



La protéine majeure de la membrane externe de Chlamydia: structure et fonctions

C de Sa

► To cite this version:

C de Sa. La protéine majeure de la membrane externe de Chlamydia: structure et fonctions. Veterinary Research, 1996, 27 (4-5), pp.317-331. hal-00902425

HAL Id: hal-00902425

<https://hal.science/hal-00902425>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Article de synthèse

La protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia*: structure et fonctions

C De Sa

Pathologie infectieuse et immunologie, Centre Inra de Tours, 37380 Nouzilly, France

(Reçu le 20 octobre 1995; accepté le 23 février 1996)

Summary — The major outer-membrane protein of *Chlamydia*: structure and functions. *This review presents the structure of the major outer-membrane protein of Chlamydia and its functions at different levels of the developmental cycle of Chlamydia. The antigenicity and the immunogenicity of the protein, which made this antigen essential for the establishment of a protective immunity, are also presented.*

Chlamydia / outer-membrane protein / porin / protection / epitope

Résumé — Cette revue présente la structure de la protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia* ainsi que ses fonctions à différents niveaux du cycle de développement de la bactérie. L'antigénicité et l'immunogénicité de la protéine, qui rendent cet antigène essentiel dans l'établissement d'une immunité protectrice, sont également traitées.

Chlamydia / protéine de la membrane externe / porine / protection / épitope

Introduction	318
Caractérisation biochimique	318
Structure de la protéine	319
Un rôle dans la structure de la bactérie	320
La MOMP intervient dans la différenciation des corps élémentaires en corps réticulés	320
La MOMP est une protéine de type porine	321

La MOMP intervient dans l'adhésion <i>Chlamydia</i>–cellule hôte	321
Variaibilité antigénique et génétique	322
LA MOMP est un antigène protecteur	323
Cartographie des épitopes présents sur la MOMP	324
LA MOMP stimule les cellules immunitaires de type T	325
La production de la MOMP par voie recombinante	325
La recherche d'un vaccin synthétique	326
Les nouvelles approches	327
Conclusion	328
Références	328

INTRODUCTION

Les *Chlamydia* sont des bactéries à caractère ubiquitaire capables de provoquer des infections chez l'homme et l'animal (Brunham et Peeling, 1994 ; Raulston, 1995 ; Vanrompay et al, 1995). Le cycle de développement de *Chlamydia* est de type intracellulaire obligatoire. Le corps élémentaire constitue la forme extracellulaire et infectieuse de la bactérie, tandis que le corps réticulé constitue la forme intracellulaire, métaboliquement active, et capable de se diviser.

Le genre *Chlamydia* comprend quatre espèces. *C trachomatis* et *C pneumoniae* sont essentiellement responsables d'infections oculaires, urogénitales et pulmonaires chez l'homme. *C psittaci* et *C pecorum* infectent principalement l'animal et sont responsables entre autres, dans le cas de *C psittaci*, d'avortements chez les ruminants ainsi que de zoonoses.

Depuis sa mise en évidence un grand intérêt est porté à une protéine de *Chlamy-*

dia située dans la membrane externe et majoritaire du point de vue quantitatif. Différents travaux ont en effet mis en évidence un rôle de cette protéine au niveau de la structure de la bactérie, du cycle de développement, de la physiologie et également de l'attachement *Chlamydia*–cellule hôte. De plus, cet antigène présente, du fait de sa variabilité, un grand intérêt pour des études de typage aussi bien au niveau immunologique que génétique. Enfin, du fait de la présence d'épitopes neutralisants sur cette protéine majeure, celle-ci constitue l'un des principaux candidats pour la mise au point d'un vaccin.

Ces différents aspects de la protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia* sont développés dans cet article.

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE

Toutes les bactéries du genre *Chlamydia* possèdent une protéine communément appelée MOMP, cette abréviation est obtenue à partir du terme anglais «major outer

membrane protein». La protéine est présente tout le long du cycle de développement et sa masse moléculaire varie entre 38 et 43 kDa suivant les souches (Caldwell et al, 1981 ; Hatch et al, 1981). La MOMP est caractérisée par son insolubilité dans un détergent non ionique, le sarkosyl, qui possède la propriété de solubiliser le cytoplasme et la membrane cytoplasmique des bactéries Gram-négatives tout en conservant intacte la membrane externe. Le traitement dans ce détergent préserve la morphologie caractéristique ronde et rigide des corps élémentaires. La MOMP est retrouvée presque intégralement dans cette fraction sarkosyl-insoluble dont elle représente 60 % des protéines (Caldwell et al, 1981). Sa localisation au niveau de la membrane externe a été confirmée par des résultats de microscopie électronique utilisant des anticorps dirigés contre la MOMP (Kuo et Chi, 1987).

Cette protéine est bien solubilisée sous sa forme d'environ 40 kDa après un traitement dans un détergent, de préférence ionique tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), associé à un agent réducteur des ponts disulfure, le β -mercaptoéthanol. L'importance des ponts disulfure dans la structure de cette protéine a été confirmée par Newhall et Jones (1983) qui ont mis en évidence l'existence de polymères naturels de la MOMP stabilisés par de tels ponts.

Swanson et Kuo (1991) ont montré que la protéine est glycosylée ; en effet, la MOMP peut être révélée après transfert avec une technique de coloration spécifique des sucres. De plus, une modification de la migration lors d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA) est observée après traitement de la protéine avec une enzyme spécifique des N-glycanes, ou de l'acide periodique. Ces résultats ont été confirmés par des expériences étudiant l'incorporation au sein de la protéine de sucres marqués par une technique radioactive, et l'observation d'une interaction spé-

cifique de la protéine isolée avec certaines lectines.

