

M. ELOIT

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
URA Génétique Moléculaire et Cellulaire,
7 avenue du Général De Gaulle,
94704 Maisons-Alfort Cedex

Vaccins traditionnels et vaccins recombinants

La connaissance des bases moléculaires de la virulence et du caractère immunogène a permis un progrès considérable dans la mise au point de vaccins. Ainsi, par exemple, on peut séparer les fractions de protéine (= antigènes) induisant la réponse immunitaire du reste du microorganisme pathogène et n'utiliser que ces fractions antigéniques dans la fabrication du vaccin. Cet article présente les différents types possibles de vaccins et leurs utilisations respectives.

Le principe de la vaccination consiste à administrer à un être vivant un principe actif capable d'induire une immunité spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène, ainsi qu'une mémoire immunitaire susceptible d'amplifier plus rapidement la réponse immune qu'après primo-infection.

Les performances et donc en conséquence les objectifs de la vaccination des animaux sont variables en fonction de la nature des maladies visées. Ainsi, la vaccination est de loin la méthode de lutte la plus efficace contre des maladies infectieuses aiguës qui bénéficient d'une réponse immune post-infectieuse stérilisante. En effet, il est une règle

générale, rarement démentie par les faits expérimentaux, qui considère que l'immunité induite par la vaccination ne peut être supérieure à celle d'un animal guéri après infection naturelle. Toutefois, de rares animaux peuvent développer un portage chronique généralement de courte durée (exemple : fièvre aphteuse). Dans ces cas, la vaccination peut permettre une baisse de l'incidence et de la prévalence de l'infection (et donc de la maladie). Au contraire, la vaccination est habituellement moins efficace contre les agents pathogènes capables de développer des infections persistantes chez l'hôte, du fait qu'ils possèdent des mécanismes d'échappement à la réponse immune (herpesvirus, lentivirus, pestivirus, brucelles...). Pour ces infections, il est généralement possible d'obtenir au travers de la vaccination une défense contre les symptômes de la maladie (baisse de la prévalence des cas cliniques) alors que l'efficacité sur la circulation de l'agent pathogène (incidence de l'infection) est habituellement plus limitée.

Les modalités d'obtention des vaccins ont connu une évolution importante au cours des dix dernières années. Ces modifications découlent directement des améliorations des connaissances sur la structure et la fonction des constituants des microorganismes et sur l'analyse fine de la réponse immune anti-infectieuse. Ces connaissances ont pu être obtenues par l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire dans les laboratoires et par l'extraordinaire pouvoir analytique de ces méthodes. C'est sans doute dans le développement de vaccins viraux que ces méthodes ont pour l'instant connu les plus grands développements, raison pour laquelle les infections virales représenteront une part importante des exemples que nous choisirons.

Résumé

Différents types de vaccins sont actuellement disponibles ou en cours de développement. Ils peuvent être divisés en deux catégories : vaccins vivants et vaccins inertes. Les vaccins vivants traditionnels incluent des souches atténuées par des moyens conventionnels, comme la croissance dans des conditions de culture inhabituelles (bactéries), ou dans des cellules ou des animaux vis-à-vis desquels les souches ne sont pas initialement adaptées (virus). Les nouvelles générations de vaccins vivants utilisant les techniques de recombinaison génétique (vaccins recombinants) peuvent être fabriquées par mutagenèse dirigée de gènes de virulence, ou par clonage de gènes de protéines immunogènes dans des vecteurs viraux ou bactériens qui possèdent les propriétés souhaitées d'innocuité et d'efficacité. Les vaccins inactivés conventionnels sont fabriqués par traitement des microorganismes par des agents physiques ou chimiques. Dans la mesure où les fractions immunogènes des microorganismes sont de mieux en mieux connues, elles peuvent être utilisées pour fabriquer des vaccins ne comprenant que ces fractions immunogènes majeures (vaccin subunitaires) par purification, ou par expression *in vitro* de protéines (un autre type de vaccin recombinant) ou enfin synthèse chimique de peptides. Récemment, il a été démontré, chez différentes espèces, que l'inoculation directe dans le muscle d'un gène codant pour une protéine immunogène (immunisation génétique) permettait d'induire une réponse immune cellulaire et humorale. Cette méthode correspond à un dernier type de vaccin recombinant. L'immunité systémique et muqueuse obtenue après injection de vaccin vivant est comparée à celle obtenue après injection de vaccin inerte.

