

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.**

**Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**



JULIE CARBONNEAU

CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE IMMUNE NATURELLEMENT ACQUISE  
CHEZ L'HOMME AU COURS DE LA COLONISATION AVEC *MORAXELLA*  
(*BRANHAMELLA*) *CATARRHALIS*

Mémoire  
présenté  
à la faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
Microbiologie-immunologie  
UNIVERSITÉ LAVAL

NOVEMBRE 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43791-4

Canada

## RÉSUMÉ

*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* constitue un pathogène très important qui se situe au troisième rang comme agent responsable d'otites moyennes aiguës chez l'enfant. De plus, il peut causer différentes pathologies chez l'adulte immunosupprimé. La prédominance de *M. catarrhalis* chez ces groupes s'explique sans doute par l'importance du statut immunitaire dans la résistance à l'infection. L'étude de la réponse immune protectrice naturellement acquise chez l'homme contre *M. catarrhalis* permettrait de mettre au point un moyen de prévention adéquat pour diminuer la proportion et la gravité des infections associées à ce pathogène.

Des cellules lymphocytaires ont été isolées à partir de tissus amygdaliens afin d'évaluer leur implication dans la réponse immune contre *M. catarrhalis*. Ainsi, la présence de lymphocytes B sécréteurs d'immunoglobulines réagissant avec cette espèce bactérienne a été détectée par « enzyme-linked immunospot » (ELISPOT). De plus, suite à une expérience de fusion cellulaire deux lignées cellulaires sécrétant des anticorps spécifiques dirigés contre ce pathogène ont été isolées. Ces lignées, 1C2 et 8B5, correspondent à des clones de lymphocytes B naturellement transformés *in vivo*. La caractérisation d'anticorps produits par les lignées 1C2 et 8B5 a révélé qu'ils étaient dirigés contre un antigène de nature protéique exposé à la surface de la cellule. Cet antigène se retrouve spécifiquement chez *M. catarrhalis* et est conservé à travers les différents isolats cliniques testés. Le gène codant pour cette protéine a été cloné chez *Escherichia coli* et suite à une analyse par hybridation, il semble apparenté au gène codant pour la UspA2, une protéine impliquée dans la formation d'un oligomère de haut poids moléculaire identifié par Helminen *et al.* (1994).

## AVANT-PROPOS

La réalisation de ma maîtrise n'aurait pas atteint un tel succès sans la générosité et le support constant de certaines personnes. Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de maîtrise, le Dr Josée Hamel pour ses compétences, son professionnalisme, son optimisme, sa grande disponibilité et ses sourires encourageants. Je remercie sincèrement mon codirecteur, le Dr Denis Martin pour son support spirituel, ainsi que toute l'équipe de l'Unité de Recherche en Vaccinologie dirigée par le Dr Bernard R. Brodeur, plus précisément les chercheurs, les assistants et assistantes de recherche, particulièrement Marie-Josée Sylvain, Catherine Ouellet, Isabelle Charlebois, Marie-Josée Beaulieu, Marie-Josée Fournier et Edith Gagnon, les étudiants et stagiaires, Martin Plante, Diane Bussière et Martine Harvey, pour leur expertise, leur aide technique et leur support moral.

Ce mémoire n'aurait sans doute jamais vu le jour sans le soutien et les encouragements constants de certaines personnes très chères à mon cœur à qui je désire exprimer ma profonde gratitude. J'adresse donc mes plus chaleureux remerciements surtout à mes parents, Yolande et Jean, qui ont toujours su croire en moi, mais également à ma sœur Marie-Élise, à mes trois frères, Martin, Paul et Jean-Yves, à mes amies Julie, Marylène, Christine et Martin, de même qu'à une personne très importante à mes yeux, Monique Bisailon. Enfin, je ne pourrais passer sous silence tout le support de celui qui partage ma vie, Mario, qui a su m'aider, me soutenir et me comprendre lors des moments plus difficiles mais aussi partager mes joies tout au long de ma maîtrise, merci du fond du cœur.

**TABLE DES MATIÈRES**

RÉSUMÉ	i
AVANT-PROPOS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	viii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. Caractéristiques générales de <i>Moraxella catarrhalis</i>	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Propriétés microbiologiques	1
2. Importance clinique et traitements des infections	3
2.1 Incidence	3
2.2 Morbidité	4
2.2.1 Otites moyennes	5
2.3 Résistance aux antibiotiques	7
2.4 Traitements	8
3. Facteurs de virulence	9
3.1 Lipooligosaccharides (LOS)	10
3.2 Pili ou fimbriae	10
3.3 Protéines de la membrane externe (OMP)	11
3.3.1 UspA	11

3.3.2 OMP B1	13
3.3.3 OMP B2 ou Cop B	14
3.3.4 OMP CD	15
3.3.5 OMP E	16
4. Immunité anti-infectieuse	16
4.1 Sites de colonisation	16
4.2 Rôle d'organes lymphoïdes secondaires importants : les amygdales	17
4.3 Réponse immune de l'hôte envers <i>M. catarrhalis</i>	20
5. Problématique et objectifs du projet	21

## CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

ANTICORPS HUMAINS ANTI-MORAXELLA CATARRHALIS DIRIGÉS CONTRE UN ÉPITOPE CONSERVÉ DE LA PROTÉINE USPA ET EXPOSÉ À LA SURFACE	22
---	----

Human anti- <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> antibodies reactive with Conserved. surface-exposed UspA epitopes	24
Abstract	25
Introduction	26
Establishment of human cell lines 1C2 and 8B5 secreting antibodies reactive with <i>M. catarrhalis</i>	28
Characterization of the immunoreactivity of 1C2 and 8B5-specific antibody	29
Surface exposure of 1C2 and 8B5-reactive epitopes	30
Cloning of the genes encoding 1C2-reactive protein	31
Acknowledgments	34
References	43

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	47
1. Réponse immune humorale spécifique à <i>M. catarrhalis</i> chez l'homme	47
2. Production d'anticorps anti- <i>M. catarrhalis</i>	48
3. Caractérisation des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires anti- <i>M. catarrhalis</i>	51
3.1 Identification de la nature de l'antigène	51
3.2 Étude de la spécificité antigénique des anticorps	51
3.3 Étude de la conservation antigénique	53
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	55
1. Réponse immune locale anti- <i>M. catarrhalis</i> développée au niveau du tissu lymphoïde du nasopharynx	55
2. Fusion cellulaire et caractérisation antigénique des lignées cellulaires IC2 et 8B5	57
3. Hybridation avec des sondes constituées des gènes <i>uspA1</i> et <i>uspA2</i>	58
4. Expression de la protéine reconnue par les lignées cellulaires à la surface de la cellule	60
RÉFÉRENCES	62

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU I</b> : Évolution de l'étiologie des otites moyennes aiguës chez l'enfant aux États-Unis (tout âge confondu).	6
<b>TABLEAU II</b> : Masses moléculaires apparentes des protéines de la membrane externe de <i>M. catarrhalis</i> .	12
<b>TABLEAU III</b> : Réactivité, en ELISA, des anticorps sécrétés par les lignées de lymphocytes (hybridomes et lymphocytes B naturellement transformés <i>in vivo</i> ) avec des préparations de protéines de la membrane externe (OMPs) de <i>M. catarrhalis</i> ETSU C-2 et des préparations d'extraits cellulaires complets (ECC) de ETSU C-2, ETSU 645 et ETSU 658.	50
<b>TABLEAU IV</b> : Réactivité, en ELISA, des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires, avec des extraits cellulaires complets des isolats cliniques ETSU 658 et ETSU C-2 de <i>M. catarrhalis</i> traités ou non traités par des enzymes protéolytiques.	52
<b>TABLEAU V</b> : Évaluation, en ELISA, de la conservation des épitopes reconnus par les anticorps réagissant avec <i>M. catarrhalis</i> .	54
<b>TABLEAUX DE L'ARTICLE :</b>	
<b>TABLE 1</b> : Enumeration by ELISPOT assay of <i>M. catarrhalis</i> -specific ISCs in human palatine tonsils.	35
<b>TABLE 2</b> : List of <i>M. catarrhalis</i> clinical isolates used in this study.	36

<b>TABLE 3</b> : Immunoreactivity of 1C2 and 8B5-antibody against a panel of <i>M. catarrhalis</i> isolates.	37
<b>TABLE 4</b> : List of non- <i>M. catarrhalis</i> bacterial strains used in this study.	38

## LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1** : *Moraxella catarrhalis* ETSU 658, coupes de sections, amplification x 15,000. 2
- FIGURE 2** : Structure de la paroi de *Moraxella catarrhalis*. (Tiré de Bourgeois et al., 1993) 9
- FIGURE 3** : Schéma général de la réponse immune induite suite à l'introduction de *Moraxella catarrhalis* à l'intérieur de cryptes d'amygdales. *M.c.* : *Moraxella catarrhalis*, M : cellules M, M $\phi$  : macrophages, T : lymphocytes T, B : lymphocytes B, P : plasmocytes, Ac : anticorps dirigés contre *M. catarrhalis*, IgAs : dimères d'IgA sécrétoires. Tiré et adapté de Mitani *et al.* (Mitani, 1990). 18
- FIGURE 4** : Détection par immunobuvardage de six préparations d'anticorps polyclonaux humains issus de palatines avec des extraits cellulaires complets obtenus à partir de l'isolat clinique ETSU C-2 (A) ou de l'isolat clinique ETSU T-25 (B) qui ont été séparés sur SDS-PAGE puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Les préparations d'anticorps URV 64B (1), URV 66B(2), URV 68B(3) URV 74B(4), URV 77B(5) et URV 79B(6) ont été utilisées. 48
- FIGURE 5** : Caractérisation, par immunobuvardage, de la spécificité antigénique des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires 1C2(1), 1C7(2), 2B5(3), 8D3(4), 8B5(5), 9C3(6), 9D9(7) et d'une préparation d'anticorps polyclonaux issue d'une palatine : URV 153B(8), contre *M. catarrhalis*. Des extraits cellulaires complets des isolats cliniques ETSU C-2(A) et ETSU 658(B) ont été utilisés. 53

**FIGURES DE L'ARTICLE :**

**FIG. 1 :** Western immunoblot of *M. catarrhalis* with antibodies secreted by cell line 1C2. Whole cell lysates were obtained from *M. catarrhalis* strains ETSU P-1 (lane 1); ETSU P-3 (lane 2); ETSU C-2 (lane 3); ETSU T-25 (lane 4); ETSU 645 (lane 5); ETSU 658 (lane 6); ETSU 902 (lane 7) and ATCC 25240 (lane 8).

39

**FIG. 2 :** Comparaison, by Western immunoblotting, of the reactivity of murine monoclonal antibody 17C7 (lanes A) and human antibodies secreted by cell line 1C2 (lanes B) against OMP of *M. catarrhalis* ETSU P-1 (1); ETSU P-3 (2); ETSU C-2 (3); ETSU T-25 (4); ETSU 645 (5); ETSU 658 (6); ETSU 902 (7); and ATCC 25240 (8).

40

**FIG. 3 :** Surface accessibility of human antibody secreted by cell lines 1C2 and 8B5 to *M. catarrhalis* strain ETSU 658 tested by radioimmunoaccessibility. Live bacteria were incubated with supernates from cell line cultures, washed and then incubated with  $I^{125}$  labeled anti-immunoglobulin. Results are expressed as the mean cpm values and standard deviations of triplicates. Background value of 3388 cpm obtained with media alone was subtracted from test values.

41

**FIG. 4 :** Electron micrograph showing the attachment of 1C2 and 8B5 antibody at the surface of *M. catarrhalis*. *M. catarrhalis* strain ETSU 658 was probed with 1C2 (A), 8B5 (B), and control HiH1 (C) antibody. Bacteria were positively stained with uranyl acetate and lead citrate and observed at a magnification of 40 000 $\times$ .

42

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1 - Caractéristiques générales de *Moraxella catarrhalis*

#### 1.1 Taxonomie

Découvert en 1896, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* fut longtemps considéré comme un agent commensal du nasopharynx et de l'oropharynx (Frosh, 1896). Ce ne fut qu'au début des années 1970 qu'on l'envisagea responsable d'infections bactériennes telles les otites moyennes aiguës chez l'enfant ou les infections bronchopulmonaires.

Ghon et Pfeiffer furent les premiers à décrire cette bactérie et lui donnèrent le nom de *Micrococcus catarrhalis* (Ghon, 1902). Par la suite, puisqu'elle présentait des similarités phénotypiques et de niche écologique avec le genre *Neisseria*, on l'appela *Neisseria catarrhalis*. En 1970, suite à des études comparatives aux autres membres de la famille des *Neisseriaceae* au niveau des acides gras, d'hybridation d'ADN ou de comparaison de séquences d'ADN ribosomique 16S, on la classa plutôt dans le nouveau genre *Branhamella* en l'honneur de la microbiologiste Sarah Branham (Catlin, 1970). Enfin, dans l'édition de 1984 du *Bergey's Manual*, elle fut finalement assignée au genre *Moraxella* puisqu'elle présente de grandes similitudes génotypiques avec les espèces de ce dernier, en conservant toutefois le sous-genre *Branhamella* (Bøvre, 1984).

#### 1.2 Propriétés microbiologiques

*Moraxella catarrhalis* est un diplocoque gram-négatif, d'un diamètre variant entre 0.6-1.0 µm (Figure 1) (Bøvre, 1984). Il est aérobic strict, dépourvu de motilité et possède une oxydase mais ne produit pas de catalase (Bøvre, 1984). De plus, il est inapte à fermenter les carbohydrates habituellement employés pour l'identification du genre *Neisseria*, tels le glucose, le maltose, le sucrose ou le lactose (Doern, 1990). Par contre, il possède la

capacité de réduire les nitrates et les nitrites (Bøvre, 1984). Une autre caractéristique, permettant de confirmer son identité, est sa capacité de produire la DNase et une enzyme hydrolysant la tributyrine (Catlin, 1990 et Bourgeois, 1993).

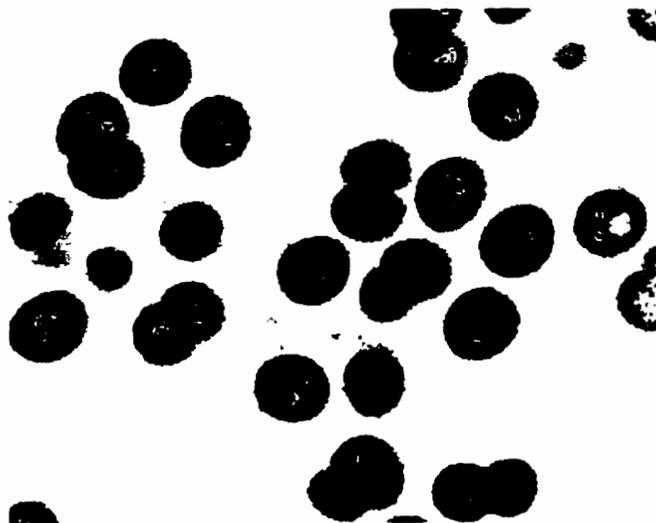


FIGURE 1 : *Moraxella catarrhalis* ETSU 658, coupes de sections, amplification  $\times 15,000$ .

D'un point de vue macroscopique, l'édition de 1984 du *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* décrit les colonies de *Moraxella catarrhalis* comme des hémisphères opaques aux contours nets d'un diamètre d'environ 2 mm suite à une incubation de 48 heures, devenant plus larges, convexes et plats lorsque l'incubation est poursuivie. Ces colonies sont de texture friable mais elles n'adhèrent pas à l'agar. De plus, elles ne sont pas hémolytiques.

Cette bactérie a la possibilité de croître sur milieu standard de laboratoire non enrichi tels le BHI (« brain heart infusion » ou infusion de cœur et cervelle) et le TSA (« tryptic soy digest » ou hydrolysate de soja). Par contre, sa croissance est optimale sur milieu contenant du sang et supplémenté de vitamines et d'acides aminés comme les géloses chocolat. *M. catarrhalis* pousse à l'air ambiant dans un écart de températures variant entre 20 et 42°C, mais préférablement entre 35 et 37°C avec une atmosphère enrichie de 5 % de CO<sub>2</sub> (Doern, 1981).

## 2 - Importance clinique et traitements des infections

### 2.1 Incidence

*Moraxella catarrhalis* infecte uniquement les humains (Murphy, 1996). En effet, à ce jour, aucun réservoir animal n'a encore été découvert. Cette bactérie colonise presque exclusivement le pharynx de l'homme. On estime qu'elle se retrouve au niveau du nasopharynx dans 12 % des cas étudiés et dans des proportions variant de 10 à 97 % dans l'oropharynx (Bourgeois, 1993). De plus, il existe une relation entre l'âge et le taux de colonisation.

La colonisation du système respiratoire par *M. catarrhalis* est commune chez les enfants. Une étude élaborée sur 120 enfants a démontré que chez 66 % d'entre eux on repérait ce microorganisme avant l'âge de 1 an, cette proportion s'élevant à 77.5 % chez les enfants de moins de 2 ans, ce qui augmente de façon significative le risque de cette population à contracter des otites moyennes aiguës causées par *M. catarrhalis* (Faden, 1994). D'autres études évaluent ce taux de colonisation à 48.9 % chez les enfants âgés de 3 à 12 ans (Ejlertsen, 1994) et à 54 % chez les enfants de plus de 4 ans (Vanechoutte, 1990). En Australie, à l'intérieur d'une communauté aborigène résidant près de Darwin, 100 % des enfants sont colonisés avant l'âge de 3 mois (Leach, 1994). Toutes ces études utilisent des méthodes semblables de culture, ce qui indique que les différents résultats reflètent la variété de taux de colonisation chez les diverses populations. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations, tels les conditions de vie et d'hygiène, des facteurs environnementaux tels que la fumée provenant de parents fumeurs et possiblement l'hérédité.

Le taux de colonisation est cependant moindre chez les adultes. En effet, le taux de porteurs sains chez cette population se situe entre 1 à 5 % (Ejlertsen, 1994). Toutefois, chez les adultes présentant une maladie pulmonaire chronique, un déficit respiratoire latent (bronchite chronique, asthme, bronchectasie), un facteur prédisposant aux infections respiratoires (tabagisme, maladies cardio-pulmonaires) (Denamur, 1987 et

Sarrubi, 1990) ou encore un déficit du système immunitaire dû à l'ingestion d'agents chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs, le taux de colonisation par ce pathogène semble plus important (Murphy, 1996 et Bourgeois, 1993). Une autre étude nous révèle en outre que le taux de colonisation peut atteindre au cours du vieillissement un taux de 26.5 % chez les adultes âgés de plus de 60 ans (Vanechoutte, 1990).

