

Biotechnologies et prévention des maladies animales

par André L. PARODI*

RÉSUMÉ

Depuis des décennies, la prévention des maladies infectieuses repose soit sur la prophylaxie sanitaire, soit sur la prophylaxie médicale. Cette dernière utilise des vaccins vivants atténués ou inertes et des vaccins tués.

L'avènement des méthodes de la biotechnologie a considérablement contribué à améliorer les méthodes d'obtention de certains vaccins. Le génie génétique, par manipulation du génome de l'agent infectieux, a abouti à des vaccins dits recombinants ou délétés, plus sûrs, permettant parfois une distinction entre animaux infectés et animaux vaccinés. En outre, ces organismes recombinants sont producteurs de fractions immunisantes, protéines recombinantes et vaccins sous-unitaires. Enfin, avec la transgénèse, une véritable prophylaxie génétique peut désormais être envisagée.

Il serait cependant excessivement réducteur de limiter les avancées permises par les biotechnologies à ces seules méthodes de préparations. Les biotechnologies ont contribué et contribuent largement à une meilleure compréhension de cette composante essentielle de la vaccination qu'est la réponse immunitaire.

Bien avant l'ère pasteurienne et la connaissance de l'infection par des agents pathogènes vivants, la médecine s'est préoccupée de prévenir certaines maladies transmissibles. L'événement médical qu'a constitué la variolisation d'Edward JENNER, à la fin du XVIII^e siècle, n'était probablement que la résurgence, largement exploitée et diffusée, d'essais bien plus anciens de l'antiquité chinoise et perse.

Très largement ouverte par la découverte des agents infectieux, la prévention des maladies bactériennes et virales a connu, depuis le début du siècle, un essor considérable, tant en médecine de l'homme qu'en médecine vétérinaire, depuis le début du siècle. Elle a abouti à des procédés qui s'inscrivent dans deux grandes stratégies dites *prophylaxie sanitaire* et *prophylaxie médicale*. La première consiste à barrer les voies de dissémination de l'agent infectieux, ou à supprimer sa source, en supprimant ou en isolant l'animal infecté. Largement utilisée en médecine vétérinaire, elle

* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle - 94704 Maisons-Alfort.

repose sur l'identification spécifique du porteur de germes (cf. dans le même numéro : G. JOLIVET. Biotechnologies et méthodes de diagnostic en médecine vétérinaire). La seconde tire partie de l'aptitude des organismes vivants à se protéger spécifiquement d'une infection en développant les mécanismes de la réponse immunitaire ; elle s'appuie sur la préparation et l'administration des vaccins. L'avènement des techniques de la biologie moléculaire est en voie d'améliorer leurs performances et leurs méthodes de préparation. Elle a permis des progrès certains dans la prévention de certaines maladies, notamment en médecine vétérinaire.

En outre, et de manière encore très préliminaire, les biotechnologies pourraient bien être à la base d'une troisième grande voie de la prévention des maladies, que l'on pourrait dénommer *prophylaxie génétique*. Nous développerons de manière synthétique dans cet exposé les apports, déjà exploités ou raisonnablement prévisibles, des biotechnologies dans les méthodes de prophylaxie médicale des maladies animales et évoquerons les perspectives ouvertes par ce qu'il convient d'appeler la prophylaxie génétique.

BIOTECHNOLOGIES ET PROPHYLAXIE MÉDICALE

Classiquement, la prophylaxie médicale repose sur la préparation de vaccins, c'est-à-dire de composés antigéniques à effet immunogène, à partir des espèces ou des souches d'agents pathogènes vis-à-vis desquels on veut obtenir une protection. Ces vaccins ne doivent pas être pathogènes pour l'individu auquel ils sont destinés. Cette innocuité s'obtient par différents procédés qui permettent de classer les vaccins en :

- vaccins vivants ou atténués et
- vaccins inactivés ou inertes.

