

Les nouvelles technologies vaccinales

New vaccine technologies

Par Laurent FISCHER⁽¹⁾

(communication présentée le 22 octobre 2003)

RÉSUMÉ

Les vaccins de nouvelles technologies apportent des solutions à certains risques et problèmes des vaccins traditionnels et offrent de nouvelles perspectives à la vaccinologie vétérinaire et humaine. Leur excellente innocuité couplée à une forte activation des réponses cellulaires permet un meilleur contrôle des pathologies intracellulaires virales, bactériennes ou parasitaires et présente de nouvelles opportunités de traitement en cancérologie.

La mise en place de plates-formes de technologies vaccinales comme les plates-formes vectorielles à "canarypox" ou à vecteur plasmidique qui sont développées chez Merial permet une réduction des temps et de la complexité des développements industriels et offrent à la communauté médicale une possibilité de réaction plus rapide en cas de pathologie émergente.

Mots-clés : vaccins recombinants, poxvirus, adenovirus, plasmides, immunologie.

SUMMARY

New vaccine technologies provide solutions to some of the risks and issues related to conventional vaccines and as well as new openings in veterinary and human vaccinology. Their excellent safety profile and their ability to trigger strong cell-based immunity improve the control of intracellular viral, bacterial or parasitic pathogens and create new opportunities in cancer treatments.

The availability of vaccine technology platforms, such as the canarypox-vectored or plasmid-vectored currently developed by Merial, reduces the duration and complexity of the industrial development and helps the medical community react quicker to emerging diseases.

Key words: recombinant vaccines, poxviruses, adenoviruses, plasmids, immunology.

(1) DVM, PhD, Merial S.A.S., Discovery Research, Lyon Gerland Laboratory, 69007 LYON, France

• INTRODUCTION

Bien que les vaccins traditionnels aient indéniablement démontré leur valeur pour la prévention de nombreuses maladies, ils ne sont cependant pas sans quelques insuffisances qui limitent parfois leurs possibilités d'utilisation.

Les risques potentiels associés aux vaccins vivants atténués peuvent correspondre à une réversion vers la virulence de la souche vaccinale, à une diffusion dans l'environnement ou à des contaminations biologiques indétectables avec les méthodes de contrôle actuelles. Les risques associés aux vaccins inactivés concernent surtout leur innocuité qui peut être insuffisante du fait d'une inactivation partielle et/ou d'un adjuvant trop réactogène.

Au plan de l'efficacité, les vaccins inactivés sont souvent peu efficaces pour induire une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire nécessaire pour éliminer un microorganisme intracellulaire. D'une façon générale, l'efficacité des vaccins traditionnels est souvent limitée en présence d'anticorps d'origine maternelle, ce qui limite les possibilités de vaccination des jeunes animaux.

Par ailleurs, les vaccins traditionnels posent parfois des difficultés d'industrialisation car certains microorganismes ne peuvent pas être produits en culture de cellules et ne peuvent donc pas être obtenus économiquement en quantité suffisante. Un problème particulier des vaccins bactériens ou parasitaires est lié à la grande différence d'expression des antigènes *in vivo* et *in vitro* (restriction de l'expression de certains antigènes dans l'animal infecté et absence d'expression *in vitro* en conditions de culture). Cela empêche évidemment la production d'une masse antigénique suffisante *in vitro*. Enfin, la grande pathogénicité de certains organismes et en particulier les risques zoonotiques et/ou leur diffusion dans l'environnement, imposent souvent des niveaux de confinement très contraignants pour la production industrielle.

De nouvelles technologies vaccinales sont désormais disponibles et permettent de répondre à la plupart des risques et/ou insuffisances décrits en introduction. Parmi les nouvelles opportunités technologiques, les vaccins recombinés vectoriels présentent un intérêt particulier et font l'objet de cette publication.

• NOTION DE VECTEUR VIVANT

Un vecteur est un véhicule qui permet l'introduction d'un gène hétérologue (étranger) dans une cellule et la synthèse (dans cette même cellule) de l'immunogène correspondant. Il peut s'agir soit d'un microorganisme viral ou bactérien, soit d'un plasmide (ADN), c'est-à-dire un élément inerte incapable de se répliquer dans une cellule eucaryote. Si les vecteurs viraux ou bactériens peuvent être classés dans des catégories similaires à celles des vaccins classiques, vivants ou inactivés, les vecteurs plasmidiques correspondent à une nouvelle catégorie vectorielle dans la mesure où ils sont inertes et incapables de répliquer dans les cellules eucaryotes.