Les infections à *M. catarrhalis* semblent plus fréquentes durant les périodes hivernales. Les raisons de ces variations d'incidence saisonnière ne sont pas encore très bien élucidées. Des infections virales peuvent être à l'origine de dommages aux muqueuses membranaires et favoriser ainsi la colonisation par la bactérie (Van Hare, 1987). La fréquentation de garderie ou de l'école et la diminution des sorties extérieures sont des facteurs également susceptibles de jouer un rôle dans sa propagation d'un individu à l'autre (Van Hare, 1987).

## 2.2 Morbidité

Chez l'adulte, *M. catarrhalis* présente un tropisme particulier pour les voies bronchopulmonaires (Denamur, 1987). En effet, des bronchites, des pneumonies et des trachéites peuvent être causées par ce pathogène. Plus rarement, *M. catarrhalis* peut être retrouvé au cours de sinusites, d'infections urinaires et d'urétrites (Catlin, 1990) ou lors de conjonctivites (Kawakami, 1983). Enfin, elle peut également causer des infections invasives incluant les méningites, les endocardites, les bactériémies et l'arthrite chez les individus immunodéficients (Murphy, 1996).

Chez les enfants, les infections les plus communes causées par *M. catarrhalis* sont les otites moyennes et les sinusites. De rares cas de trachéites, mastoïdites, conjonctivites (Marchant, 1990), arthrites, méningites (Catlin, 1990) et bactériémies (Murphy, 1996) ont également été décrits.

### 2.2.1 Otites moyennes

L'otite moyenne est une infection commune chez les enfants âgés entre 1 et 7 ans. En effet, 70% des individus appartenant à ce groupe d'âge souffriront au moins une fois d'otite moyenne avant l'âge de trois ans (Bluestone, 1988). *M. catarrhalis* est la troisième cause la plus commune d'otites moyennes aiguës et d'otites moyennes sériques après *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* (Bluestone, 1986, Murphy, 1989, Van Hare, 1987 et Brook, 1994). Ces trois pathogènes sont à l'origine de 75 % des otites moyennes aiguës et 50 % des otites moyennes sériques (Brook, 1994). On estime que *M. catarrhalis* est responsable à lui seul de 15 à 20 % des cas d'otites. L'incidence des otites moyennes aiguës causées par cette bactérie a nettement augmentée depuis 1956 aux États-Unis (Tableau I).

Certains facteurs peuvent prédisposer un individu aux otites moyennes, tels une malformation de la trompe d'Eustache, des écoulements au niveau de l'oreille moyenne, des sinusites et des adénoïdites, sans compter plusieurs facteurs environnementaux comme la fréquentation des garderies, la fumée de cigarettes, les narcotiques et la consommation d'alcool ou l'inhalation de fumée par la mère au cours de la grossesse (Van Cauwenberge, 1984).

Au cours de l'infection, il y a altération de la fonction de la trompe d'Eustache, donc création d'une pression négative dans l'oreille moyenne et aspiration du liquide dans cet espace. La contamination bactérienne dans l'oreille moyenne s'ensuit à travers le reflux de mucus en provenance de l'oropharynx. Une réponse inflammatoire commence alors, les vaisseaux sanguins se congestionnent et il y a œdème. Si l'infection n'est pas traitée, il peut y avoir accumulation de liquide et formation de pus. Un traitement à l'aide d'antibiotiques résout généralement l'infection aiguë à ce stade mais occasionnellement, la thérapie échoue. Chez ces individus, l'infection due à un organisme résistant se développe et une infection polymicrobienne s'ensuit, ce qui résulte en une inflammation chronique. Selon le temps de résolution de l'otite, on qualifiera l'otite d'aiguë (résolution

en moins de 3 semaines), de sérique (entre 3 semaines et 3 mois) et de chronique (plus de 3 mois) (Faden, 1995).

TABLEAU I : *Évolution de l'étiologie des otites moyennes aiguës chez l'enfant aux États-Unis (tout âge confondu).*

Année	Nombre de cas	<i>Streptococcus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Moraxella</i>
	10 <sup>5</sup> habitants	<i>pneumoniae</i> (%)	<i>influenzae</i> (%)	<i>catarrhalis</i> (%)
1956	68	68	40	0
1967	698	41	42	12
1969	306	56	42	7
1970	858	48	29	11
1975	97	48	27	21
1983	146	32	25	19
1984	98	27	12	20
1986	247	34	21	19
1987	355	39	29	17

*Tiré et adapté de Bourgeois et al (Bourgeois, 1993).*

Les otites moyennes aiguës sont habituellement résolues par un traitement adéquat à l'aide d'antibiotiques. Par contre, lorsqu'il s'agit d'otites sériques ou chroniques, il faut régulièrement avoir recours à la chirurgie en procédant plus précisément à l'ablation des adénoïdes et à l'implantation de tubes ventilés afin de favoriser l'écoulement de liquide et l'aération de l'oreille moyenne (Brook, 1994). On ignore encore la raison pour laquelle l'incidence d'otites est aussi élevée chez les enfants. Faden *et al.* (1991) suggèrent qu'une anomalie sélective de la réponse immune réduirait l'efficacité de la clairance des pathogènes.

### 2.3 Résistance aux antibiotiques

L'acquisition d'une résistance est la conséquence de mutations chromosomiques ou de l'apport de matériel génétique souvent sous forme de plasmides ou de transposons. Les principaux mécanismes à l'origine de la résistance sont la modification de la perméabilité membranaire, l'altération de la cible de l'agent antibactérien et la synthèse d'enzymes inhibant l'activité de l'antibiotique. On a récemment découvert, chez *M. catarrhalis*, la  $\beta$ -lactamase, une enzyme dont la fonction est d'hydrolyser les antibiotiques de type  $\beta$ -lactamine.

En 1976, la toute première  $\beta$ -lactamase fut décrite et isolée de *M. catarrhalis* (Wallace, 1989). Depuis, le pourcentage de *M. catarrhalis* productrices de  $\beta$ -lactamase ne cesse de croître. En effet, à l'heure actuelle, 80 % à 90 % des souches sécrètent l'enzyme (Catlin, 1990 et Ejlersen, 1994). La raison de cette dramatique émergence de souches productrices de  $\beta$ -lactamase n'est pas très claire. Certaines hypothèses, telles que l'accroissement de prescriptions d'antibiotiques  $\beta$ -lactamines et l'augmentation de souches  $\beta$ -lactamase-positives d'autres espèces comme *Neisseria gonorrhoeae* ou *H. influenzae*, ont été émises (Enright, 1997).

*M. catarrhalis* possède deux principaux types de  $\beta$ -lactamase de phénotype apparenté. Elles sont appelées BRO-1 et BRO-2, leur nom dérivant de *Branhamella* et *Moraxella* (Wallace, 1989). On a signalé un troisième type enzymatique, BRO-3, mais il n'est détectable que dans les extraits cellulaires traités par la papaïne (Christensen, 1991). Ces enzymes peuvent être distinguées selon leur point isoélectrique. Il semble que 90 % des  $\beta$ -lactamases de *M. catarrhalis* soient de type BRO-1 et 10 % de type BRO-2 (Wallace, 1989, Wallace, 1990 et Christensen, 1991). La résistance conférée à la bactérie par l'enzyme BRO-1 serait plus élevée que celle due à l'enzyme BRO-2 puisque le niveau d'expression de cette dernière serait de 2 à 3 fois moins élevé que celui de BRO-1 (Wallace, 1990).

Jusqu'à maintenant, on a retrouvé les  $\beta$ -lactamases BRO uniquement chez *M. catarrhalis* et deux espèces très rapprochées, *M. lacunata* et *M. nonliquefaciens* (Wallace, 1989). Le transfert par conjugaison de l'une de ces souches, productrice de  $\beta$ -lactamases à une autre d'entre elles, dépourvue de l'enzyme, a été réalisé par Chaïbi *et al.* (1995). L'acquisition de la résistance par *M. catarrhalis* origine donc possiblement de l'une ou de l'autre de ces deux espèces de *Moraxella*.

Les  $\beta$ -lactamases BRO-1 et BRO-2 présentent des profils d'hydrolyse identiques et sont classées parmi les pénicillinases. En effet, elles hydrolysent, à des vitesses similaires, leurs substrats, soit l'ensemble des pénicillines, telles la pénicilline G, l'ampicilline et la méthicilline, en plus des céphalosporines de première génération et de certaines céphalosporines de deuxième génération (Bourgeois, 1993). Elles sont de plus fortement inhibées par de très faibles quantités d'acide clavulanique ou de sulbactam (Farmer, 1986).

#### 2.4 Traitements

L'accroissement des souches de *M. catarrhalis* capables de synthétiser une enzyme inhibant certains antibiotiques, tel qu'énoncé plus haut, complique grandement le traitement des infections induites par ce microorganisme. On a en outre démontré que la présence d'une souche de *M. catarrhalis* productrice de  $\beta$ -lactamase protège les autres pathogènes respiratoires présents contre les antibiotiques  $\beta$ -lactamines, lors d'une infection polymicrobienne (Hol, 1994 et Wardle, 1986). Il devient donc impératif de traiter de façon efficace ce genre d'infections.

Puisque l'acide clavulanique inhibe fortement les  $\beta$ -lactamases synthétisés par cette bactérie, la combinaison de l'amoxicilline à l'acide clavulanique présente la meilleure activité bactéricide. Bien que *M. catarrhalis* soit classiquement décrit comme sensible aux aminosides, chloramphénicol, tétracyclines et cotrimoxazole (Chardon, 1989) ainsi qu'aux macrolides (Chardon, 1988), un nombre d'études comparatives a démontré que l'amoxicilline en association avec l'acide clavulanique est un agent thérapeutique

d'efficacité comparable à ces agents mais qui est supérieur au céfador. du moins pour le traitement des otites moyennes aiguës (Brook, 1994). Une autre étude visant à comparer la vitesse bactéricide de la céfoxitine, du moxalactam et de l'association amoxicilline-acide clavulanique a démontré que cette dernière présente la plus grande vitesse de bactéricidie (Bourgeois,1991).

### 3 - Facteurs de virulence

La dynamique de l'infection bactérienne par *M. catarrhalis* demeure, encore de nos jours, peu élucidée. Les recherches accrues sur *M. catarrhalis* depuis quelques années ont néanmoins permis d'élargir nos connaissances sur quelques-uns de ses caractères de virulence. *M. catarrhalis* possède une paroi caractéristique de bactéries gram-négatif comprenant une membrane externe, une couche de peptidoglycane, un espace périplasmique et une membrane cytoplasmique (Figure 2). Certains éléments de la paroi sont impliqués dans la virulence de la bactérie. Ce sont les lipooligosaccharides (LOS), les pili ou fimbriae et les protéines de la membrane externe (OMP).

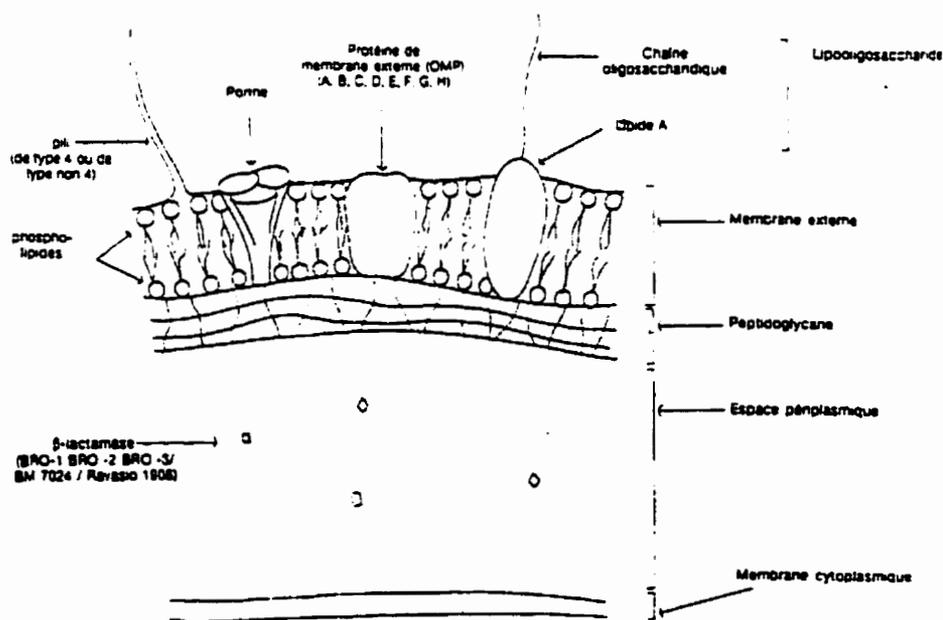


FIGURE 2 : Structure de la paroi de *Moraxella catarrhalis*. (Tiré de Bourgeois et al., 1993)

### 3.1 Lipooligosaccharides (LOS)

Les lipopolysaccharides (LPS) de *M. catarrhalis* sont dépourvus de l'antigène O, des unités répétées de 3 à 5 glucides prolongeant la partie centrale (« core »), d'où leur nom de lipooligosaccharides (LOS). On retrouve une structure générale similaire de LOS chez *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* et *Bordetella pertussis* (Flesher, 1978, Griffiss, 1988 et Caroff, 1990). Les propriétés sérologiques des LOS de *M. catarrhalis* indiquent moins de variabilité structurale comparativement aux autres genres bactériens. En effet, les LOS de 95% des souches se distinguent en trois types antigéniques majeurs. Des études ont démontré que la partie carbohydrate des LOS est responsable des distinctions antigéniques alors que la partie centrale est commune à toutes les souches (Edebrink, 1944 et Edebrink, 1995). La différence entre les sérotypes réside dans la partie terminale du sucre avec le résidu  $\alpha$ -D-GlcNAc-(1-2)- $\beta$ -D-Glc spécifique au sérotype A (Edebrink, 1944), le résidu  $\beta$ -D-Glc-(1-4)- $\beta$ -D-Glc spécifique au sérotype B (Rahman, 1996) et le résidu  $\beta$ -D-Glc-(1-4)- $\alpha$ -D-GlcNAc spécifique au sérotype C (Edebrink, 1995). La partie commune des trois résidus se termine par l'épitope  $\alpha$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\alpha$ -Glc (Edebrink, 1944). Il a été reporté qu'il existe une réaction croisée entre les différents sérotypes de *M. catarrhalis*, principalement entre les sérotypes A et C (Vanechoutte, 1990).

Weiser (1992) a démontré que les LOS constitueraient un des facteurs importants dans la pathogénèse de l'infection. De plus, il est possible que l'expression accrue de LOS soit impliquée dans une stratégie de défense de la bactérie pour échapper au système immunologique de l'hôte lors de la colonisation ou de l'invasion, tout comme dans le cas d'*H. influenzae* (Weiser, 1992).

### 3.2 Pili ou fimbriae

La majorité des souches de *M. catarrhalis* possède des pili, des protéines filamenteuses retrouvées à sa surface. Le rôle des pili chez ce pathogène n'est cependant pas clairement élucidé et demeure encore, à ce jour, très controversé. Certains affirment qu'ils seraient

associés à l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales de la muqueuse (Beachey, 1981), alors que d'autres ont observé qu'il n'existait pas de corrélation directe entre la présence de pili, l'adhérence de *M. catarrhalis* aux cellules épithéliales et l'hémagglutination (Ahmed, 1990 et Rikitomi, 1991).

Les pili sont composés de plus de 10 000 sous-unités protéiques polymérisées, appelées pilines. Il existe différents types de pili, distingués par leur morphologie, leur fonction et le type de pilines qui les composent (Klemm, 1985). Une hybridation avec le gène du pilus de *M. bovis* a permis d'identifier la présence du pilus de type 4 chez certaines souches de *M. catarrhalis* (Marrs, 1990). De plus, une autre étude a démontré la présence de pili de types différents chez le pathogène tant *in vitro* (Ahmed, 1990) qu'*in vivo* (Ahmed, 1994). Cependant, l'expression des pili diminuerait au cours du passage des souches *in vitro* (Ahmed, 1992).

### 3.3 Protéines de la membrane externe (OMP)

Depuis 1980, plusieurs méthodes permettant d'extraire les protéines de la membrane externe de *M. catarrhalis* ont été mises au point (Murphy, 1989). L'analyse de la migration des OMP sur gel SDS-PAGE a démontré le très haut degré de similarité entre les souches d'isolats cliniques provenant de diverses régions géographiques et de sites anatomiques variés (Bartos, 1988). En plus d'une protéine de haute masse moléculaire, on retrouve 8 protéines majeures, nommées OMP A, B1, B2, CD, E, F, G et H, dont les masses moléculaires varient de 98 000 à 21 000 daltons (Tableau II), et de 10 à 20 protéines mineures (Murphy, 1990 et Murphy, 1996).

#### 3.3.1 UspA

Plusieurs études ont décrit une protéine de très haute masse moléculaire de *M. catarrhalis*, appelée UspA (« Ubiquitous surface protein A ») ou HMWP (« High-Molecular-Weight Protein »), qui est produite par tous les isolats cliniques testés jusqu'à présent (Helminen, 1994 et Klingman, 1994). Un anticorps monoclonal (MAb) murin.

17C7, reconnaît un épitope conservé et exposé à la surface de *M. catarrhalis* (Helminen, 1994). L'immunisation passive chez la souris à l'aide de ce MAb a résulté en une augmentation de la clairance bactérienne pulmonaire suggérant le caractère immunoprotecteur de la protéine UspA (Helminen, 1994). Chen *et al.* (1996) ont démontré que l'injection chez la souris de la protéine UspA purifiée induit la formation d'anticorps qui favorisent la clairance pulmonaire d'isolats homologues et hétérologues. Au cours de cette étude, il a également été démontré que les anticorps anti-UspA sont pourvus d'une activité bactéricide en présence de complément. Lors d'une autre étude, la présence d'anticorps anti-UspA a été détectée dans le sérum de patients en phase de convalescence mais non en phase aiguë de la pneumonie causée par *M. catarrhalis* (Helminen, 1994). De plus, il a été démontré que des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine UspA bloquent l'adhérence de *M. catarrhalis* à des cellules HEP-2 (Chen, 1995). Enfin, Verduin *et al.* (1995) suggèrent que cette même protéine serait également impliquée dans la résistance du pathogène au complément. Toutes ces études suggèrent que la protéine UspA de *M. catarrhalis* est produite *in vivo* et qu'elle participe à la pathogenèse de la bactérie.

TABLEAU II : *Masses moléculaires apparentes des protéines de la membrane externe de M. catarrhalis.*

OMP	Masses moléculaires (kDa)
UspA (HMW-OMP)	350-700
OMP A	98
OMP B 1	84
OMP B 2 (Cop B)	80
OMP CD	60 (46) <sup>a</sup>
OMP E	50
OMP F	43
OMP G	28
OMP H	20

<sup>a</sup>La masse moléculaire entre parenthèses est celle de la protéine non modifiée à la chaleur.