STRUCTURE DE LA PROTÉINE

Les travaux de Birkelund et al (1988) ont permis d'étudier les relations entre la MOMP et son voisinage immédiat au niveau de la membrane externe. Ces auteurs ont utilisé un agent pontant, c'est-à-dire une molécule possédant à chacune de ses deux extrémités une fonction chimique activée, capable de créer des liaisons covalentes intra- ou intermoléculaires. Cette étude a permis de mettre en évidence une relation de forte proximité entre le lipopolysaccharide (LPS) de *Chlamydia* et la MOMP. Ce pontage se traduit par une augmentation de la masse moléculaire de la protéine en EGPA, associée à une réaction de la protéine avec des anticorps monoclonaux anti-LPS. Ces études de pontage ont permis également de mettre en évidence des polymères de la MOMP, vraisemblablement des trimères, associés eux aussi avec du LPS comme l'indiquent les résultats d'immunoempreinte. Les connaissances sur la topologie de la MOMP ont considérablement progressé avec le séquençage et la comparaison de différents gènes de la MOMP de *C. trachomatis* (Stephens et al, 1987 ; Yuan et al, 1989). Cette étude a permis de mettre en évidence que le gène de la MOMP contient cinq domaines hautement conservés entre lesquels sont intercalés quatre domaines hautement variables identifiés respectivement I, II, III et IV en allant de l'extrémité N terminale vers l'extrémité C terminale de la protéine. Ces résultats ont été confirmés sur les séquences d'autres espèces de *Chlamydia* (Herring et al, 1989 ; Zhang et al, 1989 ; Carter et al, 1991).

Baehr et al (1988) ont proposé un schéma précisant l'arrangement de la MOMP du sérovar B de *C. trachomatis* au niveau de la membrane externe. Ce modèle

repose sur une étude protéolytique et une cartographie épitopique de la protéine. Ces auteurs ont ainsi démontré que les extrémités N et C terminales de la protéine étaient protégées vis-à-vis d'une dégradation enzymatique, et ce seulement lorsque la bactérie était entière, ce qui suggère une localisation périplasmique des deux extrémités. En revanche, seuls les domaines II et IV de la protéine sont sensibles à la trypsin malgré la présence de plus de trente sites susceptibles d'être clivés.

De plus, il a été montré que des anticorps monoclonaux capables de réagir avec les *Chlamydia* entières reconnaissent des peptides correspondant aux domaines I, II et IV, ce qui démontre leur exposition à la surface de la bactérie. L'absence de déterminants antigéniques au niveau des domaines constants de la protéine a été confirmée par des études ultérieures et suggère une localisation transmembranaire de ces derniers. Bien que l'exposition en surface du domaine III n'ait pas été démontrée, une localisation semblable aux trois autres est cependant probable.

Une étude récente d'Everett et Hatch (1995) sur une souche de *C psittaci* aviaire propose un modèle d'organisation de l'enveloppe de *Chlamydia* en précisant des interactions possibles entre la MOMP et deux protéines riches en cystéine, omp 2 (env B) et omp 3 (env A).

UN RÔLE DANS LA STRUCTURE DE LA BACTÉRIE

Les résultats de Hatch et al (1981) montrant la nécessité de la présence d'un agent réducteur pour solubiliser la MOMP, ainsi que les travaux de Newhall et Jones (1983) mettant en évidence des polymères de la MOMP liés de façon covalente par des ponts disulfure, révèlent l'existence d'un réseau membranaire de MOMP consolidé par des liaisons entre cystéines.

Tamura et Manire avaient déjà en 1967 observé parmi les acides aminés des protéines de *Chlamydia* une étonnante richesse en cystéine. Ils avaient de ce fait proposé que des liaisons de type disulfure pourraient être responsables de la structure et de la rigidité des corps élémentaires.

Ce réseau de liaisons covalentes remplacerait le peptidoglycane qui n'a jamais été mis en évidence chez les *Chlamydia* (Fox et al, 1990). D'autres protéines riches en cystéine sont également impliquées dans ce réseau (Hatch et al, 1984 ; Hatch, 1996).

LA MOMP INTERVIENT DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CORPS ÉLÉMENTAIRES EN CORPS RÉTICULÉS

Contrairement aux corps élémentaires, les corps réticulés sont beaucoup plus fragiles et sensibles à des agents tels que les ultrasons (Tamura et Manire, 1967). Hatch et al (1984), ainsi que Hackstadt et al (1985), ont montré, respectivement pour *C psittaci* et *C trachomatis*, que la MOMP était présente majoritairement sous forme réduite, et donc monomérique, au niveau des corps réticulés. Cette constatation se base sur le fait que la solubilité de la MOMP des corps réticulés ne dépend pas de la présence d'un agent réducteur contrairement à la MOMP des corps élémentaires.

Ces résultats sont confirmés par Hatch et al (1986) pour les deux espèces *C psittaci* et *C trachomatis* en utilisant un marquage métabolique avec de la cystéine marquée au ³⁵S. Les corps élémentaires ainsi marqués sont utilisés pour infecter des cellules puis les *Chlamydia* sont récupérées à différents temps postinfection. L'analyse en EGPA en l'absence d'agent réducteur permet de voir apparaître de la MOMP monomérique à un temps postinfection qui correspond au début de la différenciation des corps élémentaires en corps réticulés.

Ces données suggèrent un rôle des ponts disulfure, et par conséquent un rôle important de la MOMP, dans la différenciation du corps élémentaire vers le corps réticulé. Hackstadt et al (1985) ont étudié l'effet d'un agent réducteur sur des corps élémentaires vivants et observé suite à ce traitement une augmentation de l'oxydation du glutamate par la bactérie, une chute du pouvoir infectieux et une sensibilité à la coloration de Machiavello spécifique des corps réticulés. De plus les corps élémentaires perdent leur résistance caractéristique et deviennent sensibles à des variations de pression osmotique. Le traitement avec l'agent réducteur fait apparaître en fait chez les corps élémentaires des caractères spécifiques des corps réticulés. Cependant, ces auteurs n'ont observé aucun changement de morphologie en microscopie électronique, ce qui montre que, si la réduction des ponts disulfure est un événement essentiel dans la différenciation, elle n'est cependant pas suffisante.

LA MOMP EST UNE PROTÉINE DE TYPE PORINE

Les observations de Hackstadt et al (1985) indiquent une augmentation de la perméabilité membranaire suite à l'action d'un agent réducteur. Cet effet avait déjà été montré par Bavoil et al (1984) qui ont mis en évidence une activité de type porine pour la MOMP. Cette activité a été démontrée en incorporant la protéine isolée dans la membrane de liposomes. La perméabilité de ces liposomes est étudiée en les diluant dans des solutions concentrées en sucres. La variation de volume pour atteindre l'équilibre osmotique se traduit par une variation de l'absorbance.