Lorsqu'un vecteur viral recombiné infecte une cellule, il induit la synthèse des protéines virales du vecteur mais aussi de l'immunogène vaccinal. Cela conduit à l'activation d'une réponse immunitaire contre certains composants du vecteur mais aussi, et surtout, contre l'immunogène vaccinal. La "néo-synthèse" *in vivo* de l'antigène vaccinal (c'est-à-dire sa production dans une cellule de l'animal vacciné) est essentielle car elle mime la synthèse antigénique associée à une infection naturelle. Cela permet une immunisation avec un antigène dont la structure, et en particulier la maturation post-traductionnelle, est authentique. Cela permet également une forte activation des réponses immunitaires à médiation cellulaire car l'antigène est présenté par les voies MCH-dépendantes appropriées. Par ailleurs, la production de l'antigène vaccinal en l'absence de l'agent pathogène empêche de conférer la maladie à l'animal vacciné.

On distingue les vecteurs viraux réplikatifs des vecteurs viraux non-réplikatifs. Les premiers ont l'avantage d'être plus efficaces pour l'activation des réponses immunes du fait de l'amplification du signal antigénique mais peuvent être limités dans leur utilisation par une pathogénicité résiduelle et/ou un risque de dissémination dans l'environnement. Les seconds sont caractérisés par une meilleure innocuité et une absence de risque de dissémination dans l'environnement. Ils sont, par contre, parfois moins efficaces au plan de l'activation immunitaire car l'antigène est produit de façon plus limitée.

• VECTEURS DE LA FAMILLE DES *POXVIRIDAE*

Les vecteurs de la famille des poxvirus permettent d'obtenir des virus recombinés par un mécanisme de recombinaison homologue qui remplace un fragment (locus) non essentiel du génome viral par une "cassette d'expression", constituée de la séquence codante de l'antigène vaccinal et de différentes séquences régulatrices, nécessaires à l'expression de l'antigène vaccinal dans la cellule hôte.

La famille des poxvirus présente plusieurs propriétés avantageuses pour le développement d'un vecteur vaccinal vivant (PERKUS, TARTAGLIA, PAOLETTI, 1995) :

- un génome de très grande taille avec de nombreux sites non essentiels pouvant servir à insérer une cassette d'expression ;
- une plasticité génomique permettant la construction de virus recombinés multiples exprimant soit plusieurs antigènes d'un même pathogène soit des antigènes de pathogènes différents. Cela permet d'envisager la vaccination contre plusieurs maladies à partir d'un seul virus recombiné ;
- la répllication cytoplasmique des poxvirus élimine tout risque de tumorigenicité par activation oncogénique suite à une insertion chromosomique non contrôlée ;

- les poxvirus sont très stables à température ambiante et permettent de concevoir des vaccins dont la stabilité ne serait plus dépendante de la chaîne du froid.

Le vecteur virus de la vaccine

Le virus de la vaccine est le vaccin qui a permis l'éradication de la variole en 1980. Le premier virus recombiné a été obtenu à partir de la vaccine en 1982. Ce vecteur est le prototype des vecteurs viraux et en particulier des vecteurs viraux répliatifs.

Le vecteur virus de la vaccine présente l'avantage d'être infectieux pour de nombreuses espèces et ceci par différentes voies d'administration, ce qui lui confère un caractère ubiquitaire et permet son utilisation dans différentes espèces. Son infectivité par voie muqueuse permet une immunisation non parentérale et en particulier la vaccination par voie orale.

Le virus de la vaccine étant un vecteur répliatif, son utilisation pose le risque de dissémination par morsure d'un animal vacciné, notamment chez les individus immunodéprimés. Ce problème, couplé à un caractère infectieux pour différentes espèces, réduit les applications à grande échelle et en particulier chez l'homme et/ou chez les animaux domestiques de ce vecteur.

Le vecteur vaccine exprimant la glycoprotéine rabique qui a permis le développement par Merial du vaccin Raboral® s'est cependant avéré très efficace et complètement inoffensif pour la vaccination contre la rage de la faune sauvage. Ce vaccin permet la vaccination antirabique par voie orale (du renard en Europe et du raton laveur en Amérique du Nord) en utilisant des appâts distribués dans la nature. Cette approche vaccinale originale s'est avérée essentielle dans l'efficacité des campagnes d'éradication de la rage en Europe de l'ouest. Son succès est lié au caractère infectieux de la vaccine par voie orale, à sa stabilité dans les conditions d'environnement mais aussi à son caractère inoffensif pour la faune sauvage.