Traditionnellement, l'atténuation est le résultat de mutations spontanées ou indirectes qui sont le fruit du hasard. Elle nécessite un travail de sélection souvent long et fastidieux, toujours problématique. En outre, la menace d'un certain risque de réversion de la ou des mutations subsiste qui pourrait s'accompagner d'une restauration du pouvoir pathogène.

Les vaccins inactivés sont, traditionnellement, le résultat du traitement de l'agent infectieux, ou de son produit comme une toxine, par des agents inactivants physiques (chaleur...) ou plus généralement chimiques (formaldéhyde, β -propiolactose...). Moins actifs que les précédents, ils nécessitent souvent le recours à des substances adjuvantes.

Dans l'une ou l'autre de ces deux catégories de vaccins, les techniques de la biologie moléculaire ont fourni des procédures originales aboutissant, dans certains cas, à des formes nouvelles (tab. 1).

Ces différentes formes sont des applications de la maîtrise du génie génétique. Celle-ci permet de déterminer la ou les séquences génomiques

Tableau 1
Classification des différents types de vaccins

<i>Vaccins vivants</i>	<ul style="list-style-type: none"> - atténués classiques ; - par délétion de gènes de virulence ; - recombinants.
<i>Vaccins inertes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - classiques ; - sous-unitaires ; - protéines recombinantes ; - peptidiques.

responsables de la production du ou des déterminants protéiques choisis comme immunogènes, de les obtenir par clonage et de leur faire exprimer par un micro-organisme-hôte, ce ou ces antigènes.

A l'inverse, la connaissance des séquences génomiques d'un organisme pathogène, identifiées comme responsables de sa virulence, peuvent être délétées, conduisant ainsi à l'obtention d'organismes vivants, théoriquement non pathogènes et immunogènes.

Quelques exemples empruntés à l'arsenal prophylactique vétérinaire illustrent l'état de réalisation de ces principes.

Vaccins obtenus par recombinaison génétique

La recombinaison génétique est l'aboutissement d'un ensemble de procédés techniques dont la première étape consiste en l'identification puis l'isolement de la ou des séquences d'ADN du génome d'un organisme pathogène qui codent pour la protéine ou la glycoprotéine douée du pouvoir immunogène spécifique de cet agent pathogène.

La deuxième étape ou clonage, consiste à introduire cette ou ces séquences dans le génome d'une cellule-hôte qui peut être une bactérie, une levure, voire une cellule de mammifère cultivée *in vitro*, qui assurera la transcription et l'expression de ces séquences et qui de ce fait produira, sous une forme naturellement pure, cette protéine ou cette glycoprotéine antigénique.

L'aboutissement et l'obtention de protéines recombinantes.

Nombre de vaccins vétérinaires répondant à ce principe sont déjà obtenus et commercialisés. On peut citer les vaccins anti-colibacillaires destinés à protéger les veaux et les porcelets des entérites néonatales à *Escherichia coli* entéro-toxinogènes. La séquence génomique choisie et transfectée est portée par des plasmides du colibacille entéro-pathogène. Elle code pour la fabrication d'un facteur d'attachement permettant à la bactérie de se fixer sur la cellule cible, l'entérocyte. Les anticorps produits par les mères vaccinées avec le vaccin ainsi obtenu empêcheront les

bactéries pathogènes de se fixer sur l'épithélium intestinal de leurs nouveau-nés ayant absorbé ces anticorps avec le colostrum.

Une autre récente application est l'obtention d'un vaccin destiné à protéger le chat contre l'infection contre le virus leucémogène (FeLV) et qui comporte la fraction protéique de la glycoprotéine d'enveloppe virale, responsable de la formation des anticorps neutralisants. Ce dernier exemple est particulièrement illustrant des avantages de ces vaccins recombinants. Ne contenant que la fraction antigénique douée du pouvoir immunogène, ce vaccin est dénué de pouvoir pathogène, à la différence d'autres vaccins anti-FeLV qui pouvaient contenir un autre constituant antigénique du virus, indésirable puisque considéré comme responsable de son pouvoir immunodéficitaire.