Ces auteurs ont également montré que cette activité porine est considérablement augmentée lorsque la MOMP est réduite, et que les fonctions thiol libérées sont alkylées

afin d'éviter la réoxydation des ponts disulfure. Une perméabilité membranaire équivalente à celle du même liposome avec dix fois plus de MOMP est ainsi obtenue.

Cette classification de la MOMP dans la famille des porines repose également sur l'existence d'homologies entre la MOMP et d'autres porines bien connues. Ces homologies se situent au niveau du poids moléculaire, du point isoélectrique acide ainsi qu'au niveau de la composition en acides aminés et de la séquence (Gerbl-Rieger et al, 1991).

Par ailleurs, nous avons récemment mis en évidence, pour la MOMP d'une souche de *C psittaci*, une structure native de type oligomérique reconnue par des anticorps protecteurs, et donc caractéristique des porines (De Sa et al, 1995).

En résumé, la MOMP, et d'une façon plus générale les ponts disulfure de la membrane externe, jouent un rôle primordial dans le cycle de *Chlamydia*. Les corps élémentaires, infectieux et métaboliquement inactifs, possèdent un réseau de ponts disulfure qui les rend rigides et résistants aux agressions extérieures. Après internalisation, la réduction de ces ponts est corrélée avec la différenciation en corps réticulés et entraînerait une augmentation de la perméabilité membranaire, notamment grâce à la formation de pores. Cela permettrait aux corps réticulés de récupérer des métabolites pour croître et se diviser.

LA MOMP INTERVIENT DANS L'ADHÉSION *CHLAMYDIA*-CELLULE HÔTE

Le caractère intracellulaire obligatoire des *Chlamydia* met en avant l'aspect essentiel que représente l'attachement entre la bactérie et la cellule hôte. Étant donné l'importance de la MOMP dans la membrane externe, la protéine a également été étudiée sous cet aspect.

Su et al (1988) ont constaté une baisse de l'attachement et une perte du pouvoir infectieux des corps élémentaires du sérovar B de *C trachomatis* lorsque ceux-ci sont traités par la trypsine. L'analyse des protéines en EGPA montre que la MOMP est la première protéine à être clivée par l'enzyme. Les seuls sites touchés se situent au niveau des domaines II et IV (Baehr et al, 1988), d'où une possible implication de ces deux régions dans l'attachement qui sont en outre reconnues par des anticorps neutralisants in vivo.

La même équipe (Su et al, 1990a) a poursuivi ses investigations en étudiant de façon plus approfondie ces deux domaines. Ces auteurs avancent l'hypothèse que la MOMP fonctionne comme une adhésine en promouvant des interactions à la fois de type électrostatiques et hydrophobes. Les domaines variables permettent de conférer une charge négative à la bactérie et interviendraient au niveau électrostatique.

Un autre élément important pourrait être un peptide hydrophobe de neuf acides aminés situé au sein du domaine variable IV, conservé chez toutes les *C trachomatis*, et également retrouvé avec peu de divergence chez d'autres espèces de *Chlamydia* (Su et al, 1990a). Ce peptide n'est pas exposé chez la plupart des souches et devient seulement immunoréactif lorsque les bactéries sont chauffées à 56 °C, une température qui inhibe de façon significative l'attachement des *Chlamydia* aux cellules. La conservation d'un tel peptide au sein des souches ainsi que sa présence à la surface, mais dans une conformation particulière, font penser à ces auteurs que ce peptide pourrait jouer un rôle clé dans l'attachement des *Chlamydia*. Ces facteurs possibles d'adhésion non spécifiques ne sont cependant pas les seuls, en effet d'autres molécules ont été identifiées (Ting et al, 1995). Une des fonctions des glycanes associés aux protéines chez les organismes eucaryotes est de participer à l'attachement. La

MOMP étant une protéine glycosylée, cette voie a été explorée par Swanson et Kuo (1994) qui ont montré que le glycanes de la MOMP, isolé de cette dernière par clivage enzymatique, se fixait à des cellules de type HeLa. Des expériences de compétition ont montré que ce glycanes pouvait inhiber la fixation des corps élémentaires sur les cellules et réciproquement. Cependant la fixation des corps élémentaires sur les cellules peut également être inhibée par de la MOMP dont la partie glycosidique a été clivée par voie enzymatique, ce qui montre que la partie protéique de la MOMP intervient également.

VARIABILITÉ ANTIGÉNIQUE ET GÉNÉTIQUE

La MOMP tient une place prépondérante au niveau de la structure mais est également très importante du point de vue antigénique. La protéine est immunogène chez l'homme et l'animal et possède des épitopes spécifiques de genre, d'espèce, de sous-espèce et de sérotype (Batteiger et al, 1986 ; Stephens et al, 1988 ; Mondesire et al, 1989 ; Baghian et al, 1990). Cette variabilité antigénique permet à la MOMP d'être un antigène important pour l'immunotypage des *Chlamydia* (Batteiger et al, 1986 ; Fukushima et Hirai, 1988). Les épitopes de sous-espèce et de sérotype sont exposés en surface (Kuo et Chi, 1987). La MOMP de *C pneumoniae* semble cependant constituer une exception puisqu'elle est moins immunogène et moins complexe du point de vue antigénique (Campbell et al, 1990). La variabilité antigénique de la MOMP est corrélée avec un polymorphisme génétique. Ce dernier résulte de mutations ponctuelles au niveau des domaines variables (Hayes et al, 1995), qui, sous la pression de sélection, aboutissent à l'émergence de nouveaux types de MOMP. D'autre part, des mécanismes de recombinaison entre

souches, intervenant aussi bien au niveau des domaines variables (Hayes et al, 1994) que des domaines constants (Sayada et al, 1995b), sont également responsables de cette variabilité génétique.

L'étude du gène de la MOMP permet d'obtenir des renseignements sur la phylogénie des *Chlamydia* (Kaltenboeck et al, 1993). L'utilisation de ce gène pour le typage des *Chlamydia* possède également un grand intérêt. En effet, le typage au niveau moléculaire permet une discrimination des souches supérieure à celle obtenue par des techniques immunologiques. Le génotypage de la MOMP permet de différencier les espèces de *Chlamydia*, les sérovars (Sayada et al, 1991), ainsi que des variants à l'intérieur de ces derniers (Dean et Stephens, 1994).