Le vecteur poxvirus du canari

Ce vecteur est issu d'une souche vaccinale destinée à la vaccination du canari contre la variole aviaire. Le poxvirus du canari ("canarypox" en anglais) possède une restriction d'hôte naturelle. *In vitro* il ne se réplique que dans les cellules aviaires alors qu'*in vivo* sa restriction d'hôte est encore plus stricte puisqu'il ne se réplique apparemment que chez son hôte naturel le canari. Bien que le poxvirus du canari ne soit pas capable d'un cycle infectieux complet (répliatif) chez les mammifères, il est cependant en mesure d'infecter de façon abortive (non répliatif) la plupart des mammifères. Cette infection abortive, limitée à la phase précoce du cycle viral, permet cependant la synthèse de l'antigène vaccinal dans l'animal vacciné. Cela est suffisant pour activer le système immunitaire et notamment sa composante cellulaire.

L'absence de répliation dans l'animal vacciné est une garantie de non-diffusion du vaccin dans l'animal vacciné mais aussi de sa non-dissémination. Cette propriété explique l'absence de pathogénicité des recombinés poxvirus du canari et leur parfaite innocuité chez les très jeunes animaux et/ou chez les individus immunodéprimés.

Les vecteurs poxvirus du canari sont utilisables pour la vaccination de différentes espèces vétérinaires. Ce caractère polyvalent est très important car il permet d'établir la notion de plate-forme technologique grâce à laquelle un même système vectoriel peut être appliqué à différents vaccins. Les avantages pratiques et industriels d'une plate-forme vaccinale sont nombreux.

Cependant, le caractère non infectieux du vecteur poxvirus du canari peut, dans certaines circonstances, être une limite de cette technologie. C'est notamment le cas pour l'immunisation par voie muqueuse où une répliation efficace du vecteur est nécessaire pour une activation complète du système immunitaire. Selon l'antigène vaccinal considéré, la dose minimale protectrice avec le vecteur "canarypox" peut parfois être importante et peut poser des problèmes d'innocuité mineure et transitoire dans certaines espèces. Finalement, l'absence de répliation dans les cellules de mammifères *in vitro* nécessite une production virale sur des cellules aviaires primaires. L'absence de lignées établies dans l'espèce aviaire complique la production à grande échelle de ce type de vaccin.

La technologie des poxvirus du canari recombinés a été développée au niveau commercial par Merial et plusieurs produits sont désormais disponibles sur le marché vétérinaire. Il s'agit, aux USA, d'un vaccin de la maladie de Carré du chien (Recombitek® CDV) et d'un vaccin de la rage féline (Purevax™ rabies). Ce dernier correspond au premier vaccin antirabique sans adjuvant et apporte une solution concrète au problème des fibrosarcomes vaccinaux chez le chat. En Europe, un vaccin de la leucose féline (Eurifel® FeLv) et un vaccin de la grippe équine (ProteqFlu™) ont été commercialisés récemment. Ces différents vaccins illustrent les performances et les possibilités des vaccins de nouvelle génération en médecine vétérinaire. D'autres vaccins issus de la même technologie seront commercialisés prochainement et notamment un vaccin équin de la maladie du Nil Occidental (Recombitek® West Nile) aux USA en 2004. La même technologie est actuellement à la base de nombreux essais cliniques chez l'homme pour la vaccination contre le VIH ou le cancer.

• VECTEURS DE LA FAMILLE DES *ADENOVIRIDAE*

L'induction d'une immunité au niveau des épithéliums respiratoires et digestifs est d'un grand intérêt théorique en vaccinologie car elle permettrait de bloquer de nombreux agents pathogènes au niveau de leur porte d'entrée dans l'organisme. Les adénovirus qui présentent un tropisme naturel pour les épithéliums muqueux sont des candidats vecteurs de choix pour l'activation de ce type d'immunité.

Le caractère répliatif du vecteur est un élément important pour l'induction d'une d'immunité locale. On distingue les adénovirus répliatifs et non répliatifs.

En pratique, les vecteurs adénovirus répliatifs ont démontré leur capacité à activer une forte immunité locale chez les animaux séronégatifs mais ont une efficacité beaucoup plus limitée en présence d'une immunité anti adénovirale préexistante (FISCHER *et al.*, 2002). Par ailleurs la difficulté à trouver des sérotypes présentant une innocuité suffisante dans l'espèce cible rend assez délicate la sélection d'un vecteur adénoviral répliatif dénué de pathogénicité. Le virus de l'hépatite de Rubarth (CAV2) est un cas particulier dans la mesure où il existe des souches vaccinales dont l'innocuité est très bien établie chez le chien. L'utilisation du virus CAV2 en tant que vecteur pour la vaccination du chien a fait l'objet de travaux de recherche chez Merial et de bons niveaux de protection ont pu être démontrés chez le chien séronégatif (FISCHER *et al.*, 2002).