1 / Vaccins recombinants et vaccins conventionnels

Différentes catégories de vaccins sont disponibles. La classification présentée ici est classique (vaccins vivants et inertes, ainsi que leurs sous-catégories respectives). Elle a le mérite, comme toute classification opérationnelle, de regrouper des vaccins de propriétés communes. Néanmoins, s'appuyant sur le produit final plutôt que sur la logique de sa conception, elle risque de ne pas renseigner le lecteur sur les lignes de force contemporaines en matière de vaccinologie et, surtout, de ne pas permettre de mettre les travaux actuels en perspective. C'est pourquoi nous présenterons en introduction les différentes stratégies d'obtention d'un vaccin.

1.1 / L'apport des biotechnologies à la définition des vaccins

Depuis les travaux de Jenner et de Pasteur, le principe de la vaccination que nous avons rappelé est toujours resté le même. Les modalités initiales d'obtention des vaccins sont longtemps restées comparables dans leur principe : administrer à l'individu un agent pathogène entier, soit tué (vaccin inactivé), soit atténué par différentes techniques dont le résultat était difficilement prévisible. Les avancées actuelles reposent sur plusieurs causes communes dont nous retiendrons celles qui nous paraissent majeures :

- des progrès techniques : la découverte des techniques d'identification et de clonage de gènes ainsi que celle des anticorps monoclonaux, spécifiques non plus d'un agent pathogène mais d'une portion d'une seule protéine d'un microorganisme ;

- des progrès scientifiques, qui découlent en large partie de ces progrès techniques : la connaissance des mécanismes de multiplication des agents pathogènes et du déterminisme de leur virulence, l'étude des antigènes importants dans la réponse immune et, enfin, de manière paradoxalement plus limitée compte tenu des immenses progrès qu'a connus cette discipline en une vingtaine d'années, la progression dans les connaissances en immunologie.

En conséquence, deux voies principales sont actuellement utilisées, en complément plutôt qu'en remplacement des approches traditionnelles :

- la première consiste en une délétion de certains gènes impliqués dans la virulence des micro-organismes de manière à isoler des souches vivantes atténuées de manière raisonnée. Cette voie est peu utilisée ;

- la seconde, plus fréquemment utilisée, ne retient de l'agent pathogène qu'une fraction (ou quelques rares fractions) immunogène(s) de celui-ci, préalablement identifiée(s) comme majeure(s).

Habituellement, les immunogènes viraux majeurs correspondent à des (glyco)protéines

de structure, de capsid (composant interne des virus) ou d'enveloppe, mais certaines protéines non structurales, exprimées précocement au cours du cycle, pourraient également être des immunogènes potentiels (Selvakumar *et al* 1995). Les immunogènes bactériens sont multiples : peptidoglycanes de la paroi des bactéries Gram+ et polysaccharides de la paroi des bactéries Gram-, polysaccharides de la capsule (antigène K), protéines de pili et de flagelles (antigènes H), exotoxines bactériennes. A partir de cette approche, différents types de vaccin se déclinent en fonction du mode de présentation de ces immunogènes au système immunitaire : 1) vaccins inertes quand ces antigènes sont purifiés, produits *in vitro* par des techniques de génie génétique, ou que des sous-fractions d'entre eux sont chimiquement synthétisées ; 2) vaccins vivants quand le gène de protéines immunogéniques est introduit dans d'autres microorganismes capables de se répliquer (vecteurs) qui seront administrés à l'animal ; 3) vaccins de nature intermédiaire quand ce sont les gènes de ces protéines immunogènes qui sont délivrés à l'animal, soit par l'intermédiaire de vecteurs viraux incapables de se multiplier, soit sous forme d'ADN nu : ces vaccins sont inertes au sens où ils ne se multiplient pas chez l'hôte mais présentent l'antigène au système immunitaire de manière proche de celle des vaccins vivants.