Le typage des *Chlamydia* par l'intermédiaire du gène de la MOMP trouve une application directe au niveau des études épidémiologiques d'affections telles que le trachome (Dean et Stephens, 1994) ou bien encore des affections urogénitales (Frost et al, 1993). Le génotypage de la MOMP est de plus utilisé pour le diagnostic des infections humaines à *Chlamydia*.

Ces études du gène de la MOMP font appel à des techniques d'amplification de l'ADN (PCR) suivies d'une analyse des sites de coupure de différentes enzymes de restriction (Denamur et al, 1991). Le séquençage direct d'une partie du gène (Lampe et al, 1993), ou bien encore des techniques de séparation électrophorétiques (Sayada et al, 1995a), peuvent aussi être utilisées pour détecter des variations génétiques.

LA MOMP EST UN ANTIGÈNE PROTECTEUR

Chez *C trachomatis*, la vaccination avec des bactéries entières a souvent donné lieu à des réactions d'hypersensibilité lors de la

réinfection. De ce fait, la recherche d'un vaccin constitué d'une fraction antigénique, qui éviterait ces inconvénients, est l'un des principaux objectifs de la recherche en chlamydie humaine. La MOMP n'induit pas de réactions d'hypersensibilité et remplit donc cette condition.

Le pouvoir neutralisant des anticorps dirigés contre la MOMP a été démontré in vitro pour la première fois par Caldwell et Perry (1982) avec un sérum polyclonal de lapin produit à partir de protéine purifiée. Dans ce cas le mécanisme de neutralisation n'inhibait pas l'internalisation des corps élémentaires mais intervenait plus tard après l'entrée de la bactérie dans la cellule.

Peeling et al (1984) ont montré sur deux sérovars le pouvoir neutralisant d'un anticorps monoclonal spécifique de l'espèce *C trachomatis*. Ce résultat est retrouvé par Peterson et al (1988) qui montrent que, malgré la spécificité d'espèce, de tels anticorps ne neutralisent cependant que quelques sérotypes parmi les 15 connus.

Ces résultats mis à part, la plupart des anticorps neutralisants anti-MOMP ont une spécificité de sous-espèce et de sérotype (Lucero et Kuo, 1985), ces résultats sont retrouvés pour *C psittaci* (Ando et al, 1993 ; De Sa et al, 1995).

Zhang et al (1987) ont décrit également de tels anticorps chez *C trachomatis* et ont montré qu'ils pouvaient neutraliser le pouvoir infectieux des corps élémentaires pour l'animal. En effet des corps élémentaires traités avec ces anticorps ne provoquent plus de choc toxique chez la souris et sont incapables d'infecter l'œil chez le primate.

Ces auteurs ont établi par ailleurs une corrélation entre le pouvoir neutralisant et l'immunoaccessibilité de l'épitope à la surface des *Chlamydia*. Tous les anticorps neutralisants dirigés contre la MOMP sont en effet capables de reconnaître les corps élémentaires entiers et viables.

Ce travail a de plus permis de distinguer deux catégories d'épitopes neutralisants, certains d'entre eux sont facilement dénaturés par la chaleur tandis que d'autres sont totalement résistants. Cette sensibilité à la chaleur est par ailleurs corrélée avec une sensibilité à l'acide périodique. La première catégorie d'épitopes fait sans doute intervenir une conformation précise de la MOMP qui peut être détruite par la dénaturation. Il s'agit sans doute d'épitopes discontinus nécessitant une conformation stricte de la protéine, tandis que la deuxième catégorie est constituée d'épitopes résistants, donc probablement de type continu et ayant moins de contraintes conformationnelles.

L'importance des épitopes discontinus de la MOMP a été soulignée par d'autres auteurs. Ainsi, Batteiger et al (1993) montrent que l'obtention d'une protection partielle chez le cobaye, vis-à-vis de la souche GPIC de *C psittaci*, est liée à la conservation d'une structure native de la protéine. La MOMP séparée en EGPA sous sa forme de 40 kDa et électroéluee ne protège pas du tout. Cependant, une protection partielle est obtenue avec de la MOMP simplement solubilisée dans un détergent doux, l'octyl glucoside.

Nous avons confirmé l'importance de ces épitopes par de récents travaux (De Sa et al, 1995) sur une souche de *C psittaci* issue d'avortement ovin. Des anticorps monoclonaux protecteurs ont été sélectionnés in vivo grâce un modèle de souris gestante. Ces anticorps sont tous spécifiques de sérotype et reconnaissent tous un épitope immunodominant accessible à la surface des *Chlamydia*. L'analyse en EGPA a montré que ces anticorps reconnaissent un épitope sensible à la chaleur situé sur un oligomère qui correspond à une structure native de la MOMP.

CARTOGRAPHIE DES ÉPITOPES PRÉSENTS SUR LA MOMP

Du fait d'une plus grande facilité d'étude, la plupart des travaux réalisés sur les épitopes

protecteurs de la MOMP ont été réalisés à ce jour sur des épitopes considérés comme continus, et chez *C trachomatis*, l'espèce la plus importante pour l'homme.

L'objectif a été de localiser les parties de la protéine reconnues par les anticorps neutralisants dans le but de produire un vaccin synthétique. Cela a nécessité dans un premier temps le séquençage des gènes de la MOMP des différents sérovars (Carter et al, 1991 à titre de revue), afin de pouvoir localiser sur la protéine les séquences identifiées.

La cartographie épitopique de la protéine a été réalisée tout d'abord grâce à des techniques de biologie moléculaire permettant le clonage de petits fragments de la MOMP qui se recouvrent (Baehr et al, 1988). L'essor des techniques de synthèse peptidique a, par la suite, permis de synthétiser de façon simple des petits peptides, généralement de six acides aminés, recouvrant totalement, ou partiellement, la séquence de la protéine (Conlan et al, 1988 ; Zhong et al, 1990). Le support solide sur lequel sont synthétisés les peptides est conçu de telle façon que l'immunoréactivité de ces derniers peut être testée directement in situ. Les peptides, ou les fragments de protéine clonée, réagissant avec les anticorps testés, sont recherchés. La séquence reconnue en acides aminés est identifiée directement, ou indirectement par l'intermédiaire de la séquence en acides nucléiques. Les sites réactifs avec les anticorps peuvent ainsi être identifiés sur la MOMP à un acide aminé près.