Une autre contrainte des vecteurs adénovirus est liée à la rigidité de leur capsid qui limite considérablement la taille des inserts que ces vecteurs peuvent véhiculer.

Les vecteurs adénovirus non répliatifs ont été développés en réponse aux problèmes de pathogénicité résiduelle des vecteurs adénoviraux répliatifs. Ces vecteurs ont été "atténués" par manipulation génétique en éliminant la région E1A du génome viral qui est nécessaire à la répliation du virus. En conséquence, ces virus doivent être produits sur des cellules particulières, dites "trans-complémentantes", capables de compenser fonctionnellement l'absence de région E1A dans le vecteur. Ces conditions de production ont été associées à un risque de recombinaison entre le vecteur et la lignée productrice mais il semble que cette difficulté ait désormais été résolue grâce à des lignées n'ayant aucune communauté de séquences avec le vecteur.

Si les vecteurs adénovirus non répliatifs ont pratiquement résolu le problème de pathogénicité résiduelle et tolèrent des transgènes de plus grande taille, ils demeurent extrêmement sensibles à l'immunité antivecteur préexistante. En pratique, ce défaut réduit considérablement leur efficacité lors d'injections de rappel et les rend inutilisables pour des vaccinations de routine. La plupart des populations humaines possédant des anticorps contre de nombreux sérotypes d'adénovirus (dont les sérotypes hAd2 et hAd5), la perspective d'utiliser les vecteurs dérivés des sérotypes hAd2 et hAd5 à des fins vaccinales a été abandonnée. Le virus hAd35 correspond à un cas particulier car il n'existe pratiquement pas d'immunité préexistante contre ce sérotype dans les populations humaines. Pour cette raison, ce sérotype est encore travaillé à des fins vaccinales (GAO *et al.*, 2003).

Pour une revue sur les vecteurs adénovirus voir BABIUK et TIKOO, 2000.

• LES VECTEURS PLASMIDIQUES OU "ADN"

Le principe de la vaccination par un vecteur plasmidique est très simple. Il s'agit d'un système vectoriel dans lequel le vecteur est un plasmide (molécule d'ADN bicaténaire circulaire et extrachromosomique). L'intégration d'une cassette d'expression portant le transgène d'intérêt vaccinal dans le plasmide s'effectue par des techniques classiques de biologie moléculaire et la production du plasmide recombiné se fait par fermentation bactérienne dans la bactérie *E. coli*. Après lyse de la culture bactérienne, le plasmide est purifié et le plasmide purifié constitue le vaccin. L'injection du plasmide recombiné dans un animal permet la transfection de certaines cellules (dont les cellules présentatrices d'antigène) et dans un second temps l'activation d'une réponse immunitaire.

Cette technologie extrêmement simple possède tous les avantages de base des systèmes vectoriels viraux non répliatifs dont le prototype est le "canarypox". Ces avantages concernent l'innocuité et l'efficacité : absence de répliation dans l'animal vacciné (car le plasmide ne possède pas d'origine de répliation eucaryote), expression dans l'animal d'antigènes authentiques, forte activation des réponses immunitaires à médiation cellulaire et finalement, possibilité de vacciner avec des antigènes rares et/ou difficiles à produire dans une culture microbienne classique. À ces avantages fondamentaux se rajoutent d'importants bénéfices industriels permettant une production à grande échelle, à savoir : un système de production relativement simple, robuste et applicable à tous les vaccins plasmidiques, des outils analytiques simples et fiables qui permettent un contrôle de qualité rapide *in vitro*. Finalement aucune purification de l'antigène n'est nécessaire puisque l'antigène est "néo-synthétisé" par l'animal vacciné lui-même.

À ces avantages communs aux vecteurs vivants non répliatifs, la technologie du vaccin plasmidique ajoute une série d'avantages complémentaires, à savoir :

- l'absence d'immunité contre le vecteur lui-même (l'ADN n'est pas antigénique), ce qui réduit les risques d'interférence lors d'administrations répétées du même vecteur,
- l'expression prolongée de l'antigène recombinant qui explique (mais en partie seulement) une longue persistance des réponses immunitaires,
- l'absence de compétition entre le transgène et le vecteur pour l'activation des réponses immunitaires permettant une réponse ciblée et spécifique de l'antigène vaccinal et,
- dans certains cas, l'activation des réponses immunitaires par des séquences immunostimulatrices (CpG) localisées dans le plasmide lui-même.