1.2 / Des vaccins traditionnels aux vaccins recombinants

Nous retiendrons donc une classification des différents types de vaccin en vaccins vivants (utilisant une souche capable de se multiplier au moins *in vitro*) et en vaccins inertes (incapables de se répliquer) (cf. revue générale de McGhee et Kiyono 1993). Les vaccins recombinants sont obtenus par des techniques de clonage moléculaire du génome des microorganismes, de manière à obtenir un principe actif ayant une efficacité vaccinale. Comme nous le verrons, ils peuvent appartenir à plusieurs des catégories suivantes.

a / Vaccins vivants

Les vaccins vivants peuvent être classés en vaccins atténués, c'est-à-dire incluant une souche de l'agent pathogène ou d'un agent infectieux proche possédant un pouvoir pathogène faible ou nul pour l'espèce de destination, et en vaccins vectorisés, c'est-à-dire incluant un agent infectieux non pathogène (vecteur) dont le génome a été modifié afin d'inclure un ou plusieurs gènes codant pour des protéines immunogènes de l'agent pathogène cible.

Les souches atténuées

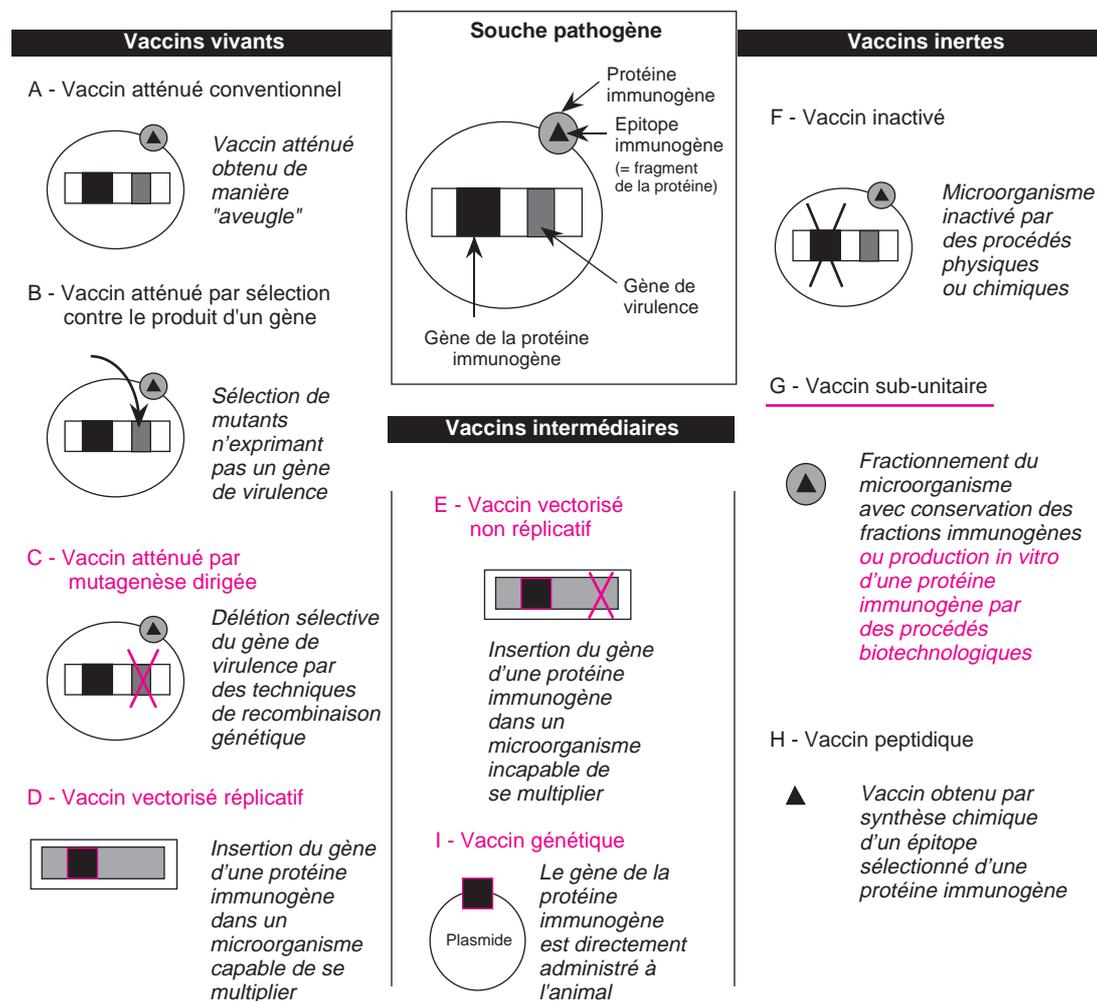
Les souches atténuées utilisées pour fabriquer des vaccins vivants peuvent provenir de plusieurs origines.