C'est en utilisant ces différentes techniques que des épitopes spécifiques de sérotype ont été identifiés dans les domaines variables I, II et IV (Baehr et al, 1988 ; Conlan et al, 1988 ; Stephens et al, 1988 ; Zhong et al, 1990). Les épitopes spécifiques de sous-espèce et d'espèce ont été localisés majoritairement dans le domaine variable IV par ces mêmes auteurs, toutefois un épitope de sous-espèce a aussi été iden-

tifié sur le domaine I. Tous ces épitopes ont en commun le fait d'être situés sur les domaines variables de la protéine. L'épitope d'espèce, qui est donc retrouvé chez les 15 sérovars de *C trachomatis*, a ainsi été identifié au niveau d'une séquence de neuf acides aminés située vers le milieu du domaine variable IV.

Malgré sa spécificité, cet épitope n'est pas exposé de la même manière chez toutes les souches et n'est que partiellement reconnu sur les corps élémentaires natifs. L'analyse des bactéries dénaturées en immunoempreinte après une EGPA révèle cependant la présence de l'épitope chez toutes les souches de *C trachomatis*. Ce résultat souligne l'importance de la technique utilisée lorsque l'on évalue l'antigénicité d'une molécule. De plus, ce phénomène explique pourquoi les anticorps dirigés contre cet épitope ne permettent pas de neutraliser toutes les souches de *Chlamydia*.

LA MOMP STIMULE LES CELLULES IMMUNITAIRES DE TYPE T

Tous les épitopes décrits précédemment sont reconnus par des anticorps et sont donc de type B, cependant la présence d'épitopes capables de stimuler les cellules T a également été recherchée.

La première étude de ce type a été réalisée par Su et al (1990b). Des souris ont été immunisées avec de la MOMP purifiée puis les cellules T de la rate ont été récupérées. Des tests de prolifération de ces cellules après stimulation avec des peptides représentant l'intégralité de la séquence de la MOMP du sérovar A de *C trachomatis* ont permis la sélection de huit peptides. Ils se situent pour la plupart dans les domaines constants de la protéine. La capacité de ces peptides à stimuler les cellules T a été vérifiée en injectant ces derniers à des souris qui sont immunisées ultérieurement avec

de la MOMP purifiée. Les sérums obtenus montrent une augmentation significative de la réponse immunitaire humorale dirigée contre les domaines variables de la MOMP par rapport à des souris témoins non stimulées préalablement. L'immunisation de souris avec des peptides chimériques contenant des épitopes T et B permet également d'augmenter de façon significative la réponse contre les domaines variables.

Allen et al (1991) ont recherché des épitopes T sur la MOMP du sérovar B de *C trachomatis* en utilisant des techniques semblables et ont mis en évidence la présence probable de plusieurs épitopes T au niveau du domaine variable III. Ils ont établi par ailleurs une corrélation entre la variabilité de ce domaine, dans lequel aucun épitope de type B n'a jamais été identifié, et la présence des épitopes de type T. La localisation de ces épitopes dans le domaine variable III avait déjà été montrée par des techniques de prédiction basées sur la séquence de la protéine.

Ces auteurs expliquent les différences de résultats, par rapport à l'étude précédente de Su et al (1990b), par le fait notamment que les souris sont immunisées dans leur étude avec des corps élémentaires viables, et non avec de la MOMP purifiée, qui pourrait sans doute être dénaturée et entraîner une réponse différente au niveau des cellules T. La présence d'épitopes T dans le domaine variable III a de plus été confirmée ultérieurement par d'autres études (Ishizaki et al, 1992 ; Stagg et al, 1993).

LA PRODUCTION DE LA MOMP PAR VOIE RECOMBINANTE

La manière qui semble la plus simple, afin d'obtenir la MOMP pour en étudier l'immunogénicité, est de la purifier à partir des *Chlamydia* elles-mêmes. La protéine représentée en effet 60 % des protéines mem-

branaires. Cependant, du fait du développement intracellulaire obligatoire et du faible rendement de multiplication de la bactérie, ce mode de production n'est pas envisageable. Les quelques études d'immunisation réalisées avec de la MOMP ont eu pour but de montrer simplement l'intérêt de cette dernière pour la protection (Tan et al, 1990 ; Batteiger et al, 1993).

Dès lors, les efforts se sont reportés sur la production de l'antigène par voie recombinante dans une bactérie facile à cultiver telle qu'*Escherichia coli*. Cependant le clonage et l'expression de protéines entières de type porine, telles que la MOMP, ne sont pas simples à réaliser. De ce fait, les premiers clonages ont été réalisés pour des fragments de la protéine (Pickett et al, 1988). La MOMP ainsi produite a permis d'obtenir une faible protection dans un modèle souris (Tuffrey et al, 1992). Toye et al (1990) ont cloné et réussi à faire exprimer un fragment correspondant au domaine variable IV et contenant donc l'épitope d'espèce trachomatis. L'immunisation de lapins avec ce fragment permet d'obtenir des sérums neutralisants contre quelques sérotypes.

Dans une autre étude (Hayes et al, 1991), des épitopes B neutralisants ont été fusionnés avec une porine d'*E coli*, ce qui a permis de montrer que des fragments de MOMP de *Chlamydia* pouvaient ainsi être exprimés à la surface d'une bactérie non pathogène, pouvant donc éventuellement servir de vaccin vivant. Cependant, cette expérience a montré qu'une faible immunogénicité est obtenue dans ce système.

Le premier clonage permettant l'expression du gène de la MOMP dans son intégralité a été réalisé pour la première fois par Koehler et al (1992) dans des *E coli* permettant l'expression de gènes toxiques. Cependant, l'expression de la protéine s'est rapidement avérée létale pour la bactérie recombinante.

Deux études menées postérieurement (Dascher et al, 1993 ; Manning et Stewart,

1993) concluent que l'expression de la MOMP entière est effectivement possible et que des modifications post-transcriptionnelles ont bien lieu puisque le peptide signal de la bactérie est clivé. Cependant, la protéine ne rejoint pas la surface de la bactérie mais reste localisée dans l'espace périsplasmique, l'effet létal est également retrouvé. De plus, cette MOMP recombinante n'est pas reconnue par un anticorps dirigé contre un épitope conformationnel (Manning et Stewart, 1993), ce qui montre que la structure de la protéine n'est pas correcte. La MOMP recombinante dans *E coli* ne semble donc pas permettre d'évaluer la part que peuvent jouer les épitopes conformationnels au niveau de la protection.