Les protéines recombinantes peuvent encore être produites par insertion du gène correspondant dans des virus d'insecte (Baculovirus) qui, après infection de cellules adéquates, induisent la production de quantités importantes de ces protéines, telles que la glycoprotéine gp 50 du virus de la maladie d'Aujeszky.

A leur innocuité ces vaccins associent une certaine commodité de production, une fois obtenu le clone cellulaire-hôte qui peut être facilement multiplié. Pour des agents infectieux hautement pathogènes et doués d'un haut pouvoir de dissémination, ils ajoutent la sécurité des installations de production puisque l'agent pathogène n'est plus présent.

Cet argument vaut tout particulièrement pour les vaccins anti-aphteux, destinés à combattre une maladie dont on connaît l'extrême contagiosité. L'enveloppe du virus de la fièvre aphteuse est constituée de quatre protéines identifiées VP1, VP2, VP3 et VP4. La protéine VP1 étant considérée comme la cible naturelle des anticorps neutralisants, le gène codant pour cette protéine a été cloné dans différents systèmes cellulaires hôtes, bactéries ou levures. Bien qu'inductrice d'anticorps chez le cobaye, la protéine recombinante VP1 ainsi obtenue s'est montrée encore insuffisamment protectrice pour l'animal de destination.

Les vaccins protéiques recombinants sont donc des formes particulières de vaccins inertes obtenues par génie génétique (tab. 1). Les méthodes de la biologie moléculaire permettent en outre, selon le même processus de recombinaison génétique, d'obtenir également des *vaccins vivants recombinants*.

Il s'agit de virus chimères, obtenus par introduction des séquences codant pour le ou les antigènes choisis d'un virus pathogène, dans un autre virus, non pathogène, appelé vecteur, qui servira d'organisme hôte et produira, en se repliquant, la fraction ou les fractions vaccinales choisies.

Une réalisation largement appliquée maintenant de ce principe, est celle du vaccin antirabique obtenu par insertion du gène du virus de la rage codant pour la glycoprotéine protectrice, dans le génome d'un virus de la vaccine. Actif par voie buccale, ce vaccin vivant recombinant est largement

utilisé pour la vaccination est largement utilisé pour la vaccination des renards, sous forme d'appâts disséminés dans les régions d'endémie rabique.

D'autres virus, comme les adénovirus ou les herpèsvirus, peuvent jouer le même rôle de virus vecteurs que la vaccine.

La construction de telles chimères permet, non seulement l'obtention de virus vivants recombinants, mais encore de vaccins recombinants inertes obtenus avec des bactéries ou levures hôtes et en particulier de fractions immunogènes, sous la forme de *vaccins sous-unitaires* ne contenant dans l'exemple du virus rabique que la seule glycoprotéine.

Enfin, l'expérience acquise avec le virus de la vaccine dont la taille du génome permet de le déléter partiellement sans entraver sa capacité de replication, permet déjà de travailler à la mise au point de *vaccins polychimériques, polyvalents*, véhiculant les séquences de plusieurs espèces de virus pathogènes, codant pour les constituants immunogènes de ces virus. Des vaccins porcins associant virus d'Aujeszky et de la peste porcine sont actuellement à l'étude.

Il faut noter que la médecine vétérinaire a pris une avance considérable sur la médecine de l'homme dans le domaine de la prophylaxie médicale des maladies infectieuses par utilisation des méthodes de la biologie moléculaire. Sur la centaine de protéines recombinantes actuellement disponibles, un seul vaccin humain, celui contre l'hépatite B, a connu un développement industriel. D'autre part, les risques toujours possibles d'une réversion virulente font reculer l'utilisation du virus de la vaccine comme vecteur de vaccins viraux recombinants vivants. Un grave incident survenu au cours d'essais de vaccination contre le virus du SIDA en a été récemment la tragique illustration.

Vaccins délétés

La connaissance de véritables gènes de virulence portés par le génome de certains virus est à l'origine d'un autre procédé biotechnologique d'obtention de vaccins. L'excision ou délétion de cette séquence conduit à l'obtention de souches non pathogènes, vaccinantes.