Des études récentes ont décrit que deux gènes chez *M. catarrhalis* O35E codent pour une protéine immunoréactive avec le MAb 17C7 (Aebi, 1997). En effet, le criblage immunologique d'une banque génomique construite à l'aide de bactériophages, a permis d'identifier un premier gène codant pour une protéine de 88 kDa, désignée UspA1. Ce gène contient des unités répétitives d'acides aminés (Aebi, 1997). L'analyse immunologique de mutants *uspA1* a suggéré la présence d'un deuxième gène (Aebi, 1997). L'utilisation combinée d'un criblage immunologique à l'aide du MAb 17C7 et de la technologie du PCR a permis d'identifier un deuxième gène codant pour une protéine de 62 kDa, appelée UspA2 (Aebi, 1997). Sur gel SDS-PAGE, les protéines natives monomériques, UspA1 et UspA2, migrent selon une masse moléculaire apparente de 120 et 85 kDa, respectivement (Aebi, 1997).

Il a été suggéré que la protéine UspA1 puisse jouer un rôle dans l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales puisqu'elle présente certaines homologues avec une macromolécule impliquée dans la formation de filaments à la surface d'*H. influenzae* de type b (St. Geme, 1995 et St. Geme, 1996). De son côté, la protéine UspA2 est similaire (27 % d'identité et 47 % de similarité en acides aminés) à un facteur de virulence du genre *Yersinia*, la protéine YadA. Cette dernière est une adhésine impliquée directement dans la virulence de *Yersinia* (Aebi, 1997). Les protéines UspA1 et UspA2 sont donc susceptibles de jouer un rôle très important au niveau de la virulence de *M. catarrhalis*.

### 3.3.2 OMP B1

Une étude effectuée par Sethi *et al.* (1995) a établi que le sérum de patients atteints d'une bronchite à *M. catarrhalis* possède des anticorps principalement dirigés contre une protéine de la membrane externe induite en absence de fer. Cette protéine possède une masse moléculaire évaluée à 84 kDa et est appelée OMP B1. En effet, les différents pathogènes humains ont dû développer certains mécanismes pour répondre à leur besoin et ainsi croître dans des environnements limités en fer comme le sang et les muqueuses humaines. *M. catarrhalis*, de même que certaines espèces des *Neisseriaceae* telles que *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, ont développé un mécanisme qui consiste à exposer des

récepteurs à la transferrine et à la lactoferrine humaine à la surface de la bactérie (Campagnari, 1994). Campagnari *et al.* (1994) ont démontré que *M. catarrhalis* exprime une protéine spécifique fortement induite sous des conditions de culture limitantes en fer. l'OMP B1, qui serait susceptible de jouer le rôle de récepteur à la transferrine (Campagnari, 1996).

Il a été démontré qu'OMP B1 se retrouve dans la membrane externe de tous les isolats cliniques testés jusqu'à maintenant (Campagnari, 1996) bien qu'elle soit hétérogène donc peu conservée antigéniquement (Sethi, 1995). De plus, il a été confirmé que les enfants infectés par *M. catarrhalis* possèdent des anticorps de type immunoglobulines G dirigés contre OMP B1. ce qui suggère que cette protéine est immunogène et fortement exprimée *in vivo* (Campagnari, 1996).

### 3.3.3 OMP B2 ou Cop B

Tout comme OMP B1, la production de OMP B2, aussi appelé CopB, augmente de façon substantielle lorsque *M. catarrhalis* est mise en présence de conditions de croissance limitée en fer (Campagnari, 1994). OMP B2 serait impliquée dans la stimulation du transport de dérivés de transferrines et de lactoferrines, sans pour autant lier directement ces composés (Aebi, 1996). Aussi, l'immunisation passive chez la souris avec le MAb 10F3 dirigé contre OMP B2 accélère la clairance bactérienne pulmonaire (Helminen, 1993). L'analyse antigénique de OMP B2 à l'aide d'anticorps monoclonaux a démontré une conservation modérée d'épitopes exposés à la surface de la cellule bactérienne (Helminen, 1993). Cependant, plus récemment, il a été démontré, qu'il existe beaucoup d'hétérogénéité au niveau des séquences du gène de OMP B2 de diverses souches de *M. catarrhalis*. La comparaison des séquences a révélé qu'il existe entre 92 et 96% d'homologie au niveau de l'ADN et entre 90 et 95% d'homologie au niveau des acides aminés (Sethi, 1997). La variabilité de la séquence protéique est principalement confinée à trois régions modérément variables surtout composées d'acides aminés hydrophiles et potentiellement exposées à la surface de la cellule (Sethi, 1997).

La résistance à l'action du complément joue un rôle important dans la virulence des bactéries gram-négatif (Verduin, 1993). Certaines souches de *M. catarrhalis* produisent une protéine qui interfère avec la cascade des réactions du complément menant à la formation de complexes d'attaque membranaire et rend ainsi le pathogène résistant au sérum (Verduin, 1994). Une étude effectuée sur la caractérisation de mutants OMP B2 a révélé que les souches mutantes sont beaucoup plus sensibles à la lyse par le sérum humain et sont éliminés beaucoup plus rapidement des poumons de souris que la souche sauvage (Helminen, 1993). De plus, cette propriété se rétablit lorsqu'il y a de nouveau expression de OMP B2 (Helminen, 1993). Les souches résistantes au complément sont plus fréquemment rencontrées chez les enfants et les patients atteints de maladies pulmonaires chroniques que chez les porteurs sains (Hol, 1995). Ces données suggèrent que la protéine OMP B2 joue un rôle important dans l'interaction de *M. catarrhalis* et les mécanismes de défense de l'hôte.

#### 3.3.4 OMP CD

Malgré le fait que la protéine de la membrane externe CD migre sous la forme d'un doublet sur gel SDS-PAGE, aux environs de 60 kDa, il a été démontré que les deux bandes originent d'un seul gène (Bartos, 1988 et Murphy, 1989). La protéine CD est modifiable à la chaleur et l'analyse de la séquence en acides aminés déduite de la séquence d'ADN permet d'affirmer que sa masse moléculaire correspond davantage à 46 kDa (Murphy, 1993). Une région riche en prolines serait à l'origine de cette migration particulière sur gel SDS-PAGE (Murphy, 1993). Des études ont démontré que OMP CD est présente chez toutes les souches testées jusqu'à maintenant (Bartos, 1988, Sarwar, 1992, Murphy, 1993 et Hsiao, 1995). De plus, une analyse effectuée à l'aide de deux MAb a révélé que OMP CD se compose d'épitopes très conservés exposés à la surface et spécifiques à *M. catarrhalis* (Sawar, 1992). Selon cette étude, l'expression des épitopes reconnus par les Mab est indépendante du milieu ou de la phase de croissance de la bactérie. Des études de comparaison de séquences de protéines ont révélé que OMP CD présente une certaine homologie à OprF, une porine retrouvée chez plusieurs espèces de

*Pseudomonas*. Ainsi, il est possible que OMP CD soit une porine de *Moraxella* (Murphy, 1993).

### 3.3.5 OMP E

Plusieurs études ont démontré que la protéine OMP E est présente chez toutes les souches de *M. catarrhalis* testées à ce jour (Bartos, 1988 et Bhushan, 1994). De plus, deux des quatre MAb murins dirigés contre cette protéine reconnaissent des épitopes exposés à la surface de la bactérie (Bhushan, 1997). Cependant, la présence d'anticorps n'a pas été détectée dans les sérums et muqueuses de patients atteints de maladies infectieuses des voies respiratoires inférieures dues à *M. catarrhalis*, ce qui indique que OMP E n'est pas un antigène immunodominant (Bhushan, 1997).

Le gène codant pour OMP E a été cloné et séquencé (Bhushan, 1994). Le gène code pour une protéine possédant une certaine homologie avec FadL de *Escherichia coli* (Black, 1991), une protéine qui agit comme récepteur pour le bactériophage T2. On sait que l'extrémité carboxy-terminale de FadL est requise pour la liaison spécifique et le transport à travers la membrane des acides gras à longues chaînes.

## 4 – Immunité anti-infectieuse

### 4.1 Sites de colonisation

Suite à une étude effectuée chez 40 enfants en parfaite santé, Faden *et al.* (1990) ont observé que le taux de porteurs sains de *M. catarrhalis* chez cette population s'élève à 52%. Une autre étude, effectuée cette fois par Ingvarsson, *et al.* (1982) sur la flore bactérienne du nasopharynx d'enfants sains âgés de moins de 8 ans, indique que *M. catarrhalis* est le pathogène le plus fréquemment isolé, avec 36% de colonisation comparativement à 19% pour *S. pneumoniae*, 13% pour *H. influenzae* et 37% pour les bactéries qualifiées de non-pathogènes. Des données publiées dans « Manual of clinical microbiology » nous révèlent que *M. catarrhalis* colonise principalement les voies

respiratoires. On retrouve ce pathogène plus spécifiquement dans la salive, sur les gencives, au niveau du nez et des sinus, en plus des régions habituellement jugées stériles, telles que le nasopharynx, l'oropharynx, la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles (Isenberg, 1995). Par contre, bien qu'en nombre plus restreint, *M. catarrhalis* est également susceptible d'être rencontrée dans les oreilles, sur la peau abîmée ou brûlée, au niveau du tractus génito-urinaire, dans les yeux et même dans le sang (Isenberg, 1995 et Christensen, 1994). Cependant, il s'avère que pour envahir les régions normalement stériles comme les voies respiratoires inférieures et le sang, la bactérie doit traverser les barrières mucoales. Il ressort que l'immunité locale joue un rôle prépondérant dans la prévention de la colonisation et des étapes subséquentes de l'infection.

Beachey (1981) fut en mesure d'affirmer que bien qu'à ce jour aucune protéine n'a été identifiée comme étant directement impliquée dans l'adhérence, les pili, ou fimbriae, jouent généralement un rôle prédominant dans l'attachement de la bactérie aux surfaces de la muqueuse. Cette adhérence de la bactérie aux cellules de la muqueuse est une étape déterminante dans la pathogénèse de l'infection et prévient l'expulsion du micro-organisme par le mouvement ciliaire. Des études récentes sur la nature des récepteurs permettant l'attachement de *M. catarrhalis* à l'épithélium du système respiratoire, suggèrent que les pili interagissent avec des récepteurs de glycosphingolipides (Ahmed, 1996). De là, la bactérie se fraie probablement un chemin à travers la barrière de l'épithélium pour infecter les tissus environnants.

#### 4.2 Rôle d'organes lymphoïdes secondaires importants : les amygdales

Les tissus lymphoïdes de l'anneau de Waldeyer, comprenant les amygdales pharyngales ou adénoïdes, ainsi que les palatines et les linguales, sont sans contredit les tissus lymphoépithéliaux les plus importants du tractus respiratoire supérieur. En effet, c'est à eux que revient la fonction de première ligne de défense contre les virus, les bactéries et les antigènes d'origine alimentaire qui entrent dans le système aéro-digestif. Les amygdales se situent dans un environnement stratégique qui leur permet d'assurer une

réponse immunitaire locale adéquate. Les adénoïdes, situées au niveau du nasopharynx, communiquent directement avec l'orifice de la trompe d'Eustache, l'entrée unique de l'oreille moyenne. Les palatines, pour leur part, sont retrouvées à l'entrée des tractus respiratoire et gastro-intestinal. Elles sont donc les premiers tissus immunocompétents à entrer en contact avec les microorganismes exogènes. Enfin, les amygdales linguales, d'une importance moindre en ce qui concerne l'immunité des voies respiratoires, sont situées à la racine de la langue.

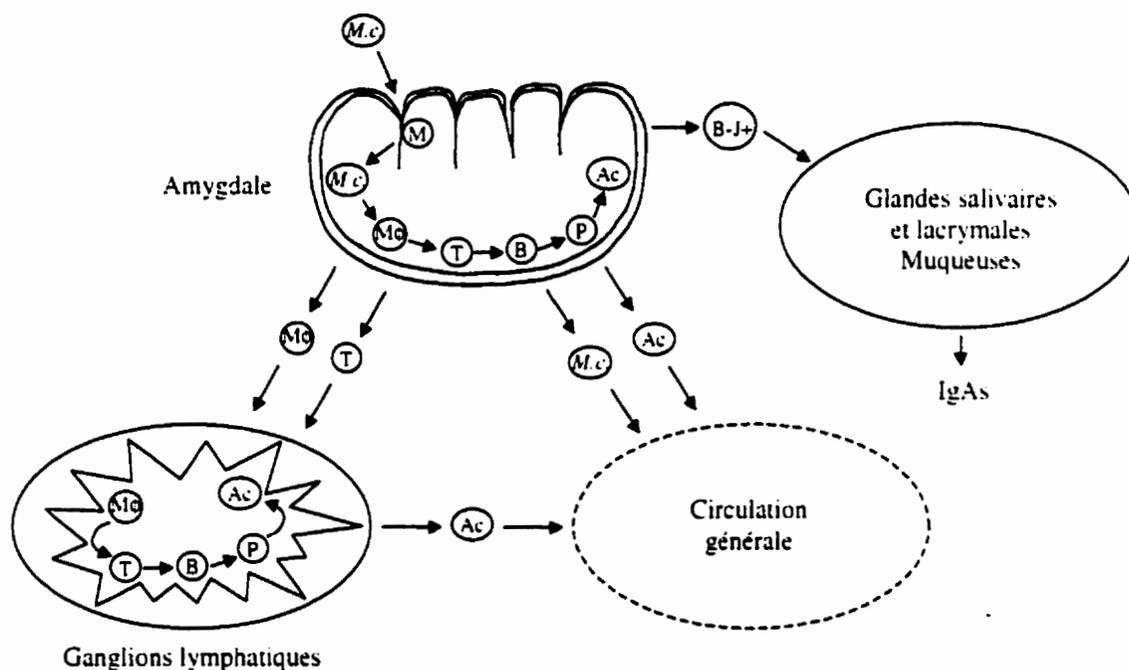


FIGURE 3 : Schéma général de la réponse immunitaire induite suite à l'introduction de *Moraxella catarrhalis* à l'intérieur de cryptes d'amygdales. M.c. : *Moraxella catarrhalis*, M : cellules M, Mφ : macrophages, T : lymphocytes T, B : lymphocytes B, P : plasmocytes, Ac : anticorps dirigés contre *M. catarrhalis*, IgAs : dimères d'IgA sécrétoires. Tiré et adapté de Mitani et al. (Mitani, 1990).

Du point de vue structural, l'amygdale est revêtue d'un épithélium qui s'invagine de façon à former des cryptes, sites où l'antigène fait son entrée. Lorsque la bactérie pénètre à l'intérieur d'une crypte, elle est immédiatement capturée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) retrouvées dans cette région appelée épithélium réticulaire : les macrophages et les cellules de Langerhans. Les CPA transportent alors les différents

antigènes bactériens à l'intérieur de follicules lymphoïdes avec ou sans centres germinatifs situés sous l'épithélium, afin de les présenter aux divers lymphocytes et ainsi déclencher la réponse immune qui résulte en l'activation des lymphocytes T et en la production d'immunoglobulines A (IgA), d'IgG et d'IgM spécifiques, sécrétés dans les cryptes par les lymphocytes B. La migration des CPA et des lymphocytes T et B peut également se poursuivre pour s'achever au niveau des nodules lymphatiques ou dans la circulation (Bernstein, 1992). Ainsi, l'induction d'une réponse immune locale résulte également en une réponse systémique contre le pathogène (Figure 3).

Les amygdales sont le foyer de lymphocytes B précurseurs sécréteurs de chaînes J. Ces dernières sont nécessaires à la formation de dimères d'IgA qui migreront dans l'ensemble du système respiratoire supérieur, donc au niveau des sites glandulaires, des muqueuses nasales et de l'oreille moyenne. Les dimères d'IgA ainsi sécrétés sont dotés de propriétés hydrophiles particulières, qui leur permettent de prévenir l'adsorption et la pénétration des bactéries et des virus à l'intérieur de la muqueuse du système respiratoire supérieur (Bernstein, 1992).

Une amygdale peut contenir plus de  $10^9$  cellules lymphocytaires, ce qui représente approximativement 0.2 % des lymphocytes totaux de l'adulte (Siegel, 1983). Des études ont démontré que parmi les cellules immunocompétentes présentes dans l'amygdale, on retrouve principalement des lymphocytes, soit entre 92 et 98 %, alors que les plasmocytes et les CPA constituent respectivement jusqu'à 2.5 % et 1.5 % de cette population (Wong, 1980).

Certaines publications rapportent que les amygdales sont des organes principalement composés de lymphocytes B (Bernstein, 1992), alors que d'autres rapportent que la proportion de cellules B varie selon l'âge et qu'en vieillissant, la proportion de lymphocytes B tend à diminuer au profit des lymphocytes T (Siegel, 1978). Les résultats de Korsrud (1980) indique que le nombre de cellules productrices d'immunoglobulines augmente proportionnellement de la naissance jusqu'à l'âge de 20 ans pour finalement diminuer. L'isotype prédominant des immunoglobulines de surface des cellules

sécrétrices d'immunoglobulines est l'IgG. Au niveau des adénoïdes et des palatines, les IgG de surface se retrouvent chez 62 % et 73 % des lymphocytes B, respectivement. Le nombre relatif des cellules sécrétrices d'IgA et d'IgM est similaire (Nadal, 1992).

À cause de leur localisation, les amygdales représentent un site important de colonisation bactérienne. On y retrouve diverses espèces bactériennes et parmi les pathogènes les plus importants notons entre autre *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *M. catarrhalis* (Brook, 1984 et Forsgren, 1993). Les amygdales jouent un rôle important dans la première ligne de défense de l'hôte contre ces microorganismes exogènes.

#### 4.3 Réponse immune de l'hôte envers *M. catarrhalis*

La prépondérance des infections causées par *M. catarrhalis* chez les enfants et les adultes immunosupprimés suggère que l'acquisition d'une réponse immune par les adultes sains est nécessaire à leur protection contre cet organisme. Les enfants seraient plus susceptibles aux infections sérieuses que les jeunes adultes, et ce à cause de l'absence d'une immunité adéquate (Goldblatt, 1990).

La présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre *M. catarrhalis* ont été détectées localement au niveau des sécrétions du système respiratoire supérieur et également au niveau systémique dans le sérum (Faden, 1992). Une étude effectuée par Faden *et al.* (1992) indique que les jeunes enfants atteints d'otites moyennes développent une réponse immune locale adéquate mais échouent dans le développement d'une réponse systémique uniforme. De plus, les enfants atteints d'otites à répétitions possèdent beaucoup moins d'IgA sécrétoires au niveau des muqueuses (Stenfors, 1993). Puisque les infections dues à *M. catarrhalis* débutent au niveau des muqueuses, la réponse immune mucosale est probablement très importante dans la protection contre ce pathogène. Il demeure possible, cependant, que la réponse systémique joue également un rôle important.