Par-delà cette liste d'avantages, la possibilité de produire de grandes quantités de plasmides hautement purifiés en l'absence complète de toute substance d'origine animale est probablement l'avantage fondamental de la technologie du vaccin plasmidique.

Cette propriété garantit l'absence de contamination par un virus ou par un agent pathogène non conventionnel qui pourrait contaminer les cellules (eucaryotes) et/ou certaines matières premières d'origine animales.

La possibilité de vacciner avec un vaccin ADN de très jeunes animaux, même en présence d'une forte immunité maternelle résiduelle, a été démontrée dans plusieurs espèces d'intérêt vétérinaire (FISCHER *et al.*, 2003). Cette propriété fondamentale permet d'entrevoir de nouveaux programmes de vaccination de très jeunes animaux et offre un moyen de réduire ou même d'abolir la classique fenêtre d'opportunité que connaît le pathogène lorsque l'immunité maternelle a fortement décliné et qu'une immunité active n'a pas encore pu être efficacement stimulée par un vaccin classique.

Il faut également souligner que la technologie du vecteur plasmidique permet d'induire de fortes réponses immunitaires cellulaires. Ces réponses sont nécessaires à la protection contre les infections virales, bactériennes ou parasitaires intracellulaires. Grâce aux vecteurs plasmidiques, il est désormais possible d'envisager des traitements efficaces contre de nombreuses pathologies infectieuses intracellulaires, mais aussi contre des pathologies tumorales. Un exemple récent démontre la possibilité d'allonger de façon très significative le temps de survie moyen de chiens atteints de mélanome grâce à une immunothérapie fondée sur la vaccination plasmidique (BERGMAN *et al.*, 2003).

La technologie ADN a été associée à un certain nombre de risques théoriques, à savoir :

- un risque d'induction de tumeurs par insertion chromosomique et activation d'oncogène,

- un risque d'induction d'auto-immunité contre l'ADN chromosomique endogène,
- et un risque de tolérance lié à la persistance de l'expression de l'antigène chez les jeunes animaux.

Plus de 10 années de recul avec des essais cliniques dans de nombreuses espèces et en particulier chez l'homme, ont permis de démontrer que tous ces risques restent théoriques et qu'aucun d'entre eux ne représente un risque réel pour les populations vaccinées.

Pour une revue récente sur les vecteurs plasmidiques, voir SRIVASTAVA et LIU, 2003.

• CONCLUSION

En conclusion, les vaccins (vectoriels) issus des nouvelles technologies offrent de nouvelles perspectives à la vaccinologie vétérinaire et humaine. Leur excellente innocuité couplée à une forte activation des réponses cellulaires permet un meilleur contrôle des pathologies intracellulaires virales, bactériennes ou parasitaires et présente de nouvelles opportunités de traitement en oncologie.

La mise en place de plateformes de technologies vaccinales comme les plateformes vectorielles à "canarypox" ou à vecteur plasmidique qui sont développées chez Merial, permet une réduction des temps et de la complexité des développements industriels et offrent à la communauté médicale une possibilité de réaction plus rapide en cas de pathologie émergente.

BIBLIOGRAPHIE

- BABIUK LA, TIKOO SK (2000) Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J. Biotechnol.*, **83**, 105-113.
- BERGMAN PJ, MCKNIGHT J, NOVOSADA, CHARNEY S, FARRELLY J, CRAFT D, WULDERK M, JEFFERS Y, SADELAIN M, HOHENHAUS AE, SEGAL N, GREGOR P, ENGELHORN M, RIVIERE I, HOUGHTON AN, WOLCHOK JD (2003) Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1284-1290.

- FISCHER L, TRONEL JP, PARDO-DAVID C, TANNER P, COLOMBET G, MINKE J, AUDONNET JC (2002) Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine*, **20**, 3485-3497.
- FISCHER L, BARZU S, ANDREONI C, BUISSON N, BRUN A, AUDONNET JC (2003) DNA vaccination of neonate piglets in the face of maternal immunity induces humoral memory and protection against a virulent pseudorabies virus challenge. *Vaccine*, **21**, 1732-1741.

- GAO W, ROBBINS PD, GAMBOTTO A (2003) Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development. *Gene Ther.*, **10**, 1941-1949.
- PERKUS ME, TARTAGLIA J, PAOLETTI E (1995) Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J. Leukoc. Biol.*, **58**, 1-13.
- SRIVASTAVA IK, LIU MA (2003) Gene vaccines. *Ann. Intern. Med.*, **138**, 550-559.