- Spontanément avirulentes (figure 1, A)

Certaines souches isolées du terrain sont spontanément avirulentes, en particulier pour

Certains vaccins vivants sont constitués de pathogènes que l'on a atténués en supprimant leurs gènes de virulence.

Figure 1. Classification des vaccins conventionnels et recombinants. Les différents types de vaccins recombinants sont en rouge.



une autre espèce cible. Historiquement, dès 1798, Jenner a pu vacciner l'homme contre la variole en utilisant le virus du cowpox des bovins. De la même façon, l'herpesvirus du dindon permet de vacciner les volailles contre la maladie de Marek ; le poxvirus du fibrome de Shope est utilisé pour vacciner le lapin contre la myxomatose.

- Par des moyens conventionnels (figure 1, A)

Le principe de sélection de souches virales atténuées est d'isoler parmi une population virale initiale un clone de virulence atténuée. Au besoin, une procédure de mutagenèse à l'aide de différents agents mutagènes est parfois réalisée sur la population initiale afin d'augmenter le nombre de variants présents et de faciliter la sélection d'un variant approprié. La sélection de variants non pathogènes est réalisée par différentes techniques : passage multiples en culture cellulaire, passages sur espèce animale différente de l'espèce cible, multiplication à température inférieure à 37 °C permettant d'obtenir des souches dites thermosensibles, incapables de se multiplier à une température corporelle normale... Il est important de comprendre que ces procédures sont aveugles et que, dans l'hypothèse où une souche vaccinale potentielle est obtenue, la

raison de son atténuation est habituellement inconnue. Il est néanmoins parfois possible d'obtenir des mutants préalablement choisis (figure 1, B) : ainsi la multiplication de souches virales en présence d'un anticorps monoclonal contre une protéine peut permettre d'obtenir un mutant de délétion spécifique ; la croissance en milieu sélectif conduit à l'obtention de mutants déficients pour le gène de la thymidine kinase, de virulence atténuée (herpesvirus, poxvirus). Dans la mesure où les modifications génomiques à l'origine de l'atténuation sont le plus souvent inconnues, il est impossible de prévoir la stabilité de l'atténuation et les risques de recombinaison avec les souches sauvages. En effet, la modification d'une seule base ou la délétion d'un gène entier peuvent se traduire exactement par le même phénotype, alors que la stabilité de ces modifications est à l'évidence très différente. Bien évidemment, différents essais sont conduits par les fabricants, en conformité avec les normes actuelles d'enregistrement, pour vérifier la stabilité de l'atténuation : néanmoins, ces essais ne peuvent être conduits qu'à une échelle limitée et ne permettent pas d'éviter tout risque. Seule l'utilisation à large échelle d'une souche vivante

sur le terrain permet *a posteriori* de confirmer son innocuité.