L'application industrielle la plus large de ce principe est celle de plusieurs vaccins contre la maladie d'Aujeszky du porc. D'abord obtenue par procédé chimique, la délétion du gène codant pour la thymidine-kinase (TK) s'accompagne de l'inactivation du pouvoir pathogène (souche MK 25). Cette délétion est maintenant obtenue par génie génétique, conduisant à l'obtention de vaccins vivants parfaitement sûrs puisque la réversion semble impossible en raison de la taille de la délétion. Raffinement supplémentaire, le même processus d'excision permet de déléter, en outre, une glycoprotéine sans effet sur le pouvoir immunogène (gI-, gX-) mais dont l'absence sera retrouvée chez l'animal vacciné qui n'aura pas produit l'anticorps spécifique. Cette lacune dans la réponse immunitaire permettra

de distinguer, par examen sérologique, les animaux ayant été vaccinés par ces vaccins délévés, des porteurs sains de virus sauvage qui eux auront des anticorps contre tous les déterminants antigéniques du virus.

Les différents procédés biotechnologiques ayant abouti aux applications citées précédemment, ont considérablement amélioré la qualité et surtout la sécurité de la fabrication et de l'utilisation des vaccins. Ceux-ci entrent néanmoins dans les schémas classiques de la prophylaxie médicale. La biologie moléculaire permet, au-delà de ces applications, d'ouvrir d'autres voies de la prévention. Encore du domaine du laboratoire, elles nécessitent néanmoins d'être esquissées car elles établissent les bases d'une prophylaxie génétique.

PROPHYLAXIE GÉNÉTIQUE

Il s'agit de la prévention des effets de la multiplication d'agents infectieux par des procédés visant soit à rendre les individus génétiquement résistants, soit encore à détruire les sites de replication potentiels du virus pathogène chez l'individu sensible. Ces deux procédés peuvent être dénommés respectivement par transgénèse et interférence virale et par cytotoxicité conditionnelle.

Transgénèse et interférence virale

On décrit sous le nom d'interférence virale le phénomène de résistance à l'infection par une espèce virale qu'oppose une cellule préalablement infectée par un virus de la même espèce. Elle est bien connue pour de nombreuses infections à Rétrovirus, de la souris et de la poule notamment, et peut se concevoir dans d'autres systèmes. On sait l'établir par l'injection à un individu sensible, de virus mutants ou recombinants, non pathogènes, qui protègent cet individu de la surinfection par la souche sauvage. En effet, ces virus expriment une glycoprotéine virale qui, en bloquant les récepteurs cellulaires spécifiques, les rend non disponibles pour le virus homologue pathogène.

Si l'on combine l'induction de l'interférence virale au processus biotechnologique de transgénèse germinale qui consiste à intégrer un fragment d'ADN viral au génome de la cellule germinale de manière à obtenir un individu dont toutes les cellules seront porteuses de cet acide nucléique étranger codant pour une glycoprotéine virale, on aura obtenu un individu transgénétique naturellement résistant. La descendance de cet individu sera elle-même naturellement protégée.

Pour séduisant que soit ce modèle dont la réalisation a commencé *in vitro*, avec le virus de la leucémie bovine (BLV), il faut être conscient de facteurs limitants liés, en particulier, aux difficultés encore non entièrement résolues que pose la transgénèse germinale dans les espèces de rente, à leur coût d'obtention (2 500 000 F pour un bovin) ainsi qu'aux

inconnues qui subsistent sur le niveau d'expression du transgène. Une autre approche, relevant dans ses grandes lignes du même mécanisme, consiste en la production d'animaux transgéniques, synthétisant dans toutes leurs cellules un ARN antisens, c'est-à-dire qui s'opposera à la traduction des ARN viraux. Une telle approche a d'ores et déjà permis la production de plantes résistantes à certaines maladies virales.