Faden *et al.* (1995) ont clairement démontré que l'isotype des anticorps détectés tant au niveau systémique qu'au niveau local, suite à une otite moyenne, est principalement l'IgG. De plus, le ratio IgA/IgM est beaucoup plus élevé localement, puisqu'on détecte près de deux fois moins d'IgA que d'IgM au niveau systémique ( Faden, 1995). La réponse en IgG contre *M. catarrhalis* chez les enfants augmente après l'âge de 1 an mais, bien que l'on retrouve des niveaux assez importants d'IgG1, d'IgG2 et d'IgG3 spécifiques et une très faible quantité d'IgG4 contre ce pathogène, la réponse prédominante contre les OMP est de sous-classe IgG3 et n'apparaît pas avant l'âge de 4 ans (Goldblatt, 1990). Il est possible que ce retard au niveau de l'apparition des anticorps contre les OMP représente un facteur important contribuant à la prédominance d'otites moyennes et de bactériémies à *M. catarrhalis* chez les enfants de moins de 4 ans. Il est intéressant de noter que le niveau d'IgG3 spécifiques contre *M. catarrhalis* est également inférieur chez les adultes souffrant de sinusites chroniques comparativement aux adultes en bonne santé (Goldblatt, 1990).

## **5 - Problématique et objectifs du projet**

Plusieurs facteurs interviennent dans le processus infectieux de *M. catarrhalis* et dans le développement d'une réponse immune protectrice adéquate contre ce pathogène. La prédominance des infections causées par ce pathogène chez les enfants et les adultes immunosupprimés s'explique sans doute par l'importance du statut immunitaire dans la résistance à l'infection. C'est dans l'objectif de développer des outils pour un meilleur contrôle de l'infection que nous avons entrepris d'étudier l'immunité protectrice naturellement acquise chez l'homme suite à la colonisation par *M. catarrhalis*. La génération d'anticorps humains sécrétés par des cellules lymphocytaires isolées de tissus amygdaliens permettra d'identifier et de caractériser des antigènes de *M. catarrhalis* reconnus par l'immunité mucoale. De plus, la caractérisation immunologique et moléculaire permettra d'évaluer le potentiel vaccinoène de ces antigènes.

## CHAPITRE 2

### ANTICORPS HUMAINS ANTI-*MORAXELLA CATARRHALIS* DIRIGÉS CONTRE UN ÉPITOPE CONSERVÉ DE LA PROTÉINE USP A ET EXPOSÉ À LA SURFACE

J'ai choisi de présenter mon mémoire de maîtrise sous le format d'un article scientifique. Aussi, le corps de ce mémoire se compose d'un article intitulé « Human anti-*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* antibodies reactive with conserved, surface-exposed UspA epitopes » qui sera soumis pour publication sous forme de note et non d'un article scientifique traditionnel dans le journal « Infection and Immunity ».

Ce chapitre décrit l'isolement de cellules lymphocytaires à partir de tissus amygdaliens afin d'évaluer leur implication dans la réponse immune contre *M. catarrhalis*. La présence de lymphocytes B sécréteurs d'immunoglobulines réagissant avec *M. catarrhalis* ont été détectés par « enzyme-linked immunospot » (ELISPOT). De plus, la culture de ces cellules lymphocytaires a permis d'identifier deux lignées cellulaires naturellement transformées, 1C2 et 8B5, sécrétant des anticorps spécifiques dirigés contre ce pathogène, suggérant ainsi que la colonisation des individus par *M. catarrhalis* a entraîné le développement d'une réponse immune locale spécifique. La caractérisation de ces anticorps a révélé qu'ils étaient dirigés contre un antigène de nature protéique. L'absence de réactivité avec d'autres espèces bactériennes associée à l'immunoréactivité avec la totalité des souches de *M. catarrhalis* testées suggèrent que la protéine reconnue est hautement conservée et spécifique à cette espèce. Des tests de radioimmunoaccessibilité et de microscopie électronique ont également permis d'évaluer l'exposition des épitopes reconnus par les anticorps générés par les lignées cellulaires 1C2 et 8B5 à la surface de *M. catarrhalis*. Enfin, la construction d'une banque génomique de *M. catarrhalis* dans λZAP II a permis d'isoler un clone possédant le gène, ou une partie du gène, codant pour la protéine reconnue par 1C2 et 8B5. Les résultats d'hybridation de l'ADN du clone recombinant avec la sonde correspondant au gène *uspA2* marqué au <sup>32</sup>P suggèrent que la protéine reconnue par les anticorps 1C2 et 8B5 est

possiblement la UspA2. Le séquençage de l'ADN du clone recombinant est en cours et permettra d'élucider l'identité de la protéine.

**HUMAN ANTI-MORAXELLA (*BRANHAMELLA*) CATARRHALIS ANTIBODIES  
REACTIVE WITH CONSERVED, SURFACE-EXPOSED USPA EPITOPES**

**Running title :** Human antibodies against UspA

**Author's names :** Julie Carbonneau, Martine Harvy, Denis Martin, Clément R. Rioux, Bernard R. Brodeur and Josée Hamel\*

**Institution :** Unité de Recherche en Vaccinologie  
Centre Hospitalier Universitaire de Québec  
Pavillon CHUL, Sainte-Foy.  
(Québec), Canada, G1V 4G2

**\*Corresponding author :**

Unité de Recherche en Vaccinologie  
Centre Hospitalier Universitaire de Québec  
Pavillon CHUL, Edifice T-3-67  
2705, boulevard Laurier, Sainte-Foy  
(Québec), Canada, G1V 4G2  
Phone: (418) 656-4141 extension 6207  
FAX: (418) 654-2280

**ABSTRACT**

Anti-*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* antibody producing cell lines were obtained from human palatine tonsils. The cells were shown to secrete human IgG3 reactive with a proteinaceous antigen of *M. catarrhalis* with decrease or loss of ELISA reactivity when antigen was treated with proteolytic enzyme. Human antibody secreted by cell lines 1C2 and 8B5 was shown to be specific to *M. catarrhalis*. In western blot immunoassay, the antibody reacted with all *M. catarrhalis* isolates tested. No reaction was observed against *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Escherichia* species or other species of *Moraxella* tested. Binding assays to intact bacterial cells by immunoelectron microscopy and by radioimmunoaccessibility assay demonstrated that the antibody-reactive antigen is exposed at the surface of *M. catarrhalis*. The immunoscreening of a  $\lambda$ ZAP II genomic DNA library from *M. catarrhalis* allowed the identification of one recombinant clone that hybridized with *uspA2* gene probe. These experiments suggested that UspA is a target for antibody immune response in colonized individuals.

## INTRODUCTION

*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* is an important human pathogen, causing otitis media and sinusitis in children and lower respiratory tract infections in adults with underlying lung disease (10). This gram-negative diplococcus is the third most common cause of bacterial otitis media after *Streptococcus pneumoniae* and nontypable *Haemophilus influenzae* (9). Occasionally *M. catarrhalis* is also responsible of invasive infections including meningitis (30), endocarditis (14) and bacteremia (6, 12, 21, 31) in children and immunocompromised hosts. The emergence of antimicrobial resistance with 90 % of clinical isolates of *M. catarrhalis* producing  $\beta$ -lactamase threatens the success of antimicrobial therapy (15). Thus emphasizing the interest in vaccine development.

Some bacterial surface molecules represent important virulence factors. Among those, there are the outer membrane proteins (OMPs), the lipooligosaccharides (LOS) and the pili or fimbriae. Eight major OMPs ranging in molecular weight from 98.000 to 21.000 daltons were characterized by Bartos and Murphy (7), and were designated OMP A, B1, B2, CD, E, F, G, and H (29). In addition, previous studies described a very high molecular weight protein of *M. catarrhalis* named UspA (ubiquitous surface protein A) or HMWP (20, 22). The molecular weight of this protein varies among isolates and the UspA protein usually migrates as multiple bands on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a dominant band of greater than 300 kDa and a minor band at 120 to 140 kDa (11).

UspA was shown to be present on almost all clinical isolates of *M. catarrhalis* tested to date (1, 11, 20, 22). Convalescent-phase sera but not acute-phase sera from patients with *M. catarrhalis* pneumonia contained antibodies to UspA (20). Moreover, an epitope of UspA on the surface of all strains tested react with the protective murine monoclonal antibody (MAb) 17C7 (20). Helminen *et al.* revealed that 17C7 promote pulmonary clearance of bacteria in passively immunized mice (20). Chen *et al.* (11) showed that mice immunized with purified UspA produced complement dependent bactericidal

antibodies directed toward homologous and heterologous isolates. These mice exhibited an enhanced ability to clear *M. catarrhalis* from the lower respiratory tract. Altogether these studies indicated that UspA is expressed in the course of infection in human and elicits a potentially protective antibody response in the infected host. The immunological screening combined to DNA screening of *M. catarrhalis* genomic library allowed the identification of two genes, *uspA1* and *uspA2*, encoding MAb 17C7-reactive proteins with calculated molecular weight of 88,271 and 62,483 daltons, respectively (1).

Our study describes the establishment and characterization of human cell lines secreting anti- *M. catarrhalis* antibodies. The evaluation of the specificity, surface exposure and antigenic conservation of the epitopes reactive with the human antibodies secreted by two cells lines, 1C2 and 8B5, is presented.

**Establishment of human cell lines 1C2 and 8B5 secreting antibodies reactive with *M. catarrhalis*.** Immunoglobulin-secreting cells (ISC) bearing receptors specific to *M. catarrhalis* were detected in mononuclear cell (MNC) suspensions from palatine tonsils using a modified enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) (13). Briefly, a nitrocellulose membrane was washed in phosphate-buffered saline (PBS) and placed in a blotting manifold apparatus. The membrane was coated by the addition of 200  $\mu$ l of antigenic preparation containing,  $1-5 \times 10^8$  heat-killed bacteria/ml or 5  $\mu$ g/ml of OMP extracted as described by Faden *et al.* (16). After an incubation period of 60 min at room temperature, the coating antigen was aspirated and the membrane was washed three times with PBS. The nitrocellulose paper was soaked in PBS solution containing bovine serum albumin (BSA) 1% w/v for 10 min to block non-specific protein binding sites in wells. A volume of 100  $\mu$ l of viable MNC isolated from human palatine tonsils by density centrifugation in Histo-Paque gradient (Sigma chemical Co., St-Louis, MO, USA) at a concentration varying from  $10^4$  to  $10^7$  cells/ml in PBS were added to the nitrocellulose membrane and incubated for 3 h at 37°C. in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cell suspensions was then decanted from wells by gentle aspiration. The membrane was removed from the manifold and was washed three times with PBS. The nitrocellulose paper was soaked in PBS containing BSA 1% w/v for 10 min to block non-specific protein binding sites around the wells. The membrane was incubated for 2 h at room temperature with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human immunoglobulins (Ig) (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., West Grove, PA, USA) diluted 1 in 3000 in PBS containing BSA 1% w/v, washed three times and then soaked in alkaline phosphatase substrate (NBT/BCIP) until spots were detected microscopically at 30 $\times$  magnification. The number of *M. catarrhalis*-specific ISC was determined by subtracting the number of spots from non-coated wells to the number of spots from *M. catarrhalis*-coated wells.

Results from Table 1 revealed that all palatine tonsils tested have *M. catarrhalis*-specific ISC thus indicating that palatine tonsils isolated from naturally colonized individuals might serve a source of human lymphocytes for the development of human monoclonal antibodies directed against *M. catarrhalis* antigens. Tonsil MNC were fused with the

heteromyeloma HT3 as described by Martin *et al.* (26) for the production of anti-*M. catarrhalis* monoclonal antibodies secreting by hybridomas.

The supernatants of wells containing growing cell lines were tested by ELISA for antibody production directed against *M. catarrhalis* OMP and intact bacterium, as previously described (18). Two cell lines, 1C2 and 8B5, were selected based on their strong ELISA reactivity and the stability of antibody after several passages in culture flasks. Visual examination under microscope established that surviving cells were of the size of lymphocytes, not of hybridomas, and formed clusters thus suggesting that 1C2 and 8B5 cell lines were generated from *in vivo* naturally transformed lymphocytes B. 1C2 and 8B5 cell lines were maintained in continuous culture for periods of more than 6 months without loss of antibodies secretion. Antibodies secreted by 1C2 and 8B5 cell lines were both IgG3 subclass as determined by method described by Hamel *et al.* (18).

**Characterization of the immunoreactivity of 1C2 and 8B5-specific antibody.** To determine the nature of the antigen of *M. catarrhalis* recognized by the antibodies produced by 1C2 and 8B5 cell lines, ELISA plates precoated with *M. catarrhalis* bacteria were incubated with the proteolytic enzymes proteinase K (Sigma chemical Co., St-Louis, MO, USA) (15 U/mL) and trypsin (Sigma) (1 800 U/mL), washed and incubated with cell culture supernates, as previously described (18). Untreated wells served as positive controls. The enzymatic treatments altered the protein structures such that the antibody reactivity in the ELISA assay could not be detected (data not shown). These results revealed that antibodies secreted by 1C2 and 8B5 cell lines were directed against protein antigens.

Western immunoblotting performed as previously described (18) with antibody-produced by 1C2 and 8B5 cell lines revealed that one or more bands were visible. The apparent molecular masses of the reactive bands varied from approximately 70 to 100 kDa and less distinct bands always appeared at the bottom of the immunoblots (Fig. 1). The reactivity in Western blot of 1C2 and 8B5 with multiple bands is very similar to the reactivity of murine MAb 17C7 specific to the UspA protein described by Helminen *et al.* 1994 (20).

The comparison of Western immunoblotting reactivity of OMP preparations obtained from 8 strains of *M. catarrhalis* revealed that MAb 17C7 and 1C2 have identical profiles of reactivity thus suggesting that both antibody preparations were directed against the same antigen, the UspA (Fig. 2).

The reactivity of antibodies secreted by cell lines 1C2 and 8B5 against a panel of clinical isolates of *M. catarrhalis* (listed in the Table 2) was determined by ELISA and Western immunoblotting. As shown in Table 3, both antibody preparations recognized conserved epitopes which are present in the OMP preparation. The specificity of the antibodies secreted by 1C2 is distinct from the specificity of 8B5 antibody in that OMP from strain ETSU 645 was only reactive with 1C2. However, the reactivity of 1C2 and 8B5 was identical in Western immunoblotting (not shown). When tested by Western immunoblotting, the antibodies secreted by 1C2 and 8B5 did not react with any of the other gram-negative bacterial strains listed in Table 4. Therefore, the protein epitopes reactive with the antibodies are likely specific to *M. catarrhalis*.

**Surface exposure of 1C2 and 8B5-reactive epitopes.** Attachment of antibodies secreted by cell lines 1C2 and 8B5 at the surface of live bacteria was performed by antibody accessibility radioimmunoassay (25, 27) in order to determine if these antibodies were directed against surface exposed epitopes. The results presented in Figure 3 demonstrate that the antibodies secreted by cell lines 1C2 and 8B5 reacted with epitopes accessible on the cell surface. In contrast, IgG3 isotype-matched human hybridoma antibodies, HiH1 and HiH10, directed against *Haemophilus influenzae* type b (18) did not bind to the bacteria.

To confirm and visualize the cell surface-exposure of the 1C2 and 8B5-reactive epitopes, electron microscopy using colloidal gold-affinity was performed. Overnight culture of *M. catarrhalis* from one chocolate agar plate was suspended in 5 ml PBS. A 200  $\mu$ l sample of the bacterial suspension was centrifuged at 14,000 rpm, the pellet was suspended in 500  $\mu$ l of supernate of cell line and incubated for 1 h at room temperature with constant gentle agitation. The suspension was washed twice by centrifugation and

resuspended in PBS. After another centrifugation in the same conditions, the bacterial cells were incubated 1 h at room temperature with 500  $\mu$ l of colloidal Gold-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., West Grove, PA, USA) diluted 1 in 20 in cell culture medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL, Gaithersburg, NJ, USA) containing 20 % v/v bovine calf serum (BCS; Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah, USA). After two washes in PBS, the bacterial cells were fixed overnight at 4°C with 1 ml of 2 % glutaraldehyde v/v (CANEMCO, inc., Lachine, QC, Canada) in PBS. The cell suspension was centrifuged, pre-coated in PBS containing 20 % BSA w/v, polymerized in 25 % glutaraldehyde (CANEMCO, inc.) and post fixed in 1 % osmium tetroxide v/v (CANEMCO, inc.). The bacteria were dehydrated with graded alcohols, and embedded in Epon (CANEMCO, inc.) resins. Thin sections were stained with uranyl acetate (CANEMCO, inc.) and lead citrate (CANEMCO, inc.). The bacteria and their association with the colloidal gold particles were examined using a JEOL 1010 electron microscope (JEOL Canada, inc., St-Hubert, QC, Canada).

Results from Figure 4 confirmed that the protein recognized by antibodies secreted by cell lines 1C2 and 8B5 is present at surface of the bacteria cell. Moreover, the binding site of colloidal gold was far enough from the outer membrane to suggest that the protein antigen constituted the pili. Several studies have shown using electron microscopy that most strains of *M. catarrhalis* have pili (2, 3, 4, 5, 24, 28). Although the potential role of pili in adherence of this pathogen to human cells is poorly understood, Rikitomi *et al.* and Ahmed *et al.* demonstrated that there is no correlation between the presence of pili, adherence to human oropharyngeal epithelial cells, and hemagglutination (5, 28). Interestingly, UspA2 was found to have some similarity with YadA adhesin-invasin expressed by pathogenic *Yersinia* species (1).

**Cloning of the gene encoding 1C2-reactive protein.** Genomic DNA from *M. catarrhalis* clinical isolate ETSU 658 was isolated and purified as described by Mamur (23). A  $\lambda$ ZAP II genomic DNA library was constructed according to the manufacturer's recommendations (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The recombinant phages were used

to infect *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' which was then plated onto LB agar (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). The plaques were screened with supernate of cell line 1C2 and the reactive clones were plaque purified twice. The pBluescript SK(-) phagemid within  $\lambda$ ZAP II vector of one of these clones was excised by the ExAssist/SOLR system according to the manufacturer's recommendations (Stratagene), purified by Mini-preps protocol (8) and transformed into *E. coli* XL1 Blue MRF' according to Siamnis method (19).