Enfin, on doit ajouter que cette procédure ne permet pas toujours d'obtenir des souches atténuées. Ainsi, aucune souche vaccinale de virus de la fièvre aphteuse satisfaisant aux critères d'efficacité et d'innocuité n'a pu être isolée.

Les souches bactériennes atténuées, plus rares, sont obtenues par croissance dans des milieux appauvris ou dans des conditions telles qu'elles perdent certaines de leur caractéristiques (BCG, *B. anthracis*, *P. multocida*...).

Malgré ces inconvénients, cette méthodologie conventionnelle a prouvé son efficacité et la quasi-totalité des souches vivantes actuellement utilisées en dérivent.

- Par délétion de gènes (figure 1, C)

Il s'agit là d'un premier type de vaccin recombinant. L'étude de l'interaction des microorganismes avec leur hôte permet d'identifier les protéines et les gènes correspondants qui jouent un rôle important dans la virulence d'un agent pathogène. Souvent le déterminisme de cette virulence est multigénique. La délétion de ces gènes de virulence permet de réaliser de manière raisonnée l'atténuation de souches vaccinales. Par exemple, au moins quatre gènes sont impliqués dans la neurovirulence de l'herpesvirus de la maladie d'Aujeszky, et la délétion ou la modification de certains d'entre eux (thymidine kinase, gE, gC, gI) permet d'abolir la virulence des souches pour le porc. L'herpesvirus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), très proche de ce dernier, a bénéficié du même type de travail pour isoler des souches atténuées.

Par ailleurs la vaccination à l'aide de souches atténuées par délétion de gènes permet de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés. La mise en évidence d'anticorps contre la protéine absente de la souche vaccinale indique alors qu'il y a eu infection. C'est le cas de la protéine gE (initialement appelée gI) des deux herpesvirus de la maladie d'Aujeszky (Van Oirschot *et al* 1990) et de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Néanmoins, paradoxalement, ce sont surtout des souches sélectionnées sur ce critère et dont le gène est naturellement délété qui sont actuellement utilisées.

Ces procédures de délétion de gènes n'ont de limites théoriques que celles résultant de la connaissance des agents pathogènes et pourraient permettre de voir émerger de nouveaux concepts. Ainsi, la protéine gD du virus de la maladie d'Aujeszky est nécessaire à l'infection de cellules par le virus à partir du milieu extracellulaire, mais facultative pour le passage du virus de cellule à cellule. Un virus dont le génome ne contient plus le gène gD, mais dont l'enveloppe contient la glycoprotéine gD en raison de sa multiplication sur une lignée cellulaire exprimant gD, est capable de se répliquer chez l'hôte (par passage direct de cellule à cellule) mais est incapable après excrétion d'infecter un nouvel hôte. En effet les virions de seconde génération n'expriment

pas gD. Il s'agit là de la première démonstration de souches virales vivantes, capables de se multiplier chez l'hôte, mais non diffusibles par construction (Peeters *et al* 1994).

Les vaccins vectorisés

Les techniques de la biologie moléculaire n'ont pas seulement permis d'identifier certains gènes de virulence. Elles ont aussi conduit à identifier les protéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée. En effet, si la plupart des protéines d'un agent pathogène peuvent être reconnues par le système immunitaire, la réponse immune contre un petit nombre d'entre elles (voire une seule) peut permettre une protection complète. Le gène de cette ou de ces protéines, voire une séquence génique codant pour une petite fraction de cette protéine, peut alors être transféré dans un autre microorganisme (virus ou bactérie), appelé vecteur, possédant des caractéristiques adéquates de sécurité et d'efficacité par la voie d'administration retenue. Ce microorganisme va, après administration à l'hôte, induire une réponse immune contre cette protéine étrangère. Cette approche correspond à un deuxième type de vaccin recombinant.