Les tentatives d'expression de la MOMP de *C psittaci* dans *E coli*, destinées à obtenir un vaccin contre la chlamydie abortive ovine, ont de la même façon été un échec jusqu'à présent.

Les poliovirus sont également étudiés en tant que vecteurs vivants de fragments de la MOMP du fait de leur capacité à induire une immunité des muqueuses, essentielle aussi bien dans le cas du trachome que des maladies sexuellement transmissibles à *C trachomatis*. Ces voies s'avèrent relativement efficaces comme le montre un travail récent de Murdin et al (1995).

LA RECHERCHE D'UN VACCIN SYNTHÉTIQUE

L'identification de peptides reconnus par des anticorps neutralisants a permis d'envisager une stratégie de vaccination basée sur des peptides synthétiques ou des molécules dérivées de ces derniers. Cette approche se base sur l'utilisation d'épitopes de type continu.

De nombreux épitopes reconnus par des anticorps neutralisants sont spécifiques de

sérotype, mais du fait de la multiplicité des sérovars de *C. trachomatis*, un vaccin efficace impliquerait d'avoir au moins un épitope neutralisant pour chaque sérovar. Ce défi est d'autant plus difficile à relever que la stratégie de cartographie épitopique, utilisée pour l'identification de ces peptides, ne reflète pas vraiment la réalité de la relation antigène-anticorps et en représente plutôt un modèle simplifié. En effet, un épitope, même s'il est de type continu, possède tout de même une conformation au sein de la protéine qui n'est pas forcément reproduite par le peptide isolé. De ce fait, certains épitopes ne seront jamais identifiés par cette technique. Le peptide peut également être reconnu partiellement et ne représenter en fait qu'une partie d'un épitope discontinu (Conlan et al, 1989).

Pour toutes ces raisons, les peptides sélectionnés comme vaccins potentiels, même s'ils sont immunogènes sous certaines conditions, ne sont pas toujours capables d'induire des anticorps neutralisants. La faible réactivité des sérums anti-peptides vis-à-vis de la bactérie entière illustre bien ce problème. De plus, les peptides seuls ne sont pas forcément suffisants pour être bien immunogènes, d'autres éléments de la protéine ou situés ailleurs sur la bactérie pourraient aussi intervenir conjointement.

Malgré ces obstacles, des essais de vaccination ont été réalisés et la plupart du temps avec des peptides portant des épitopes de sous-espèce ou d'espèce, de spécificité plus large que les sérotypes, et donc plus intéressants. Ces peptides sont souvent couplés à l'hémocyanine de Patelle (KLH) qui est une protéine immunogène utilisée comme transporteur d'haptènes. Le but de ce couplage est d'accroître l'immunogénicité des peptides lorsqu'ils sont ensuite injectés à des lapins ou des souris (Cheng et al, 1992 ; Villeneuve et al, 1994). La réponse immune obtenue est fonction

de l'haplotype H2 (Qu et al, 1994), ce qui complique l'étude de l'immunogénicité.

Ces peptides contenant des épitopes B peuvent également être couplés à des peptides contenant des épitopes T pour former ainsi des peptides chimères (Su et Caldwell, 1993). Ces chimères ont eux-mêmes été utilisés pour construire des molécules plus complexes dans le but d'augmenter leur immunogénicité (Zhong et al, 1993). Cette dernière étude conclut cependant que les anticorps produits reconnaissent beaucoup plus fortement la molécule synthétique que les corps élémentaires de *Chlamydia*. La molécule utilisée pour immuniser n'a donc pas permis de présenter les épitopes sous leur conformation native.

LES NOUVELLES APPROCHES

Pour pallier ce problème de présentation des épitopes, une nouvelle approche a été décrite (Zhong et al, 1994). Un peptide correspondant au domaine variable I a été exprimé, à la surface d'un phage filamenteux, en lui imposant des contraintes conformationnelles obtenues par des variations de la séquence adjacente au peptide. Les phages réactifs ont été purifiés par affinité avec des anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels de la MOMP puis ont été utilisés pour immuniser des souris. Les sérums obtenus montrent que les peptides ainsi sélectionnés présentent une bonne corrélation entre leur capacité à être reconnus par des anticorps spécifiques de l'épitope natif, c'est-à-dire leur antigénicité, et leur capacité à induire ces mêmes anticorps, c'est-à-dire leur immunogénicité. Ce type d'approche pourrait permettre de mieux valoriser tout le travail de cartographie réalisé préalablement sur les épitopes de la MOMP.

Des tentatives de production des épitopes neutralisants sont également réalisées en utilisant la technique des anticorps

anti-idiotype. Cette fois-ci, on ne cherche plus à reproduire la séquence reconnue de manière idéale mais à la mimer en utilisant l'anticorps neutralisant comme une sorte de moule. L'immunisation d'un animal avec cet anticorps permet théoriquement d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre la partie variable de l'anticorps neutralisant. Les anticorps anti-idiotypes ainsi produits peuvent mimer l'épitope de départ et servir donc à leur tour d'antigène protecteur. Des résultats avec des sérums polyclonaux anti-idiotype ont été obtenus récemment pour *C psittaci* (Ts'ao et Magee, 1994) et *C trachomatis* (Brossay et al, 1994).

CONCLUSION

La protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia* est un antigène primordial sous différents aspects. Sa principale caractéristique est de représenter un élément majoritaire de la membrane externe de *Chlamydia*. De ce fait, la protéine est amenée à jouer des rôles multiples à l'interface bactérie-milieu extérieur.

L'un de ces rôles est d'intervenir dans la structure et dans la différenciation de la bactérie au cours de son cycle. Cette fonction est étroitement liée à la possibilité de la protéine à former des ponts disulfure.

Toujours en tant que protéine de surface, la MOMP participe au niveau des interactions *Chlamydia*-cellule hôte et joue un rôle physiologique essentiel du fait de son activité porine.