The *uspA1* (2.496 Kb) and *uspA2* (1.731 Kb) gene sequences of *M. catarrhalis* ETSU 658 were amplified by PCR, purified and <sup>32</sup>P-labeled. A dot blot hybridization was then performed on our recombinant clone DNA, *uspA1* and *uspA2* gene DNA using <sup>32</sup>P-labeled *uspA1* and *uspA2* probes labeled according to the QIAquick nucleotide removal kit protocol (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA). The results from the hybridization experiments suggested that the recombinant clone recognized by antibodies secreted by cell line 1C2 contained the *uspA2* gene sequence or portion of the *uspA2* with adjacent sequences since the size of the insert in our recombinant clone was estimated at 4.5 Kb.

The *uspA2* ORF encodes a protein of 576 amino acids with a calculated molecular weight of 62,483. *UspA2* gene is similar to *uspA1* gene thus explaining the cross-hybridization between *UspA1* and *UspA2*. The deduced amino acid sequences of these proteins are 43% identical. However, amino acids 271 to 411 in *UspA2* are 93% identical to the region corresponding to amino acids 498 to 638 in *UspA1* (1).

The fact that our recombinant clone hybridized with *uspA2* gene suggest that antibodies secreted by cell lines 1C2 and 8B5 might be directed against *UspA2*. Analysis of the amino acid sequence of the *UspA2* protein revealed that it could contain a leader peptide with a hydrophobic region of approximately 20 amino acids at the N terminus that was preceded by one or two basic amino acids (1). This observation correlates with the results obtained from experiments showing surface exposure of 1C2 and 8B5 epitopes.

In the past, the UspA has been shown to be expressed *in vivo* by Western blot reactivity of human convalescent-phase sera antibodies with recombinant UspA protein (20). Here, we demonstrated that *M. catarrhalis*-specific lymphocytes B are present in palatine tonsils, the primarily site of colonization of *M. catarrhalis*.

Goldblatt *et al.* demonstrated that the predominant antibody response to *M. catarrhalis* is of the IgG3 subclass and does not appear until after age of 4 years, the appearance of these antibodies in children was shown to correlate well with a increase in resistance to *M. catarrhalis* diseases (17). The protein recognized by antibodies IgG3 subclass secreted by cell lines 1C2 and 8B5, likely the UspA2, is then suspected to be implicated in a protective response against *M. catarrhalis*.

In summary, the protein reactive with 1C2 and 8B5 cell lines is conserved among clinical isolates, surface-exposed, and elicits an humoral immune response in human. The biological activity of 1C2 and 8B5 antibody will be tested *in vitro* in a bactericidal assay and *in vivo* in an experimental model of infection. To further evaluate the protective potential of this protein, recombinant protein will be produced, purified and injected to animals in order to verify if vaccination can confer protection against *M. catarrhalis* experimental infections.

## ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank Pierrette Gourde and Denis Beauchamp from Research Centre in Infectiology, for their assistance in electron microscopy. We also thank Jacques Leclerc for providing tonsil tissues and Elaine Walker for providing *M. catarrhalis* isolates.

TABLE 1. Enumeration by ELISPOT assay of *M. catarrhalis*-specific ISCs in human palatine tonsils.

Palatine tonsils	ISCs/10 <sup>6</sup> MNC							
	IgA-G-M <sup>a</sup>		IgA		IgG		IgM	
	OMPs	WC <sup>b</sup>	OMPs	WC	OMPs	WC	OMPs	WC
URV 137	2100	750	127	175	467	450	10	80
URV 138	135	180	nd <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
URV 139	125	835	40	35	490	540	125	85
URV 147	450	450	20	20	500	1300	40	75

<sup>a</sup> Suspensions of viable MNC were incubated in duplicate wells and the plates were developed with anti-human immunoglobulin (Ig) or isotype-specific anti-human Ig conjugates.

<sup>b</sup> Whole *M. catarrhalis* cells.

<sup>c</sup> Not done.

TABLE 2. List of *M. catarrhalis* clinical isolates used in this study.

Isolate <sup>a</sup>	Geographical site of isolation <sup>b</sup>	source
ETSU 65	MH	Sputum
ETSU 100	MH	Eye
ETSU 175	MH	Maxillary wash
ETSU 195	MH	Bronchial wash
ETSU 271	MH	Eye
ETSU 282	MH	Eye
ETSU 287	MH	Sputum
ETSU 434	MH	Sinus
ETSU 466	MH	Eye
ETSU 536	MH	Eye
ETSU 541	MH	Nose
ETSU 640	MH	Sputum
ETSU 645	Univ. Nebraska	Blood
ETSU 646	unknown	Blood
ETSU 647	unknown	Blood
ETSU 658	MH	Left lung
ETSU 659	MH	Right lung
ETSU 686	MH	Sputum
ETSU 716	MH	Sputum
ETSU 894	JCMCH	Blood
ETSU 902	MH	Throat
ETSU 931	MH	Throat
ETSU T-4	MH	Sputum
ETSU T-25	MH	Sputum
ETSU C-1	MH	Sputum
ETSU C-2	MH	Sputum
ETSU C-9	MH	Sputum
ETSU C-11	MH	Sputum
ETSU C-16	MH	Sputum
ETSU C-30	MH	Sputum
ETSU P-1	MH	TTA <sup>c</sup>
ETSU P-3	MH	Sputum
ETSU P-24	MH	TTA
ETSU P-37	MH	TTA
ATCC 25240	unknown	unknown

<sup>a</sup> P isolates are from patients with confirmed pneumonia. P-3 is from a patient with bacteremic pneumonia. T isolates are from patients with tracheobronchitis, and C isolates are from patients with no symptom.

<sup>b</sup> MH is the Mountain Home Veterans Affairs Medical Centre located in Johnson City, TN. JCMCH is the Johnson City Medical Centre Hospital in Johnson City, TN.

<sup>c</sup> Transtracheal aspirate.

TABLE 3. Immunoreactivity of 1C2 and 8B5-antibody against a panel of *M. catarrhalis* isolates.

Antibody	Immunoreactivity of antibody tested by		
	ELISA	Western immunoblotting	
	Whole cells <sup>a</sup>	Whole cell extracts	OMP <sup>b</sup>
1C2	7/7	35/35	8/8
8B5	6/7	35/35	nd <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Isolates tested are ETSU 645, ETSU 658, ETSU 902, ETSU T-25, ETSU C-2, ETSU P-1 and ETSU P-3. ETSU 645 was negative when tested with 8B5 antibody.

<sup>b</sup> OMP were prepared from the seven isolates listed in footnote a and strain ATCC 25240.

<sup>c</sup> Not done.

TABLE 4. List of non-*M. catarrhalis* bacterial strains used in this study.

Bacterial species	Strain designation
<i>Moraxella atlantae</i>	ATCC 29525
<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	ATCC 19975
<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC 19976
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Escherichia coli</i>	C36
<i>Haemophilus influenzae</i> b	3068
<i>Neisseria meningitidis</i>	608B
<i>Neisseria meningitidis</i>	40B
<i>Neisseria meningitidis</i>	W135
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	B2
<i>Neisseria lactamica</i>	ATCC 23910
<i>Neisseria subflava</i>	10555
<i>Neisseria weauci</i>	51223
<i>Neisseria mucosa</i>	81170

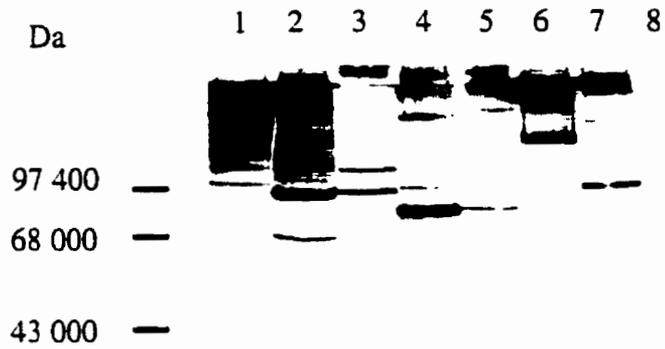


FIG. 1. Western immunoblot of *M. catarrhalis* with antibodies secreted by cell line 1C2. Whole cell lysates were obtained from *M. catarrhalis* strains ETSU P-1 (lane 1); ETSU P-3 (lane 2); ETSU C-2 (lane 3); ETSU T-25 (lane 4); ETSU 645 (lane 5); ETSU 658 (lane 6); ETSU 902 (lane 7) and ATCC 25240 (lane 8).

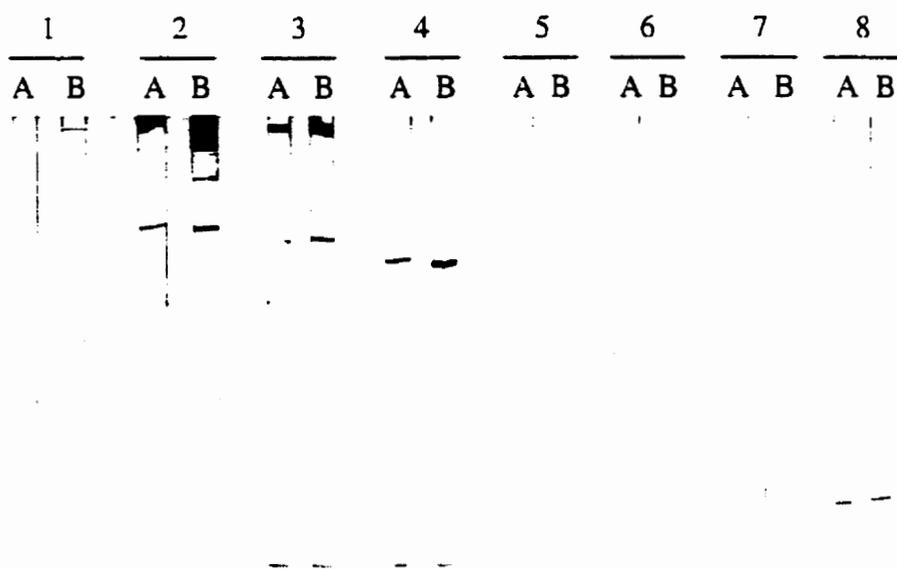


FIG. 2. Comparison, by Western immunoblotting, of reactivity the of murine monoclonal antibody 17C7 (lanes A) and human antibodies secreted by cell line 1C2 (lanes B) against OMP of *M. catarrhalis* ETSU P-1 (1); ETSU P-3 (2); ETSU C-2 (3); ETSU T-25 (4); ETSU 645 (5); ETSU 658 (6); ETSU 902 (7); and ATCC 25240 (8).

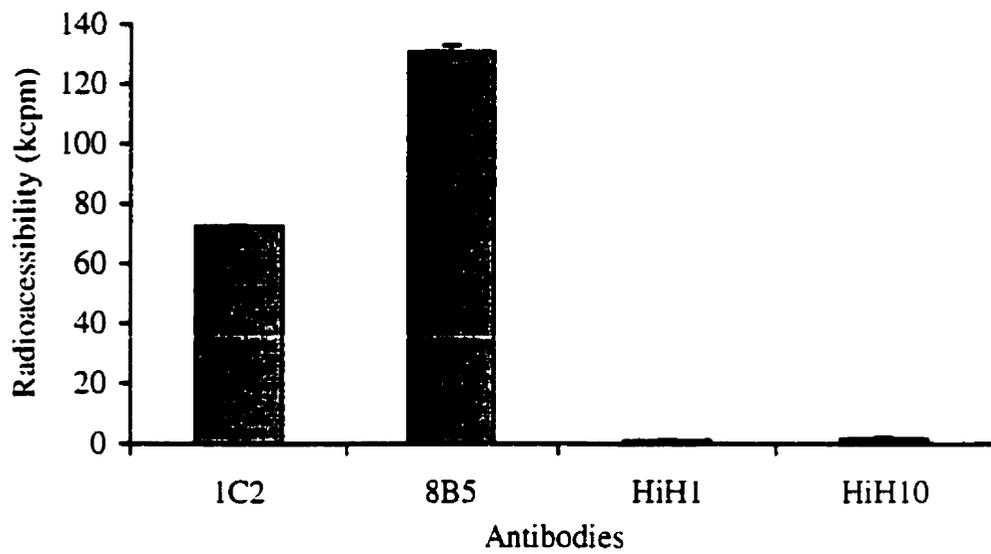


FIG. 3. Surface accessibility of human antibody secreted by cell lines 1C2 and 8B5 to *M. catarrhalis* strain ETSU 658 tested by radioimmunoaccessibility. Live bacteria were incubated with supernates from cell line cultures, washed and then incubated with  $I^{125}$  labeled anti-immunoglobulin. Results are expressed as the mean cpm values and standard deviations of triplicates. Background value of 3388 cpm obtained with media alone was subtracted from test values.

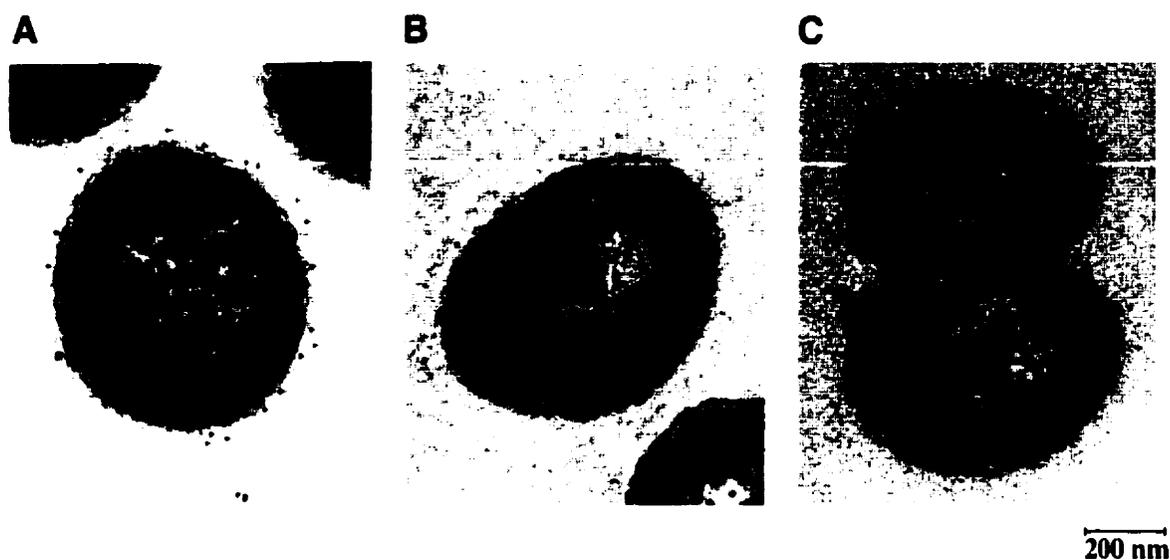


FIG. 4. Electron micrograph showing the attachment of 1C2 and 8B5 antibody at the surface of *M. catarrhalis*. *M. catarrhalis* strain ETSU 658 was probed with 1C2 (A), 8B5 (B), and control HiH1 (C) antibody. Bacteria were positively stained with uranyl acetate and lead citrate and observed at a magnification of 40 000 $\times$ .

## REFERENCES

1. **Aebi, C., I. Maciver, J. L. Latimer, L. D. Cope, M. K. Stevens, S. E. Thomas, G. H. McCracken, JR., and E. J. Hansen.** 1997. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* **65**:4367-4377.
2. **Ahmed, K.** 1992. Fimbriae of *Branhamella catarrhalis* as possible mediators of adherence to pharyngeal epithelial cells. *APMIS* **100**:1066-1072.
3. **Ahmed, K., H. Masaki, T. C. Dai, A. Ichinose, Y. Utsunomiya, M. Tao, T. Nagatake, and K. Matsumoto.** 1994. Expression of fimbriae and host response in *Branhamella catarrhalis* respiratory infections. *Microbiol. Immunol.* **38**:767-771.
4. **Ahmed, K., N. Rikitomi, K. Matsumoto.** 1992. Fimbration, hemagglutination and adherence properties of fresh clinical isolates of *Branhamella catarrhalis*. *Microbiol. Immunol.* **36**:1009-1017.
5. **Ahmed, K., N. Rikitomi, T. Nagatake, and K. Matsumoto.** 1990. Electron microscopic observation of *Branhamella catarrhalis*. *Microbiol. Immunol.* **34**:967-975.
6. **Alaeus, A., and G. Stiernstedt.** 1991. *Branhamella catarrhalis* septicaemia in an immunocompetent adult. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**:115-116.
7. **Bartos, L. C., and T. F. Murphy.** 1988. Comparison of the outer membrane proteins of 50 strains of *Branhamella catarrhalis*. *J. Infect. Dis.* **158**:761-765.
8. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acid research.* **7**:1513-1523.

9. **Bluestone, C. D.** 1986. Otitis media and sinusitis in children : role of *Branhamella catarrhalis*. *Drugs* **31**:S132-S141.
10. **Catlin, B. W.** 1990. *Branhamella catarrhalis* : an organism gaining respect as a pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:293-320.
11. **Chen, D., J. C. McMichael, K. R. VanDerMeid, D. Hahn, T. Mininni, J. Cowell, and J. Eldridge.** 1996. Evaluation of purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a vaccine in a murine model after active immunization. *Infect. Immun.* **64**:1900-1905.
12. **Cimolai, N., and R. J. Adderley.** 1989. *Branhamella catarrhalis* bacteremia in children. *Acta Paediatr. Scand.* **78**:465-468.
13. **Czerkinsky, C.** 1994. Measurement of immunoglobulin synthesis using the ELISPOT assay. *In* : Current protocols in immunology. Units 7.14.1-7.14.9. John Wiley and Sons. Inc.
14. **Douer, D., Y. Danziger, and J. Pinkhas.** 1977. *Neisseria catarrhalis* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **86**:116.
15. **Enright, M. C., and H. McKenzie.** 1997. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* – clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. *J. Med. Microbiol.* **46**:360-370.
16. **Faden, H., J. Hong, and T. Murphy.** 1992. Immune response to outer membrane antigens of *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media. *Infect. Immun.* **60**:3824-3829.
17. **Goldblatt, D., M. W. Turner, and R. J. Levinsky.** 1990. *Branhamella catarrhalis*: antigenic determinants and the development of the IgG subclass response in childhood. *J. Infect. Dis.* **162**:1128-1135.

