebo P, Fayolle C, d'Andria O, Ladant D, Leclerc C, Ullmann A. Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows *in vitro* presentation of a foreign epitope to CD8⁺ cytotoxic T cells. *Infect Immun* 1995; 10: 3851-7.
21. Osicka R, Osickova R, Basar R, Guernonprez P, Leclerc C, Sebo P. Delivery of CD8⁺ T-cell epitope into MHC class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 2000 (sous presse).
22. Fayolle C, Sebo P, Ladant D, Ullmann A, Leclerc C. *In vivo* induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8⁺ T cell epitopes. *J Immunol* 1996; 12: 4697-706.
23. Saron MF, Fayolle C, Sebo P, Ladant D, Ullmann A, Leclerc C. 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 USA* 1997; 7: 3314-9.
24. Karimova G, Fayolle C, Gmira S, Ullmann A, Leclerc C, Ladant D. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the *in vivo* delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 21: 12532-7.

RÉFÉRENCES

25. Fayolle C, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol* 1999; 7: 4157-62.
26. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997; 12: 2043-51.
27. Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 1998; 2: 84-7.
28. Schutze-Redelmeier MP, Gournier H, Garcia-Pons F, et al. Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila* antennapedia homeodomain primes cytotoxic T cells *in vivo*. *J Immunol* 1996; 2: 650-5.
29. Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 2: 664-8.
30. Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, et al. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol* 1997; 4: 1666-8.
31. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; 285: 1569-72.
32. Stenmark H, Moskaug JO, Madshus IH, Sandvig K, Olsnes S. Peptides fused to the amino-terminal end of diphtheria toxin are translocated to the cytosol. *J Cell Biol* 1991; 5: 1025-32.
33. Madshus IH, Stenmark H, Sandvig K, and Olsnes S. Entry of diphtheria toxin-protein A chimeras into cells. *J Biol Chem* 1991; 26: 17446-53.
34. Guidi-Rontani C. Internalization and translocation of a new chimeric protein composed of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and mouse dihydrofolate reductase as a model system. *Prot Engin* 1996; 7: 611-6.
35. Rojas M, Donahue JP, Tan Z, Lin YZ. Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotech* 1998; 4: 370-5.
36. Phelan A, Elliott G, O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotech* 1998; 5: 440-3.
37. Avrameas A, Ternynck T, Nato F, Buttin G, Avrameas S. Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 10: 5601-6.
38. Falnes PO, Olsnes S. Modulation of the intracellular stability and toxicity of diphtheria toxin through degradation by the N-end rule pathway. *EMBO J* 1998; 2: 615-25.
39. Lo-Man R, Leclerc C. Parameters affecting the immunogenicity of recombinant T cell epitopes inserted into hybrid proteins. *Hum Immunol* 1997; 2: 180-8.
40. Rappuoli R, Pizza M, Douce G, Dougan G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol Today* 1999; 54: 493-500.

TIRÉS À PART

C. Leclerc.

Summary

Antigen delivery using bacterial toxins

CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) represent a major part of the defenses against viruses, intracellular bacterias, parasites and tumors. CTL recognize short antigenic peptides complexed with class I major histocompatibility complex molecules (MHC I) at the surface of antigen presenting cells (APC). Antigens (Ag) recognized in this context generally derive from the cytosolic compartment of APC. In order to generate a protective CTL response, efficient vaccines should deliver vaccinal Ag into the cytosol. Several non replicating vectors, which design is based on the invasive potential of genetically detoxified bacterial toxins or self translocating peptides have been successfully used to deliver heterologous polypeptides into the cytosol of target cells. *In vitro* studies demonstrated that such vectors are able to target Ag into the cytosolic MHC class I Ag presentation pathway. Additionally, two of these recombinant toxins, the adenylate cyclase from *Bordetella pertussis* and the lethal factor from *Bacillus anthracis*, can induce *in vivo* CTL responses against the genetically grafted epitopes and protective immunity against the cognate virus, bacteria or tumor cells. These strategies could potentially lead to major advances in vaccine strategies.