Cytotoxicité conditionnelle

Ce procédé repose sur l'obtention d'un système d'induction de la lyse des cellules cibles dans le cas d'une infection virale, empêchant ainsi la replication virale; il représente plus une méthode thérapeutique virale que prophylactique de certaines infections.

Ainsi on peut imaginer d'infecter les cellules d'un individu par un virus non pathogène porteur du gène d'un médicament cytotoxique, qui ne sera synthétisé qu'en présence du virus pathogène. L'expression de ce médicament détruirait les cellules infectées par le virus pathogène. Une telle construction, correspondant à l'incorporation de la TK d'un herpès virus dans un adénovirus a été décrite. L'expression de la TK est conditionnée par la présence du virus du SIDA dans les cellules. L'administration au malade d'Acyclovir (ND), agent cytotoxique quand il est phosphorylé par la TK, permettrait la destruction sélective des cellules infectées par le virus du SIDA.

On conçoit aisément combien la généralisation d'une telle procédure de traitement est encore éloignée et, dans l'hypothèse, qu'elle ne serait limitée qu'à des situations par ailleurs sans autres solutions.

Tels sont les champs d'applications des biotechnologies en matière de prévention des maladies infectieuses des animaux et les perspectives que l'on peut, aujourd'hui, leur prévoir.

Analyser l'évolution de la prévention et échauffaudez de nouvelles stratégies, notamment dans le domaine de la vaccination, par ce seul accès, serait notoirement incomplet. Ce serait, en particulier, singulièrement négliger cette composante essentielle de la prévention qu'est la réponse immunitaire elle-même, avec ses multiples facettes cellulaires et humorales. L'un des obstacles à la réussite d'une vaccination est souvent l'impossibilité de maintenir de manière prolongée un bon niveau d'activation des populations lymphocytaires. C'est ainsi que l'introduction dans un organisme de vecteurs microbiens, bactériens ou virus, porteurs de gènes recombinants, a aussi pour effet, par la multiplication de ces vecteurs, de maintenir une stimulation antigénique génératrice d'une activation de l'ensemble des médiateurs, des cytokines notamment.

N'aborder les perspectives nouvelles et les développements futurs de la prévention que par le seul domaine du génie génétique serait ainsi singulièrement réducteur. En fait, c'est parce qu'elle contribue à apporter des éclairages nouveaux dans la compréhension des mécanismes spécifiques et

non spécifiques de la défense de l'organisme, que la biologie moléculaire demeure la voie obligée des progrès dans ce domaine. C'est davantage l'ensemble des méthodes de l'analyse et de la compréhension des mécanismes qu'elle offre, que le catalogue des procédés qu'il faut savoir intégrer à cette problématique particulière de la médecine vétérinaire qu'est la prévention des maladies infectieuses.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie vivement le Dr M. ELOIT, Maître-Assistant agrégé à l'ENV d'Alfort qui a aimablement accepté de relire le manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

(limitée aux revues de synthèse récentes)

- ARNON (R.) et SELA (M.). – Les antigènes et vaccins synthétiques. *La Recherche*, 1983, 74, 346-357.
- CAPRON (A.) et AMEISSEN (J.C.). – Les nouvelles stratégies de la vaccination. *La Recherche*, 1991, suppl. n° 237, 36-44.
- DAVIES (J.E.). – Genetic engineering and vaccines. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.*, 1985, 136 D, 143-450.
- DESMETTRE (Ph.). – Apport des nouvelles biotechnologies à la production des vaccins vétérinaires. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1987, 60, 293-303.
- GILBERT (W.) et VILLA-KOMAROFF (L.). – Des bactéries recombinantes pour fabriquer des protéines utiles. *Pour la Science*, 1980, 2, 82-94.
- LERNER (R.). – Les vaccins de synthèse. *Pour la Science*, 1983, 5, 72-84.
- SEASON (A.). – Les vaccins modernes. *La Recherche*, 1986, 17, 720-729.
- TOLTOSHEV (P.) et LECOCQ (J.P.). – Génie génétique et industries biomédicales. *La Recherche*, 1984, 15, 630-641.
-