18. **Hamel, J., B. R. Brodeur, Y. Larose, P. S. Tsang, A. Belmaaza, and S. Montplaisir.** 1987. A monoclonal antibody directed against a serotype-specific outer-membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Med. Microbiol.* **23**:163-170.
19. **Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. p.109-135. *In* : D. M. Glover (ed), DNA cloning a practical approach. IRL Press, London.
20. **Helminen, M. E., I. Maciver, J. L. Latimer, J. Klesney-Tait, L. D. Cope, M. Paris, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1994. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J. Infect. Dis.* **170**:867-872.
21. **Ioannidis, J. P. A., M. Worthington, J. K. Griffiths, and D. R. Snyderman.** 1995. Spectrum and significance of bacteremia due to *Moraxella catarrhalis*. *Clin. Infect. Dis.* **21**:390-397.
22. **Klingman, K. L., and T. F. Murphy.** 1994. Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Infect. Immun.* **62**:1150-1155.
23. **Mamur, J.** 1961. A procedure for the isolation for ribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-216.
24. **Marrs, C. F., and S. Weir.** 1990. Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am. J. Med.* **88**(Suppl. 5A):36S-45S.
25. **Martin, D., Y. Larose, J. Hamel, J. Lagacé, and B. R. Brodeur.** 1988. Heterohybridomas secreting human monoclonal antibodies against *Haemophilus influenzae* type b. *Eur. J. Immun.* **18**:601-606.

26. **Martin, D., B. R. Brodeur, Y. Larose, S. Faucher, and J. Hamel.** 1988. Production of human monoclonal antibodies against *Haemophilus influenzae* type B using a heteromyeloma. p. 285-293. In C. A. K. Borrebaeck (ed.). In vitro immunization in hybridoma technology. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
27. **Proulx, C., P. S. Munson, Jr., S. Grass, J. Hamel, D. Martin, and B. R. Brodeur.** 1991. Identification of a surface-exposed immuno-dominant epitope on outer membrane protein P1 of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **59**:963-970.
28. **Rikitomi, N., B. Andersson, K. Matsumoto, R. Lindstedt, and C. Svanborg.** 1991. Mechanism of adherence of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**:559-567.
29. **Sethi, S., S. K. Hill, and T. F. Murphy.** 1995. Serum antibodies to outer membrane proteins (OMPs) of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in patients with bronchiectasis : identification of OMP B1 as an important antigen. *Infect. Immun.* **63**:1516-1520.
30. **Srinivasan, G., M. J. Raff, W. C. Templeton, S. J. Givens, R. C. Graves, and J. C. Melo.** 1981. *Branhamella catarrhalis* pneumonia. Report of two cases and review of the literature. *Am. Rev. Respir. Dis.* **123**:553-555.
31. **Wallace, M. R., and E. C. Oldfield III.** 1990. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* **150**:1332-1334.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Ce chapitre comprend des résultats découlant de mes travaux de recherche qui n'ont pas été retenus pour la rédaction de l'article.

#### **1 - Réponse immune humorale spécifique à *M. catarrhalis* chez l'homme**

Afin de développer une méthode susceptible de contrôler les infections causées par *M. catarrhalis*, il est important de mieux comprendre la réponse immune acquise chez l'homme. Pour ce faire, nous avons étudié la réponse immune développée localement au niveau du nasopharynx puisqu'il s'agit du site d'entrée et de colonisation primaire de ce pathogène. L'organe lymphoïde le plus important dans cette région est l'amygdale. Nous avons donc préparé des anticorps polyclonaux humains à partir de culture de cellules de palatines.

Des extraits cellulaires complets du microorganisme, obtenus à partir de différents isolats cliniques, ont été soumis à une analyse de leur réactivité par immunobuvardage avec des préparations d'anticorps polyclonaux, suite à la séparation des protéines sur gel de SDS-PAGE (Figure 4). Une forte réactivité contre *M. catarrhalis* a été observée avec toutes les préparations d'anticorps polyclonaux testées. Ces résultats s'expliquent par le fait que les individus ont été colonisés par le pathogène à un moment ou à un autre de leur vie avant l'ablation des amygdales.

On constate que la réponse immune contre *M. catarrhalis* varie considérablement d'un individu à l'autre (Figure 4). De plus, le signal détecté en immunobuvardage varie selon les préparations d'anticorps testées. Par exemple, URV 64B (bandelette 1), réagit plus faiblement que les autres. On remarque que certains antigènes sont très immunogènes et sont détectés par toutes les préparations d'anticorps. On constate également qu'il existe

de la variabilité antigénique entre les isolats cliniques, bien que leurs profils de migration sur gel SDS-PAGE soient très similaires.

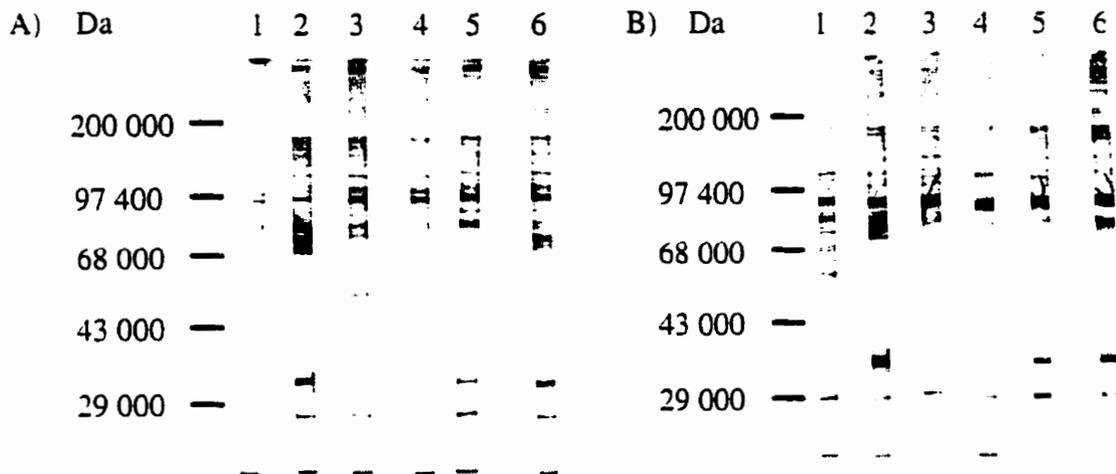


FIGURE 4 : Détection par immunobuvardage de six préparations d'anticorps polyclonaux humains issus de palatines avec des extraits cellulaires complets obtenus à partir de l'isolat clinique ETSU C-2 (A) ou de l'isolat clinique ETSU T-25 (B) qui ont été séparés sur SDS-PAGE puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Les préparations d'anticorps URV 64B (1), URV 66B(2), URV 68B(3) URV 74B(4), URV 77B(5) et URV 79B(6) ont été utilisées.

## 2 - Production d'anticorps anti-*M. catarrhalis*

Afin d'identifier une protéine potentiellement protectrice pouvant servir pour un futur vaccin, il devient nécessaire d'analyser plus en détails la réponse immunitaire locale naturellement acquise. La stratégie choisie pour arriver à cette fin est la réalisation d'une fusion afin d'obtenir les anticorps sous forme monoclonale. Les résultats précédents nous ont confirmés que toutes les palatines, sinon la très grande majorité d'entre elles, possèdent des cellules sécrétrices d'anticorps anti-*M. catarrhalis*. Nous avons donc été en mesure d'isoler les lymphocytes d'une palatine à l'aide d'un gradient Histo-Paque puis de procéder à la fusion avec les cellules myéломateuses HT3.

Suite à quelques jours d'incubation des cellules, après la fusion, nous avons remarqué que deux populations cellulaires étaient présentes dans les plateaux de culture. Une première population consistait en des hybridomes et une deuxième, en des cellules de la taille de lymphocytes dont le temps de division semblait assez lent, et qui avaient une forte tendance à former des grappes pouvant parfois atteindre un diamètre de 1 à 2 mm. Ces observations suggèrent que les clones obtenus ne consistent pas seulement en des hybridomes mais également en des transformants naturels. Il est possible que le patient dont les palatines ont été obtenues était atteint d'une infection virale non identifiée. Certains virus, comme le virus Epstein-Barr (EBV), ont la propriété de s'intégrer au génome cellulaire et ainsi entraîner la multiplication de ces cellules à plus long terme, d'où le nom de transformants. En laboratoire, la transformation cellulaire à l'aide d'EBV est d'ailleurs une méthode couramment employée pour immortaliser les lymphocytes B humains (Cole, 1984, Kozbor, 1983 et Martin, 1988).

La culture à plus long terme des hybridomes a résulté en la perte de sécrétion des anticorps alors que les certaines lignées de lymphocytes B naturellement transformés ont sécrétés des anticorps pendant plusieurs mois. Nous avons décidé de poursuivre la culture de ces transformants naturels puisque le but premier était l'obtention de surnageants cellulaires dans lesquels des anticorps anti-*M. catarrhalis* sont retrouvés en quantité suffisante pour permettre l'analyse de leur spécificité.

Après 11 et 18 jours de croissance, les surnageants recueillis lors du changement de milieu ont été utilisés pour sélectionner les puits contenant des lignées cellulaires sécrétrices d'anticorps anti-*M. catarrhalis*. Le premier criblage par la technique ELISA s'est effectué contre les protéines de la membrane externe d'ETSU C-2, alors que le deuxième fut un criblage triple en ELISA, contre des extraits cellulaires complets de trois isolats cliniques en parallèle, soit ETSU C-2, ETSU 645 et ETSU 658. Le tableau III résume la réactivité des anticorps anti-*M. catarrhalis* sécrétés par certaines lignées cellulaires.

On remarque que trois lignées cellulaires sécrètent des anticorps reconnaissant un antigène conservé chez toutes les préparations d'isolats utilisés : 1C2, 6H5 et 9C3. Le transformant 1C2 se démarque par sa haute densité optique contre les extraits cellulaires complets des trois souches de même que contre les OMP d'ETSU C-2.

TABLEAU III : Réactivité, en ELISA, des anticorps sécrétés par les lignées de lymphocytes (hybridomes et lymphocytes B naturellement transformés in vivo) avec des préparations de protéines de la membrane externe (OMPs) de *M. catarrhalis* ETSU C-2 et des préparations d'extraits cellulaires complets (ECC) de ETSU C-2, ETSU 645 et ETSU 658.

Lignées cellulaires	Réactivité contre les préparations antigéniques <sup>a</sup>			
	OMPs C-2	ECC C-2	ECC 645	ECC 658
1C2	++++	++++	+++	++++
1F5	-	+	-	-
1C7	-	-	-	++++
1D7	-	-	-	+
1C11	+	+	-	-
2B5	-	+	-	++++
2B9	-	+	+	-
2C12	+	-	-	-
4B1	-	-	-	+
4H7	-	+	-	-
6D1	-	-	-	++
6H5	-	+	+	+
7E4	-	-	-	+
7H4	+	+	-	-
7F9	-	+	-	-
8E1	+	+	-	-
8A3	-	++	-	-
8D3	+	+	-	+
8B5	+	++++	-	++++
8A8	-	-	-	+
9C3	++++	++	+	+
9G3	+	-	-	-
9B7	-	+	-	-
9D9	-	-	-	+

<sup>a</sup>Les résultats d'ELISA obtenus correspondent à une densité optique (DO) se situant entre 0 et < 0,200 (-); 0,200 et 0,400 (+); 0,400 et 0,600 (++); 0,600 et 0,800 (+++); ou > 0,800 (++++).

### **3 - Caractérisation des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires anti-*M. catarrhalis***

#### **3.1 Identification de la nature de l'antigène**

Afin de déterminer si l'antigène reconnu par les différentes lignées cellulaires issues de la fusion est de nature protéique, les cellules des isolats cliniques ETSU C-2 et ETSU 658 furent mises en présence de deux enzymes protéolytiques dont les sites de clivages diffèrent. Une portion des puits où les cellules sont adhérents à la plaque ELISA sont traités avec 15 U/ml de protéinase K ou 1,800 U/ml de trypsine avant de procéder au blocage des sites libres et de poursuivre l'ELISA conventionnel.

Suite à l'analyse des résultats obtenus (Tableau IV), on remarque que la plupart des anticorps ne réagissent plus avec ETSU 658 traité à la protéinase K suggérant ainsi qu'ils sont dirigés contre un antigène de nature protéique. On observe, de plus, que pour les anticorps 9C3 et 9D9 l'action protéolytique de cette enzyme tend à favoriser leur liaison en rendant probablement le site de liaison plus accessible à l'anticorps et ainsi permet une meilleure réaction. Il est probable que ces anticorps, 9C3 et 9D9, reconnaissent des épitopes de nature saccharidique présents sur les LOS.

#### **3.2 Étude de la spécificité antigénique des anticorps**

Pour étudier la spécificité antigénique des anticorps produits par les transformants naturels, nous avons procédé par immunobuvardage. La figure 5 démontre la réactivité de 7 lignées cellulaires comparativement à une préparation d'anticorps polyclonaux humains issus d'une palatine, contre des extraits cellulaires complets de deux isolats cliniques, ETSU C-2 et ETSU 658.

On remarque tout d'abord que tous les anticorps, à l'exception de 9D9, reconnaissent le même antigène pour la souche ETSU 658. On soupçonne que 9D9 reconnaît un épitope conformationnel puisqu'il réagit en ELISA, bien que faiblement, contre des cellules

ETSU 658, alors que lorsque l'antigène est dénaturé, suite à la migration sur gel SDS-PAGE, 9D9 ne reconnaît plus l'épitope.

TABLEAU IV : Réactivité, en ELISA, des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires, avec des extraits cellulaires complets des isolats cliniques ETSU 658 et ETSU C-2 de *M. catarrhalis* traités ou non traités par des enzymes protéolytiques.

Lignées cellulaires	<i>M. catarrhalis</i> ETSU C-2			<i>M. catarrhalis</i> ETSU 658		
	Non traité	Protéinase K	Trypsine	Non traité	Protéinase K	Trypsine
1C2	>3.500	0.580	3.187	>3.500	- <sup>a</sup>	1.421
1F5	0.444	-	0.164	-	-	-
1C7	-	-	-	>3.500	-	0.238
1C11	0.380	-	0.265	0.339	-	0.100
2B5	0.176	-	-	>3.500	-	1.138
2B9	0.601	0.213	0.379	0.605	-	0.422
2C12	0.656	0.548	0.735	0.546	-	0.996
4B1	-	-	-	2.450	-	0.534
4H7	2.576	0.540	2.231	2.417	-	0.857
6H5	0.236	-	-	0.392	-	-
7H4	0.581	-	0.628	0.659	-	0.999
7F9	0.446	0.174	0.358	0.854	-	0.803
8E1	0.513	0.249	0.477	0.368	0.453	0.187
8A3	2.885	-	0.676	-	-	-
8D3	0.289	0.173	0.467	0.498	-	0.220
8B5	>3.500	0.155	2.394	>3.500	-	0.404
8A8	-	-	-	1.372	-	0.692
9C3	2.839	0.809	2.640	2.858	0.386	2.039
9G3	0.155	-	0.178	0.118	-	0.193
9B7	0.109	-	0.454	-	-	-
9D9	-	-	-	0.269	0.508	0.264

<sup>a</sup>Les résultats d'ELISA sont présentés sous forme de valeurs de DO, alors que - signifie un signal de densité optique inférieur à 0.100.

On observe également que seuls les anticorps 1C2, 8B5 et 9C3 détectent un antigène présent chez la souche ETSU C-2, bien que 2B5 et 8D3 réagissent légèrement lors des criblages en ELISA. On constate de plus que la réactivité des transformants avec ETSU

C-2 se traduit en un doublet dont la masse moléculaire est estimée à 92 kDa et 104 kDa, alors que pour ETSU 658 on remarque qu'une seule bande majeure évaluée à 91 kDa.

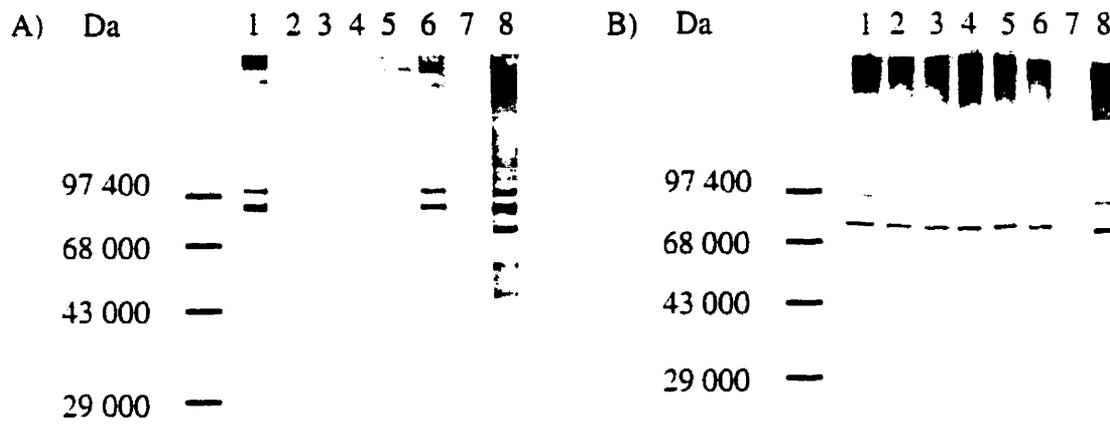


FIGURE 5 : Caractérisation, par immunobuvardage, de la spécificité antigénique des anticorps sécrétés par les lignées cellulaires 1C2(1), 1C7(2), 2B5(3), 8D3(4), 8B5(5), 9C3(6), 9D9(7) et d'une préparation d'anticorps polyclonaux issue d'une palatine : URV 153B(8), contre *M. catarrhalis*. Des extraits cellulaires complets des isolats cliniques ETSU C-2(A) et ETSU 658(B) ont été utilisés.

### 3.3 Étude de la conservation antigénique

Dans le but d'évaluer la conservation antigénique des épitopes reconnus par les anticorps, ces derniers ont été testés en ELISA contre des préparations cellulaires de différents isolats cliniques (Tableau VI).

On constate que seuls 1C2 et 9C3 reconnaissent des épitopes conservés de la protéine. On remarque également que 8B5 réagit fortement contre tous les isolats à l'exception d'ETSU 645, une souche isolée à partir du sang d'un patient.

TABLEAU V : Évaluation, en ELISA, de la conservation des épitopes reconnus par les anticorps réagissant avec *M. catarrhalis*.

Lignées cellulaires	Souches de <i>Moraxella catarrhalis</i> <sup>a</sup>						
	ETSU P-1	ETSU P-3	ETSU T-25	ETSU C-2	ETSU 645	ETSU 902	ETSU 658
1C2	++++ <sup>b</sup>	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1C7	-	-	-	-	-	+	++++
8D3	-	++++	+	-	-	++++	++++
8B5	++++	++++	++	++++	-	++++	++++
9C3	+++	++	++++	++	++++	++++	++
9D9	++++	-	+	-	-	+	+

<sup>a</sup>Des cellules entières ont été adsorbées aux plateaux ELISA.