- Vecteurs répliatifs (figure 1, D)

L'approche initiale de cette stratégie a été de produire des vecteurs capables de se répliquer chez l'hôte en dépit de l'insertion du gène étranger dans leur génome. Ainsi le virus de la vaccine ou ses dérivés, ceux-là mêmes qui avaient permis la vaccination de l'homme contre la variole, ont été utilisés avec succès. D'autres virus (adénovirus, herpesvirus) ou bactéries (colibacilles, salmonelles, bacille du BCG) ont également fait l'objet d'études. Dans certains cas, il a été possible d'obtenir une protection par insertion d'une séquence codant uniquement pour quelques acides aminés d'une protéine immunogène (Castrucci *et al* 1994). La réussite probablement la plus démonstrative de cette approche a été la construction d'un virus de la vaccine porteur du gène de la glycoprotéine G du virus rabique, capable de vacciner le renard contre la rage par voie orale (Brochier *et al* 1991). Ce vaccin est le premier et pour l'instant le seul vaccin utilisant un vecteur viral à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché de la part des autorités européennes.

Un autre exemple montre que les catégories que nous avons définies ne sont pas figées. Ainsi nos collègues hollandais ont développé un vecteur viral basé sur le virus de la maladie d'Aujeszky, dans lequel ils ont inséré un gène d'une protéine immunogène du virus de la Peste Porcine Classique. Ce virus recombinant permet la vaccination simultanée contre la maladie d'Aujeszky et contre la Peste Porcine Classique. Il s'agit donc d'une souche de conception mixte, atténuée pour le virus de la maladie d'Aujeszky et vectorisée pour celui de la Peste Porcine Classique (van Zijl *et al* 1991).

- Vecteurs non répliatifs (figure 1, E)

La construction de virus répliatifs, pour séduisante qu'elle soit en terme d'efficacité,

Un vaccin vectorisé est constitué d'un support, par exemple un microorganisme non pathogène, dans lequel on a intégré le gène de la protéine immunogène.

peut poser des problèmes de biosécurité. En effet, il n'est pas souhaitable que des virus recombinants puissent diffuser d'animal à animal. Il a donc été imaginé d'utiliser des virus qui, naturellement ou par délétion de gènes essentiels, soient incapables de se multiplier chez l'animal. Ainsi le virus du canary-pox est un virus aviaire incapable de se multiplier chez les mammifères. L'adénovirus type 5 dont on enlève certains gènes essentiels (E1) est capable de se multiplier dans des cellules manipulées de manière à ce qu'elles expriment le gène E1, mais est incapable de se multiplier dans des cellules normales ou chez l'animal. Lorsqu'un gène est inséré dans le génome de ces virus, ce gène est introduit dans les cellules après infection et la protéine est fabriquée. Pourtant, le virus est incapable d'effectuer certains des stades postérieurs au stade de pénétration intracellulaire et ne se réplique donc pas. Les virus sont alors utilisés comme des seringues moléculaires (Eloit et Adam 1995). Cette stratégie est tout à fait comparable aux essais actuels de thérapie génique, dans lesquels un gène est introduit *in vivo* dans des cellules cibles par l'intermédiaire de vecteurs viraux. Ce sont d'ailleurs les mêmes vecteurs qui sont utilisés.

Cette approche est satisfaisante au plan de la biosécurité. Une de ses limites est qu'elle nécessitait initialement des concentrations élevées de virus pour être efficace. Néanmoins, de grands progrès ont été réalisés et les doses efficaces peuvent être désormais inférieures à celles de vaccins inactivés conventionnels.

b / Vaccins inertes

Les agents des vaccins inertes sont totalement incapables de se multiplier, aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Les vaccins inactivés (figure 1, F)

Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur) ou surtout, actuellement, chimique (formol, bêta-propiolactone, éthylèneimine...) qui entraîne une perte totale d'infectivité sans dénaturer le pouvoir immunogène. De manière à obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une masse importante d'agent pathogène et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé que les vaccins à souche vivante modifiée.