La variabilité génétique de la MOMP, caractéristique des protéines de surface de ce type, lui permet d'être un antigène important pour le typage et le diagnostic, tant du point de vue immunologique que du point de vue génétique. L'analyse de la variabilité de la protéine majeure est utilisée pour des études épidémiologiques et est également

importante pour la mise au point d'un vaccin efficace contre les infections à *Chlamydia*. En effet, du fait de la présence d'épitopes neutralisants sur la MOMP, cette dernière constitue l'un des principaux candidats pour un vaccin. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui n'ont pas été concluants, et ce souvent du fait d'une approche des épitopes neutralisants sous une forme linéaire. La mise au point d'un vaccin semble donc tournée vers une nouvelle approche des épitopes prenant en compte leur conformation ainsi que leur caractère discontinu. De plus, la présence d'épitopes T sur la MOMP, qui permettent d'obtenir une immunité de type cellulaire, devra également être prise en compte pour la mise au point d'un vaccin efficace.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier A Rodolakis, A Souriau, E Chouan et K Sidi Boumedine pour les corrections apportées à cet article.

RÉFÉRENCES

- Allen JE, Locksley RM, Stephens RS (1991) A single peptide from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* elicits T cell help for the production of antibodies to protective determinants. *J Immunol* 147, 674-679
- Ando S, Takashima I, Hashimoto N (1993) Neutralization of *Chlamydia psittaci* with monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* 37, 753-758
- Baehr WB, Zhang Y-X, Joseph T, Hua S, Nano FE, Everett KDE, Caldwell HD (1988) Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4000-4004
- Baghian A, Shaffer L, Storz J (1990) Antibody response to epitopes of chlamydial major outer membrane proteins on infectious elementary bodies and of the reduced polyacrylamide gel electrophoresis-separated form. *Infect Immun* 58, 1379-1383
- Batteiger BE, Newhall WJ, Terho VP, Wilde III CE, Jones RB (1986) Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with

- murine monoclonal antibodies. *Infect Immun* 53, 530-533
- Batteiger BE, Rank RG, Bavoil PM, Soderberg LSF (1993) Partial protection against genital reinfection by immunization of guinea pigs with isolated outer-membrane proteins of the chlamydial agent of guinea-pig inclusion conjunctivitis. *J Gen Microbiol* 139, 2965-2972
- Bavoil P, Ohlin A, Schachter J (1984) Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 44, 479-485.
- Birkelund S, Lundemose AG, Christiansen G (1988) Chemical cross-linking of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 56, 654-659
- Brossay L, Villeneuve A, Paradis G, Côté L, Mourad W, Hébert J (1994) Mimicry of a neutralizing epitope of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* by anti-idiotypic antibodies. *Infect Immun* 62, 341-347
- Brunham R C, Peeling R W (1994) Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect Agents Dis* 3, 218-233
- Caldwell HD, Perry LJ (1982) Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect Immun* 38, 745-754
- Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J (1981) Purification and partial characterization of the major outer membrane of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 31, 1161-1176
- Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT (1990) Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 58, 93-97
- Carter MW, Al-Mahdawi SAH, Giles IG, Treharne JD, Ward ME, Clarke IN (1991) *C pneumoniae*: nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein of IOL-207. *J Gen Microbiol* 137, 465-475
- Cheng X, Pal S, de la Maza LM, Peterson EM (1992) Characterization of the humoral response induced by a peptide corresponding to variable domain IV of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar E. *Infect Immun* 60, 3428-3432
- Conlan JW, Clarke IN, Ward ME (1988) Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol* 2, 673-679
- Conlan JW, Kajbaf M, Clarke IN, Chantier S, Ward ME (1989) The major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*: critical binding site and conformation determine the specificity of antibody binding to viable chlamydiae. *Mol Microbiol* 3, 311-318
- Dascher CD, Roll D, Bavoil PM (1993) Expression and translocation of the chlamydial major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 15, 455-467
- Dean D, Stephens RS (1994) Identification of individual genotypes of *Chlamydia trachomatis* from experimentally mixed serovars and mixed infections among trachoma patients. *J Clin Microbiol* 32, 1506-1510
- Denamur E, Sayada C, Souriau A, Orfila J, Rodolakis A, Elion J (1991) Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol* 137, 2525-2530
- De Sa C, Souriau A, Bernard F, Salinas J, Rodolakis A (1995) An oligomer of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* is recognized by monoclonal antibodies which protect mice from abortion. *Infect Immun* 63, 4912-4916
- Everett KDE, Hatch TP (1995) Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol* 177, 877-882
- Fox A, Rogers JC, Gilbert J, Morgan S, Davis CH, Knight S, Wyrick PB (1990) Muramic acid is not detectable in *Chlamydia psittaci* or *Chlamydia trachomatis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Infect Immun* 58, 835-837
- Frost E H, Deslandes S, Bourgaux Ramoisy D (1993) *Chlamydia trachomatis* serovars in 435 urogenital specimens typed by restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Infect Dis* 168, 497-501
- Fukushi H, Hirai K (1988) Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian *Chlamydia psittaci*. *J Clin Microbiol* 26, 675-680
- Gerbl-Rieger S, Peters J, Kellermann J, Lottspeich F, Baumeister W (1991) Nucleotide and derived amino acid sequences of the major porin of *Comamonas acidovorans* and comparison of porin primary structures. *J Bacteriol* 173, 2196-2205
- Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD (1985) Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? *J Bacteriol* 161, 25-31
- Hatch TP (1996) Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae? *J Bacteriol* 178, 1-5
- Hatch TP, Vance Jr DW, Al-Hossainy E (1981) Identification of a major envelope protein in *Chlamydia* spp. *J Bacteriol* 146, 426-429
- Hatch TP, Allan I, Pearce JH (1984) Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol* 157, 13-20
- Hatch TP, Miceli M, Sublett JE (1986) Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 165, 379-385