<sup>b</sup>Les résultats d'ELISA obtenus correspondent à une densité optique (DO) se situant entre 0 et < 0.200 (-); 0.200 et 0.400 (+); 0.400 et 0.600 (++); 0.600 et 0.800 (+++); ou > 0.800 (++++).

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

L'incidence des infections systémiques et du système respiratoire causées par *Moraxella catarrhalis* chez les sujets immunosupprimés et les jeunes enfants, persiste à augmenter depuis les vingt dernières années, moment où *M. catarrhalis* fut considéré comme pathogène et non plus comme simple agent commensal de la flore normale. Actuellement, *M. catarrhalis* est la troisième cause par ordre d'importance d'otites moyennes bactériennes qui affligent les enfants, suite à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. De plus, le nombre de souches de ce pathogène résistantes aux antibiotiques conventionnels n'a cessé de croître, pour atteindre des proportions effarantes. En effet, plus de 90 % des souches possèdent maintenant le gène de la  $\beta$ -lactamase, l'enzyme responsable de cette résistance (Catlin, 1990 et Ejlersen, 1994).

Les efforts pour prévenir les infections causées par *M. catarrhalis* ont porté sur l'évaluation des composantes de la surface, soit les lipooligosaccharides, les pili et particulièrement les protéines de la membrane externe, dans le but de parvenir à comprendre l'immunologie de ces infections et de développer des approches rationnelles d'interventions thérapeutiques, telles que l'élaboration d'un vaccin potentiel. En effet, la prédominance de ce pathogène chez l'adulte immunosupprimé et l'enfant s'explique sans doute par l'importance du statut immunitaire dans la résistance à l'infection. Ce projet de maîtrise visait donc l'étude de la réponse immune naturellement acquise chez l'homme contre *M. catarrhalis* suite à l'identification et la caractérisation d'antigènes reconnus par l'immunité mucoale via l'élaboration d'anticorps humains spécifiques.

#### **1 - Réponse immune locale anti-*M. catarrhalis* développée au niveau du tissu lymphoïde du nasopharynx**

Des techniques d'immunodétection, à l'aide de préparations d'anticorps polyclonaux issus de palatines, dirigés contre des extraits cellulaires complets ou des protéines de la

membrane externe de *M. catarrhalis*, ont permis de constater que tous les sujets testés possèdent une réponse immune locale contre plusieurs antigènes externes et internes de la bactérie. À ce sujet, puisque les palatines sont situées au niveau du nasopharynx, le site de colonisation primaire de ce pathogène, nous avons donc de bonnes indications suggérant l'importance de l'immunité humorale locale dans la défense de l'organisme contre ce pathogène. Cependant, cette réponse varie considérablement d'une souche de *M. catarrhalis* à l'autre mais également d'un individu à l'autre.

La réponse immune contre *M. catarrhalis* a pu être analysée et quantifiée par des épreuves d'ELISPOT effectués à partir de lymphocytes B isolés de ces tissus amygdaliens. Cette méthode est très semblable à l'ELISA conventionnel mais des différences majeures résident sur le fait que les réactions antigènes-anticorps ont lieu sur une membrane de nitrocellulose, à l'intérieur d'un appareil à dot. De plus, plutôt que d'utiliser un surnageant de culture dans lequel on retrouve de l'anticorps primaire, on incube la préparation antigénique directement en présence de lymphocytes B isolés de palatines, de sorte que certaines cellules lymphoïdes, par la sécrétion directe d'anticorps dirigés contre *M. catarrhalis*, forment un complexe avec l'antigène correspondant, ce qui se traduit par l'apparition d'un point bien défini suite à l'ajout du conjugué et de son substrat.

Les résultats obtenus nous dévoilent que certains patients possèdent une plus grande proportion de cellules sécrétrices d'anticorps dirigés spécifiquement contre *M. catarrhalis* que d'autres, ce qui pourrait être attribuable à certains facteurs tels que l'âge et l'état de santé des sujets. Il est important de noter, en effet, que l'ablation de palatines et d'adénoïdes a probablement lieu chez des sujets affectés de difficultés respiratoires engendrées par une inflammation chronique de l'amygdale, phénomène découlant majoritairement d'une infection impliquant un ou plusieurs microorganisme(s). Il est possible que *M. catarrhalis* soit à l'origine de cet état chez quelques individus puisqu'il est occasionnellement rencontré dans le tractus respiratoire, surtout au niveau du nasopharynx et de l'oropharynx. Si cette hypothèse s'avère vraie, il est possible que chez ces sujets, la proportion d'anticorps dirigés spécifiquement contre le pathogène soit plus

élevée que chez un individu qui n'a pas été en contact avec cette bactérie depuis plusieurs mois.

## **2 - Fusion cellulaire et caractérisation antigénique des lignées cellulaires 1C2 et 8B5**

La fusion cellulaire humaine fut réalisée, à l'aide du polyéthylène glycol, entre les cellules lymphocytaires isolées d'une palatine et les cellules myélomateuses HT3, une lignée cellulaire issue de trois fusions consécutives entre des cellules lymphocytaires isolées de palatines et des cellules myélomateuses murines SP2/0 servant de partenaire de fusion (Brodeur, 1987). Cette fusion nous a permis de détecter deux lignées cellulaires stables sécrétrices d'anticorps anti-*M. catarrhalis* naturellement transformées, appelées 1C2 et 8B5. En effet, leur taille, leur forme et leur comportement en culture, indiquent qu'il ne peut s'agir d'hybridomes. Nous avons donc émis l'hypothèse que les lymphocytes B auraient été transformés par le matériel génétique d'un virus intégré de façon naturelle à l'intérieur du génome cellulaire, ce qui leur confère la propriété de sécréter des immunoglobulines et de se multiplier à plus long terme. L'immortalisation à l'aide du virus Epstein-Barr (EBV) est d'ailleurs couramment employée en laboratoire (Martin, 1988).

La caractérisation des anticorps produits par ces deux lignées cellulaires a permis de découvrir qu'ils étaient dirigés contre une composante antigénique de nature protéique conservée à travers tous les isolats cliniques de *M. catarrhalis* testées à ce jour. Nous pouvons également affirmer que ces transformants sécrètent des anticorps dirigés contre des épitopes différents (Tableau 3). Effectivement, l'épitope reconnu par les anticorps sécrétés par le transformant 8B5 ne semble pas exposé à la surface cellulaire de l'isolat ETSU 645 puisqu'aucune réaction n'est visible en ELISA contre des extraits cellulaires complets de cette souche, contrairement à ce qui a été observé avec les anticorps 1C2.

Des épreuves d'immunobuvardage ont démontré que la protéine identifiée par ces lignées cellulaires variait considérablement de masse moléculaire et qu'elle apparaissait régulièrement sous forme de doublet, ou même de triplet selon les souches de *M.*

*catarrhalis* testées. De plus, une panoplie de bandes de très haute masse moléculaire sont également détectées par cette méthode, ce qui nous amène à supposer qu'il s'agirait d'un oligomère composé de plusieurs monomères et que les bandes distinctes de masse moléculaire inférieure seraient un produit partiel de clivage. Malgré ce fait, l'antigène détecté par les anticorps de 1C2 et 8B5 est spécifique à *M. catarrhalis* puisqu'il n'a pas été reconnu chez les autres espèces bactériennes gram-négatif testées. Les caractéristiques antigéniques de cette protéine ressemble grandement à celles de la protéine UspA identifiée par Helminen *et al.* à l'aide d'un anticorps monoclonal murin, l'anticorps 17C7 (Helminen, 1994).

On ne peut affirmer que les anticorps produits par les lignées cellulaires 1C2 et 8B5 sont protecteurs puisque leur activité biologique n'a pas été évaluée. Par contre, certaines observations laisse croire en cette possibilité puisque des anticorps dirigés contre la protéine UspA aussi appelée HMWP se sont avérés protecteurs (Helminen, 1994). Une étude effectuée par Goldblatt *et al.* a de plus révélé que chez les jeunes enfants âgés de moins de 4 ans, les anticorps dirigés contre *M. catarrhalis* sont principalement d'isotypes IgG1 et IgG2. Au delà de cet âge, par contre, la proportion d'IgG3 augmente grandement pour devenir prédominante, période correspondant à la diminution importante des otites et des bactériémies causées par ce pathogène (Enright, 1997). *In vivo*, les cellules bactériennes de *M. catarrhalis* semblent agir sur les cellules B de façon à stimuler préférentiellement une réponse IgG3 en augmentant l'expression intra-cytoplasmique d'IgG3 et la sécrétion de ceux-ci dans le milieu de culture (Goldblatt, 1990). Les anticorps de cette sous-classe semblent donc conférer la protection de l'hôte contre ce pathogène.

### **3 - Hybridation avec des sondes constituées des gènes *uspA1* et *uspA2***

Une banque génomique  $\lambda$ ZAP II de *M. catarrhalis* ETSU 658 a été réalisée dans le but d'isoler le gène codant pour la protéine reconnue par les anticorps de 1C2 et 8B5. La particularité de ce type de banque se situe au niveau du site d'insertion de fragments d'ADN génomique bactérien de 5 à 10 Kb de longueur, à l'intérieur du phagemide

pBluescript préalablement associé au vecteur du bactériophage. Ainsi, l'insert peut être récupéré suite à l'excision du plasmide et caractérisé. Un promoteur *lacZ* peut également être utilisé pour contrôler l'expression de la protéine à l'aide d'IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) lors des criblages et de la purification de l'insert par exemple. Le criblage immunologique de la banque avec le surnageant de croissance de la lignée cellulaire IC2 a permis d'identifier un clone possédant un insert codant pour une protéine contenant l'épitope reconnu par les anticorps sécrétés. La longueur de l'insert fut évaluée à 4.5 Kb suite à l'excision et la purification de pBluescript.

Vu les similarités entre la protéine réactive avec les antigènes sécrétés par les lignées cellulaires IC2 et 8B5 et la protéine UspA, l'étude de l'hybridation de l'insert avec les gènes des protéines UspA1 et UspA2, marqués au  $^{32}\text{P}$ , a été réalisée. Les résultats obtenus suggèrent que l'insert comprend une partie du gène ou le gène complet de la protéine UspA2 puisqu'il y a eu une forte hybridation avec le gène de cette dernière. Le séquençage de l'insert de notre clone recombinant révélera l'identité de la protéine en particulier et indiquera s'il s'agit de la protéine UspA2 ou d'une protéine homologue.

Le gène *UspA2* de *M. catarrhalis* 035E contient 1731 nucléotides codant pour une protéine de 576 acides aminés, ce qui correspond à une masse moléculaire calculée de 62.483 Kd. La région promotrice du gène, i.e. les séquences -10 et -35, de même que le site de liaison du ribosome ont été identifiés. Une région répétée inversée, communément appelée structure en épingle à cheveux, située à moins de 20 paires de bases (pb) de la fin du gène, représente fort probablement le site de terminaison de transcription. L'analyse de la séquence de la protéine UspA2 a révélé, de plus, la présence d'un signal de sécrétion composé d'une région hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés à l'extrémité N-terminale, précédée d'un ou de deux acides aminés basiques (Aebi, 1997).

Sur gel SDS-PAGE, la masse moléculaire de cette protéine, chez la souche 035E, a été estimée à 85 Kd. La raison pour laquelle la protéine UspA2 migre plus lentement est encore inconnue (Aebi, 1997). Nous déduisons, suite à l'analyse de résultats obtenus en immunobuvardage, qu'il y a beaucoup de variabilité à ce niveau d'une souche à l'autre.

Selon Aebi *et al.*, les protéines UspA1 et UspA2 forment ensemble un agrégat ou un oligomère qui migre à plus de 250 Kd sur gel SDS-PAGE. Ces deux protéines sont constituées d'au moins un épitope commun puisqu'elles sont toutes deux reconnues par le MAb 17C7. En fait, bien que l'examen des séquences en acides aminés des deux protéines ne révèle que 43 % d'identité, la région située entre les acides aminés 271 et 411 de la protéine UspA2 est identique à 93 % à la région des acides aminés 498 à 638 de la protéine UspA1. L'anticorps 17C7 est dirigé contre un épitope situé à l'intérieur de cette région (Aebi, 1997). À ce jour, on ne peut affirmer, par contre, que les anticorps de 1C2 ou 8B5 reconnaissent également un épitope conservé chez ces deux protéines.

Une analyse effectuée par Aebi *et al.* a révélé que la séquence en acides aminés de la protéine UspA2 est identique à 17 % à une protéine de la membrane externe des espèces de *Yersinia* appelée YadA (Aebi, 1997). Cette dernière est un facteur de virulence très important chez ce pathogène incluant la résistance de la bactérie au sérum chez *Yersinia enterocolitica* (China, 1994), l'adhérence aux cellules Hep-2 par *Yersinia pseudotuberculosis* (Bliska, 1993), l'attachement du microorganisme aux composantes de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine ou le collagène (Schulze-Koops, 1993 et Schulze-Koops, 1992) et la formation de fibrilles de surface (Kapperud, 1987). De plus, cette protéine est aussi une forme d'oligomère, composé de monomères de 45 à 50 Kd, qui migre avec une masse moléculaire apparente d'environ 200 Kd sur gel SDS-PAGE.

#### **4 - Expression de la protéine reconnue par les lignées cellulaires à la surface de la cellule**

Les épreuves de radioimmunoaccessibilité à l'iode radioactif et de microscopie électronique ont confirmé que les épitopes reconnus par les anticorps synthétisés par les transformants naturels 1C2 et 8B5 sont accessibles à la surface cellulaire de *M. catarrhalis*. De plus, les photographies nous ont permis de visualiser l'emplacement de la protéine. Ainsi, nous avons constaté qu'elle serait possiblement une composante des pili, vu son emplacement et la distance importante la séparant de la membrane externe (Figure 7). La très grande majorité des souches de *M. catarrhalis* possèdent des pili (ou

fimbriae) à leur surface mais leur rôle dans l'attachement de la bactérie aux cellules épithéliales de la muqueuse n'est pas clairement établi (Rikitomi, 1991). En effet, bien que chez plusieurs genres bactériens, les pili sont associés à l'adhérence et donc considérés comme un facteur important de virulence dans le processus infectieux des pathogènes, chez *M. catarrhalis* il ne semble pas y avoir de lien direct entre la présence de pili et l'attachement des cellules bactériennes (Rikitomi, 1991). À ce jour, les propriétés d'adhérence de ce microorganisme n'ont pas encore été élucidées. Il est intéressant de constater que la protéine identifiée au cours de ce projet s'apparente ou est la protéine UspA2, la protéine qui démontre une certaine homologie avec l'adhésine YadA de *Yersinia*.

Récemment, plusieurs études sur *M. catarrhalis* ont été réalisées ce qui a grandement élargit nos connaissances sur cette bactérie trop longtemps négligée. Cependant, la lutte contre ce microorganisme est loin d'être gagnée. Les mécanismes associés à la pathogénicité des infections induites par *M. catarrhalis* sont encore très peu élucidés, surtout au niveau moléculaire. Un moyen de prévention adéquat, telle que la vaccination, demeure le meilleur moyen de diminuer la proportion et la gravité des infections associées à ce pathogène, telles que les otites, les sinusites, les maladies du système respiratoire, les méningites et les bactériémies. La protéine reconnue par les anticorps sécrétés par les lignées cellulaires 1C2 et 8B5 pourrait être un candidat à considérer pour un vaccin potentiel puisqu'elle expose des épitopes à la surface bactérienne, les quels épitopes sont hautement conservés et spécifiques. De plus, cette protéine est très immunogène chez l'homme et des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques sont présentes, en quantité importante, au niveau du nasopharynx, le site primaire de colonisation. Dans l'avenir, il sera important d'évaluer l'activité biologique des anticorps synthétisés par les lignées cellulaires 1C2 et 8B5 et d'étudier en particulier leur capacité à protéger contre l'infection expérimentale chez la souris. De plus, des études permettront d'établir la fonction de cette protéine et son rôle possible dans l'adhérence de la cellule bactérienne.

## RÉFÉRENCES

**Aebi, C., B. Stone, M. Beucher, L. D. Cope, I. Maciver, S. E. Thomas, G. H. McCracken, Jr., P. F. Sparling, and E. J. Hansen.** 1996. Expression of the CopB outer membrane protein by *Moraxella catarrhalis* is regulated by iron and affects iron acquisition from transferrin and lactoferrin. *Infect. Immun.* **64** : 2024-2030.

**Aebi, C., I. Maciver, J. L. Latimer, L. D. Cope, M. K. Stevens, S. E. Thomas, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1997. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* **65** : 4367-4377.

**Ahmed, K., H. Masaki, T. C. Dai, et al.** 1994. Expression of fimbriae and host response in *Branhamella catarrhalis* respiratory infections. *Microbiol. Immunol.* **38** : 767-771.

**Ahmed, K., K. Matsumoto, N. Rikitomi, and T. Nagatake.** 1996. Attachment of *Moraxella catarrhalis* to pharyngeal epithelial cells is mediated by a glycosphingolipid receptor. *FEMS Microbiol. Lett.* **135** : 305-309.

**Ahmed, K., N. Rikitomi, and K. Matsumoto.** 1992. Fimbriation, hemagglutination and adherence properties of fresh clinical isolates of *Branhamella catarrhalis*. *Microbiol. Immunol.* **36** : 1009-1017.

**Ahmed, K., N. Rikitomi, T. Nagatake, and K. Matsumoto.** 1990. Electron microscopy observation of *Branhamella catarrhalis*. *Microbiol. Immunol.* **34** : 967-975.

**Bøvre, K.** 1984. *Neisseriaceae* p. 288-290. *In* : N.R. Krieg and J.G. Holt (eds). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol 1. Baltimore. USA. Williams and Wilkins.

**Bøvre, K.** 1984. The genus *Moraxella*. p. 296-303. *In* : N.R. Krieg and J.G. Holt (eds). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol 1. Baltimore. USA. Williams and Wilkins.

**Bartos, L. C., and T. F. Murphy.** 1988. Comparison of the outer membrane proteins of 50 strains of *Branhamella catarrhalis*. *J. Infect. Dis.* **158** : 761-765.

**Beachey, E. H.** 1981. Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143** : 325-345.

**Bernstein, J. M.** 1992. Mucosal immunology of the upper respiratory tract. *Respiration.* **59** (suppl 3) : 3-13.

**Bernstein, J. M., S. Sendor, and J. Wactawski-Wende.** 1992. Antigen-presenting cells in the nasopharyngeal tonsil. p. 80-90. *In* G.B. Galioto : A clinically oriented update. *Adv otorhinolaryngol.* Vol. 47. Basel. Karger.

**Bhushan, R., C. Kirkham, S. Sethi, and T. F. Murphy.** 1997. Antigenic characterization and analysis of the human immune response to outer membrane protein E of *Branhamella catarrhalis*. *Infect. Immun.* **65** : 2668-2675.