- Hayes LJ, Conlan JW, Everson JS, Ward ME, Clarke IN (1991) *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein epitopes expressed as fusions with LamB in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*; their application as potential immunogens. *J Gen Microbiol* 137, 1557-1564
- Hayes LJ, Yearsley P, Trehan JD, Ballard RA, Fehler GH, Ward ME (1994) Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 62, 5659-5663
- Hayes L J, Pecharatana S, Bailey R L, Hampton T J, Pickett M A, Mabey D C W, Watt P J, Ward M E (1995) Extent and kinetics of genetic change in the *omp 1* gene of *Chlamydia trachomatis* in two villages with endemic trachoma. *J Infect Dis* 172, 268-272
- Herring AJ, Tan TW, Baxter S, Inglis NF, Dunbar S (1989) Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol Lett* 65, 153-158
- Ishizaki M, Allen JE, Beatty PR, Stephens RS (1992) Immune specificity of murine T-cell lines to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 60, 3714-3718
- Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J (1993) Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J Bacteriol* 175, 487-502
- Koehler JE, Birkelund SV, Stephens RS (1992) Overexpression and surface localization of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6, 1087-1094
- Kuo C-C, Chi EY (1987) Ultrastructural study of *Chlamydia trachomatis* surface antigens by immunogold staining with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 55, 1324-1328.
- Lampe MF, Suchland RJ, Stamm WE (1993) Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 61, 213-219
- Lucero ME, Kuo C-C (1985) Neutralization of *Chlamydia trachomatis* cell culture infection by serovar-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun* 50, 595-597
- Manning DS, Stewart SJ (1993) Expression of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 61, 4093-4098
- Mondesire RR, Maclean IW, Shewen PE, Winston SE (1989) Identification of genus-specific epitopes on the major outer membrane complexes of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* immunotypes 1 and 2. *Infect Immun* 57, 2914-2918
- Murdin AD, Su H, Klein MH, Caldwell HD (1995) Poliovirus hybrids expressing neutralization epitopes from variable domains I and IV of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* elicit broadly cross-reactive *C trachomatis*-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 63, 1116-1121
- Newhall VWJ, Jones RB (1983) Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *J Bacteriol* 154, 998-1001
- Peeling R, Maclean IW, Brunham RC (1984) In vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibody to an epitope on the major outer membrane protein. *Infect Immun* 46, 484-488
- Peterson EM, Zhong G, Carlson E, de la Maza LM (1988) Protective role of magnesium in the neutralisation by antibodies of *Chlamydia trachomatis* infectivity. *Infect Immun* 56, 885-891
- Pickett MA, Ward ME, Clarke IN (1988) High-level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Mol Microbiol* 2, 681-685
- Qu Z, Cheng X, de la Maza LM, Peterson EM (1994) Analysis of the humoral response induced by a chimeric peptide representing variable segments I and IV of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine* 12, 557-564
- Raulston J (1995) Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. *Mol Microbiol* 15, 607-616
- Sayada C, Denamur E, Orfila J, Catalan F, Elion J (1991) Rapid genotyping of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein by the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 83, 73-78
- Sayada C, Denamur E, Grandchamp B, Orfila J, Elion J (1995a) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis for the detection of point mutations in the *Chlamydia trachomatis* major outer-membrane protein gene. *J Med Microbiol* 43, 14-25
- Sayada C, Vretou E, Orfila J, Elion J, Denamur E (1995b) Heterogeneity within the first constant segment of the major outer membrane protein gene in *Chlamydia trachomatis* serovar D/Da distinguishes 2 lineages. *CR Acad Sci, Serie III - Sciences de la vie - Life Sciences* 318, 943-949
- Stagg AJ, Elsley WAJ, Pickett MA, Ward ME, Knight SC (1993) Primary human T-cell responses to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* 79, 1-9
- Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS (1987) Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 169, 3879-3885
- Stephens RS, Wagar EA, Schoolnik GK (1988) High-resolution of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med* 167, 817-831
- Su H, Caldwell HD (1993) Immunogenicity of a synthetic oligopeptide corresponding to antigenically common T-helper and B-cell neutralizing epitopes of the

- major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine* 11, 1159-1166
- Su H, Zhang YX, Barrera O, Watkins NG, Caldwell HD (1988) Differential effect of trypsin on infectivity of *Chlamydia trachomatis*: loss of infectivity requires cleavage of major outer membrane protein variable domains II and IV. *Infect Immun* 56, 2094-2100
- Su H, Watkins NG, Zhang Y-X, Caldwell HD (1990a) *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 58, 1017-1025
- Su H, Morisson RP, Watkins NG, Caldwell HD (1990b) Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med* 172, 203-212
- Swanson AF, Kuo C-C (1991) Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. *Infect Immun* 59, 2120-2125
- Swanson AF, Kuo CC (1994) Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect Immun* 62, 24-28
- Tamura A, Manire GP (1967) Preparation and chemical composition of the cell membranes of developmental reticulate forms of meningopneumonitis organisms. *J Bacteriol* 94, 1184-1188
- Tan TW, Herring AJ, Anderson IE, Jones GE (1990) Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infect Immun* 58, 3101-3108
- Ting LM, Hsia RC, Haidaris CG, Bavoi PM (1995) Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun* 63, 3600-3608
- Toye B, Zhong G, Peeling R, Brunham RC (1990) Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 58, 3909-3913
- Ts'ao YC, Magee WE (1994) Monoclonal antibody to a major outer membrane protein of feline *Chlamydia psittaci*: antibody specificity and anti-idiotypic antibody production. *Vet Microbiol* 42, 1-13
- Tuffrey M, Alexander F, Conlan W, Woods C, Ward M (1992) Heterotypic protection of mice against chlamydial salpingitis and colonization of the lower genital tract with a human serovar F isolate of *Chlamydia trachomatis* by prior immunization with recombinant serovar L1 major outer-membrane protein. *J Gen Microbiol* 138, 1707-1715
- Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F (1995) *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 45, 93-119
- Villeneuve A, Brossay L, Paradis G, Hébert J (1994) Characterization of the humoral response induced by a synthetic peptide of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar B. *Infect Immun* 62, 3547-3549
- Yuan Y, Zhang Y-X, Watkins NG, Caldwell HD (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun* 57, 1040-1049
- Zhang YX, Stewart S, Joseph T, Taylor HR, Caldwell HD (1987) Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 138, 575-581
- Zhang YX, Morrison SG, Caldwell HD, Baehr W (1989) Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia psittaci* strains. *Infect Immun* 57, 1621-1625
- Zhong G, Reid RE, Brunham RC (1990) Mapping antigenic sites on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with synthetic peptides. *Infect Immun* 58, 1450-1455
- Zhong G, Toth I, Reid R, Brunham RC (1993) Immunogenicity evaluation of a lipidic amino acid-based synthetic peptide vaccine for *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 151, 3728-3736
- Zhong G, Smith GP, Berry J, Brunham RC (1994) Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J Biol Chem* 269, 24183-24188