**Bhushan, R., R. Craigie, and T. F. Murphy.** 1994. Molecular cloning and characterization of outer membrane protein E of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *J. Bacteriol.* **176** : 6636-6643.

**Black, P. N.** 1991. Primary sequence of the *Escherichia coli fadL* gene encoding an outer membrane protein required for long-chain fatty acid transport. *J. Bacteriol* **173** : 435-442.

**Bliska, J. B., M. C. Copass, and S. Falkow.** 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into Hep-2 cells. *Infect. Immun.* **61** : 3914-3921.

**Bluestone, C. D.** 1986. Otitismedia and sinusitis in children. Role of *Branhamella catarrhalis*. *Drugs.* **31** suppl 3 : 132-141.

**Bluestone, C. D., and J. O. Klein.** 1988. Otitis media in infants and children. Philadelphia : WB Saunders.

**Bourgeois, F., N. Lambert-Zechovsky et D. Bingen.** 1993. Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques des infections à *Moraxella catarrhalis*. Path. Biol. **6** : 555-561.

**Bourgeois, F., N. Lambert-Zechovsky, H. Chardon, et E. Bingen.** 1991. In vitro bactericidal activity of 8  $\beta$ -lactam antibiotics against *Branhamella catarrhalis*. The 5<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases. Oslo. **125** :1351.

**Brodeur, B. R., J. Lagacé, Y. Larose, M. L. Martin, J. R. Joly, and M. Pagé.** 1987. Mouse-human myeloma partners for the production of heterohybridomas. p. 51-63. *In* : L. B. Schook (ed.). Monoclonal antibody production techniques and applications immunology series v. 33. Marcel Dekker Inc. New York.

**Brodsky, L., L. Moore, J. Stanievich.** 1988. The role of *Haemophilus influenzae* in the pathogenesis of tonsillar hypertrophy in children. Laryngoscope. **98** : 1055-1060.

**Brook, I., and P. Yocum.** 1984. Bacteriology of chronic tonsillitis in young adults. Arch. Otolaryngol. **110** : 803-805.

**Brook, I., and P. H. van de Heyning.** 1994. Microbiology and management of otitis media. Scand J Infect Dis. **93** (suppl.) : 20-32.

**Campagnari, A. A., K. L. Shanks, and D. W. Dyer.** 1994. Growth of *Moraxella catarrhalis* with human transferrin and lactoferrin : expression of iron-repressible proteins without siderophore production. Infect. Immun. **62** : 4909-4914.

**Campagnari, A. A., T. F. Ducey, and C. A. Rebmann.** 1996. Outer membrane protein B1, an iron-repressible protein conserved in the outer membrane of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, binds human transferrin. *Infect. Immun.* **64** : 3920-3924.

**Caroff, M., R. Chaby, D. Karibian, J. Perry, C. Deprun, and L. Szabo.** 1990. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides : electrophoretic, serological, and structural features. *J. Bacteriol.* **172** : 1121-1128.

**Catlin, B. W.** 1970. Transfer of the organism named *Neisseria catarrhalis* to *Branhamella* gen. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20** : 155-159.

**Catlin, B. W.** 1990. *Branhamella catarrhalis* : an organism gaining respect as a pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **3** : 293-320.

**Chaïbi, E. B., P. Mugnier, M. D. Kitzis, F. W. Goldstein, et J. F. Acar.** 1995.  $\beta$ -lactamases de *Branhamella catarrhalis* et leurs implications phénotypiques. *Res. Microbiol.* **146** : 761-771.

**Chardon, H., C. Meiffre, E. Lagier, A. Kazmierczak, et R. Labia.** 1989. Activité in vitro des  $\beta$ -lactamines sur *Branhamella catarrhalis*. *Med. Mal. Infect. Hors série Mai.* 86-94.

**Chardon, H., O. Bellon, F. Bourgeois, et E. Lagier.** 1988. Activité comparée in vitro de 5 macrolides sur 190 souches de *Branhamella catarrhalis*. *RICAI. Paris.* **125** : 74/P6.

**Chen, D., J. McMichael, K. VanDerMeid, D. Hahn, R. Smith, J. Eldridge, and J. Cowell.** 1995. Antibodies to the UspA outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis* block bacterial attachment *in vitro* and are protective in a murine pulmonary challenge model, abstr. E-53, p.290. *In Abstracts of the 95<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology 1995.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Chen, D., J. C. McMichael, K. R. VanDerMeid, D. Hahn, T. Mininni, J. Cowell, and J. Eldridge.** 1996. Evaluation of purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a vaccine in a murine model after active immunization. *Infect. Immun.* **64** :1900-1905.

**China, B., B. T. N'Guyen, M. de Bruyere, and G. R. Cornelis.** 1994. Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **62** : 1275-1281.

**Christensen, J. J., J. Keiding, H. Schumacher, and B. Bruun.** 1991. Recognition of a new *Branhamella catarrhalis*  $\beta$ -lactamase-BRO-3. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** : 774-775.

**Christensen, J. J., J. Ursing, and B. Bruun.** 1994. Genotypic and phenotypic relatedness of 80 strains of *Branhamella catarrhalis* of worldwide origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **119** : 155-160.

**Denamur, E., G. Suermondt, G. Laurans, J. F. Muir, et J. Orfila.** 1987. Rôle croissant de *Branhamella catarrhalis* en pathologie bronchopulmonaire de l'adulte. *Presse med.* **16** : 1202.

**Doern, G. V.** 1981. The *Moraxella* and *Branhamella* Subgenera of the genus *Moraxella*. p. 3276-3280. *In* : M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel. *The Prokaryotes*. Vol 2. New-York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Doern, G. V.** 1990. *Branhamella catarrhalis* : phenotypic characteristics. *Am. J. Med.* **88(S5A)** : 33S-35S.

**Edebrink, P., P.-E. Jansson, M. M. Rahman, et al.** 1994. Structural studies of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* serotype A (strain ATCC 25 238). *Carbohydr. Res.* **257** : 269-284.

**Edebrink, P., P.-E. Jansson, M. M. Rahman, G. Widmalm, T. Holme, and M. Rahman.** 1995. Structural studies of the O-antigen oligolysaccharides from two strains of *Moraxella catarrhalis* serotype C. Carbohydr. Res. **266** : 237-261.

**Ejlertsen, T., E. Thisted, F. Ebbesen, B. Olesen, and J. Renneberg.** 1994. *Branhamella catarrhalis* in children and adults. A study of prevalence, time of colonisation, and association with upper and lower respiratory tract infections. J. Infect. **29** : 23-31.

**Enright, M. C., and H. McKenzie.** 1997. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* – clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen. J. Med. Microbiol. **46** : 360-370.

**Faden, H.** 1995. Comparison of the local immune response to nontypable *Haemophilus influenzae* (nHi) and *Moraxella catarrhalis* (Mc) during otitis media. p. 733-736. In : J. Mestecky *et al.* Advances in mucosal immunology. Plenum Press. New York.

**Faden, H., J. Hong, and T. Murphy.** 1992. Immune response to outer membrane antigens of *Moraxella catarrhalis* in children with otitis media. Infect. Immun. **60** : 3824-3829.

**Faden, H., L. Brodsky, M. J. Waz, J. Stanievich, J. Bernstein, and P. L. Ogra.** 1991. Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. **100** : 612-615.

**Faden, H., Y. Harabuchi, J. J. Hong, and Tonawanda/Williamsville Pediatrics.** 1994. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life : relationship to otitis media. J. Infect. Dis. **169** : 1312-1317.

**Faden, H. F., J. Stanievich, L. Brodsky, J. M. Bernstein, and P. L. Ogra.** 1990. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9** : 623-626.

**Farmer, T., and C. Reading.** 1986. Inhibition of the  $\beta$ -lactamases of *Branhamella catarrhalis* by clavulanic acid and other inhibitors. *Drugs.* **31** Suppl. 3 : 70-78.

**Flesher, A. R., and R. A. Insel.** 1978. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* **138** : 719-730.

**Forsgren, J., A. Samuelson, A. Lindberg, and B. Rynnel-Dagöö.** 1993. Quantitative bacterial culture from adenoid lymphatic tissue with special reference to *Haemophilus influenzae* age-associated changes. *Acta Otolaryngol. (Stockh).* **113** : 668-672.

**Frosch, P., and W. Kolle.** 1896. Die Mikrokokken. p. 154-155. *In* C. Flügge (ed.). *Die Mikroorganismen.* vol.2. Verlag von Vogel. Leipzig.

**Ghon, A., and H. Pfeiffer.** 1902. Der *Micrococcus catarrhalis* (R. Pfeiffer) als Krankheitserreger. *Z. Klin. Med.* **44** : 263-281.

**Goldblatt, D., M. W. Turner, and R. J. Levinsky.** 1990. *Branhamella catarrhalis* : antigenic determinants and the development of the IgG subclass response in childhood. *J. Infect. Dis.* **162** : 1128-1135.

**Goldblatt, D., M. W. Turner, and R. J. Levinsky.** 1990. Delayed maturation of IgG3 : a new variant of paediatric immunodeficiency? *In* : H.M. Chapel, R.J. Lecinsky, and A.D. Webster (eds). *Progress in immunodeficiency III. International congress and symposium series.* Royal Society of Medicine. **173** :109.

**Griffiss, J. M., H. Schneider, R. E. Mandrell, et al.** 1988. Lipooligosaccharides : the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. *Rev. Infect. Dis.* **10** suppl 2 : S287-S295.

**Helminen, M. E., I. Maciver, J. L. Latimer, L. Klesney-Tait, L. D. Cope, M. M. Paris, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1994. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J. Infect. Dis.* **170** : 867-872.

**Helminen, M. E., I. Maciver, M. Paris, J. L. Latimer, S. L. Lumbley, L. D. Cope, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1993. A mutation affecting expression of a major outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis* alters serum resistance and survival in vivo. *J. Infect. Dis.* **168** : 1194-1201.

**Hol, C., C. M. Verduin, E. E. A. Van Dyke, J. Verhoef, A. Fleer, and H. van Dijk.** 1995. Complement resistance is a virulence factor of *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **11** : 207-212.

**Hol, C., E. E. M. van Dijke, C. M. Verduin, J. Verhoef, and H. van Dijk.** 1994. Experimental evidence for *Moraxella*-induced penicillin neutralization in pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* **170** : 1613-1616.

**Hsiao, C. B., S. Sethi, and T. F. Murphy.** 1995. Outer membrane protein CD of *Branhamella catarrhalis* : sequence conservation in strains recovered from the human respiratory tract. *Microb. Pathog.* **19** : 215-225.

**Ingvarsson, L., K. Lundgren, and J. Ursing.** 1982. The bacterial flora in the nasopharynx in healthy children. *Acta Otolaryngol.* **386** suppl. : 94-96.

**Isenberg, H. D., and R. F. d'Amato.** 1995. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. p. 5-18. In P.R. Murray, W.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. Manual of clinical microbiology. 6<sup>th</sup> Edition. Washington, D.C. ASM Press.

**Kapperud, G., E. Namork, M. Skurnik, and T. Nesbakken.** 1987. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* : relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. Infect. Immun. **55** : 2247-2254.

**Kawakami, Y., K. Segawa, and M. Kandi.** 1983. A case of acute catarrhal conjunctivitis due to *Branhamella catarrhalis*. Microbiol. Immunol. **27** : 641-642.

**Klemm, P.** 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. **7** : 321-340.

**Klingman, K. L., and T. F. Murphy.** 1994. Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Infect. Immun. **62** : 1150-1155.

**Korsrud, F., and P. Brandtzaeg.** 1980. Immune systems of human nasopharyngeal and palatine tonsils : histomorphometry of lymphoid components and quantification of immunoglobulin-producing cells in health and disease. Clin. Exp. Immunol. **39** :361-370.

**Leach, A., J. B. Boswell, V. Asche, T. G. Nienhuys, and J. D. Mathews.** 1994. Bacterial colonization of the nasopharynx predicts very early onset and persistence of otitis media in Australian Aboriginal infants. Pediatr. Infect. Dis. J. **13** : 983-989.

**Marchant, C. D.** 1990. Spectrum of disease due to *Branhamella catarrhalis* in children with particular reference to acute otitis media. Am. J. Med. **88**(S5A) : 15S-19S.

**Martin, D., et B. R. Brodeur.** 1988. Les anticorps monoclonaux humains. des instruments pour la prévention et le contrôle des maladies infectieuses. *Interface*. **9** : 13-17.

**Marrs, C. F., and S. Weir.** 1990. Pili (fimbriae) of *Branhamella* species. *Am. J. Med.* **88** suppl. 5A : 36S-40S.

**Mitani, T., K. Tomoda, N. Maeda, T. Yamashita, and T. Kumazawa.** 1990. The tonsillar immune system : its response to exogenous antigens. *Acta oto-laryngol.* **475** (suppl) : 1-14.

**Murphy, T. F.** 1989. The surface of *Branhamella catarrhalis* : a systematic approach to the surface antigens of an emerging pathogen. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8** : 575-577.

**Murphy, T. F.** 1990. Studies of the outer membrane proteins of *Branhamella catarrhalis*. *Am. J. Med.* **88** suppl 5A : 41S-45S.

**Murphy, T. F.** 1996. *Branhamella catarrhalis* : epidemiology, surface antigenic Structure, and immune response. *Microbiol. Rev.* **60** : 267-279.

**Murphy, T. F., and M. R. Loeb.** 1989. Isolation of the outer membrane of *Branhamella catarrhalis*. *Microb. Pathog.* **6** : 159-174.

**Murphy, T. F., C. Kirkham, and A. J. Lesse.** 1993. The major heat-modifiable outer membrane protein CD is highly conserved among strains of *Branhamella catarrhalis*. *Mol. Microbiol.* **10** : 87-98.

**Nadal, D., N. Soh, E. Schläpfer, J. M. Bernstein, and P. L. Ogra.** 1992. Distribution characteristics of immunoglobulin-secreting cells in adenoids. Relationship to age and disease. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **24** : 121-130.

**Rahman, M., and T. Holme.** 1996. Antibody response in rabbits to serotype-specific determinants in lipopolysaccharides from *Moraxella catarrhalis*. *J. Med. Microbiol.* **44** : 348-354.

**Rikitomi, N., B. Andersson, K. Matsumoto, R. Lindstedt, and C. Svanborg.** 1991. Mechanism of adherence of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Scand. J. Infect. Dis.* **23** : 559-567.

**Sarrubi, F. A., J. W. Myers, J. J. Williams, and C. G. Shell.** 1990. Respiratory infections caused by *Branhamella catarrhalis*. *Am. J. Med.* **88** (S5A) : 9S-14S.

**Sarwar, J., A. A. Campagnari, C. Kirkham, and T. F. Murphy.** 1992. Characterization of an antigenically conserved heat-modifiable major outer membrane protein of *Branhamella catarrhalis*. *Infect. Immun.* **60** : 804-809.

**Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* **61** : 2513-2519.

**Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmrich.** 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.* **60** : 2153-2159.

**Sethi, S., S. L. Hill, and T. F. Murphy.** 1995. Serum antibodies to outer membrane proteins (OMPs) of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in patients with bronchiectasis : identification of OMP B1 as an important antigen. *Infect. Immun.* **63** : 1516-1520.

**Siegel, G.** 1978. Description of age-dependent cellular changes in the human tonsil. *ORL.* **40** : 160-171.

**Siegel, G.** 1983. Theoretical and clinical aspects of the tonsillar function. *Int J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **6** : 61-75.

**St. Geme, J. W., III and D. Cutter.** 1995. Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **15** : 77-85.

**St. Geme, J. W., III, D. Cutter, and S. J. Barenkamp.** 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bacteriol.* **178** : 6281-6287.

**Stenfors, L. E., and S. Raisanen.** 1993. Secretory IgA-, IgG- and C3b-coated bacteria in the nasopharynx of otitis-prone and non-otitis-prone children. *Acta Otolaryngol.* **113** : 191-195.

**Van Cauwenberge, P. B.** 1984. Relevant and irrelevant predisposing factors in secretory otitis media. *Acta Otolaryngol. Suppl.* **414** : 147-153.

**Van Hare, G. F., P. A. Shurin, C. D. Marchant, N. A. Cartelli, C. E. Johnson, D. Fulton, S. Carlin, and C. Hwan Kim.** 1987. Acute otitis media caused by *Branhamella catarrhalis* : biology and therapy. *Rev. Infect Dis.* **9**: 16-27.

**Vaneechoutte, M., G. Verschraegen, G. Claeys, and A.-M. van den Abeele.** 1990. Serological typing of *Branhamella catarrhalis* strains on the basis of lipopolysaccharide antigens. *J. Clin. Microbiol.* **28** : 182-187.

**Vaneechoutte, M., G. Verschraegen, G. Claeys, B. Weise, and A. M. van den Abeele.** 1990. Respiratory tract carrier rates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in adults and children and interpretation of the isolation of *M. catarrhalis* from sputum. *J. Clin. Microbiol.* **28** : 2674-2680.

**Verduin, C. M. M. Jansze, C. Hol, T. E. Mollnes, J. Verhoef, and H. van Dijk.** 1994. Differences in complement activation between complement-resistant and complement-sensitive *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* strains occur at the level of membrane attack complex formation. *Infect Immun.* **62** : 589-595.

**Verduin, C. M., C. Hol, H. J. Bootsma, J. Verhoef, and H. van Dijk.** 1993. Observations on constitutional resistance to infection. *Immunol. Today.* **14** : 44-45.

**Verduin, C. M., H. J. Bootsma, C. Hol, A. Fleer, M. Jansze, K. L. Klingman, T. F. Murphy, and H. van Dijk.** 1995. Complement resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* is mediated by a high-molecular-weight outer membrane protein (HMW-OMP), abstr. B-137, p.189. *In Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology 1995.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Wallace, R. J., D. R. Nash, and V. A. Steingrube.** 1990. Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Am. J. Med.* **88** Suppl 5A : 46S-50S.

**Wallace, R. J., V. A. Steingrube, D. R. Nash et al.** 1989. BRO  $\beta$ -lactamase of *Branhamella catarrhalis*, and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal  $\beta$ -lactamase transfer by conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefacines*, and *M. lacunata*. *Antimicrob Agents Chemother* **33** : 1845-1854.

**Wardle, J. K.** 1986. *Branhamella catarrhalis* as an indirect pathogen. *Drugs.* **31** suppl.3 : 93-96.

**Weiser, J. N.** 1992. The oligosaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Microb. Pathog.* **13** : 335-342.

**Wong, D. T., and P. L. Ogra.** 1980. Immunology of tonsils and adenoids - an update. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2** : 181-191.