Ces vaccins sont habituellement très sûrs dans la mesure où les procédures d'inactivation mises en place par les firmes sont désormais correctement définies, mises en œuvre et contrôlées, après quelques rares accidents dans le passé. Le risque associé à ces vaccins ressort plutôt de réactions locales, liées en particulier à la présence d'adjuvants.

Les fractions antigéniques

Nous avons vu précédemment que les connaissances actuelles sur les agents pathogènes pouvaient conduire à identifier des protéines cibles principales de la réponse immune de l'hôte. Ces informations peuvent permettre de développer des vaccins vectori-

sés mais aussi des vaccins inertes subunitaires, constitués uniquement de ces antigènes, soit purifiés à partir de l'agent pathogène, soit produites *in vitro* par les techniques du génie génétique.

- Antigènes purifiés (figure 1, G)

Différents vaccins dirigés contre des herpesvirus (rhinotrachéite infectieuse bovine, maladie d'Aujeszky, coryza du chat) ou contre la grippe contiennent actuellement uniquement certaines protéines de l'enveloppe virale. Cette approche permet de limiter la part de protéines non nécessaires dans un vaccin et peut limiter le nombre de réactions non désirables, comme celles liées aux protéines internes au virus (herpesvirus) ou au substrat de culture (protéines d'œuf pour les vaccins grippaux). Il en est de même de vaccins bactériens produits à partir d'exotoxines inactivées (anatoxines : tétanos...).

- Protéines produites par génie génétique (figure 1, G)

Il peut être impossible, ou simplement difficile et coûteux, d'obtenir certaines protéines de microorganismes par purification. Ceci peut être lié à une impossibilité de culture de l'agent pathogène ou à des rendements insuffisants. Dans le cas de protéines, une alternative peut être d'exprimer le gène correspondant dans des systèmes *in vitro* adéquats, correspondant à un troisième type de vaccin recombinant. Ainsi, un vaccin contre la leucose féline est actuellement fabriqué par expression d'une protéine d'enveloppe dans des bactéries (colibacilles). Les vaccins contre l'hépatite B humaine sont actuellement produits par expression d'un antigène dans des cellules de levure. Il existe également des systèmes de virus (baculovirus) et de cellules d'insectes qui permettent également de produire des protéines étrangères par infection de cellules avec un virus porteur du gène d'intérêt. Tous ces systèmes (colibacilles, cellules de mammifères, cellules d'insectes, levures...) ne sont pas équivalents : s'ils sont tous capables de fabriquer le squelette de la protéine (c'est-à-dire la chaîne polypeptidique), certains sont incapables de réaliser certaines modifications de cette chaîne. Par exemple les colibacilles ne peuvent pas ajouter les résidus sucrés des glycoprotéines, contre lesquels la réponse immune est souvent dirigée.

- Peptides de synthèse

L'aboutissement ultime de la démarche réductionniste qui consiste à définir de plus en plus finement les cibles de la réponse immune, et donc les constituants nécessaires d'un vaccin, est représenté par les vaccins peptidiques. Nous avons vu en effet que la réponse immune de l'hôte était surtout dirigée contre certaines protéines de l'agent pathogène. Cette réponse n'est pas dirigée contre toute la protéine mais surtout contre de petits fragments appelés épitopes, correspondant à quelques acides aminés (c'est-à-dire un peptide). Certains épitopes sont dits conformationnels, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas reconnus s'ils adoptent une conformation spatiale différente de celle qu'ils ont dans la protéine

La fraction immunogène peut être utilisée comme vaccin : elle est soit isolée à partir du pathogène, soit produite par génie génétique.

native. D'autres, au contraire, sont dits linéaires parce qu'ils sont reconnus par le système immunitaire même si leur structure dans l'espace est modifiée. Cette dernière catégorie d'épitope est synthétisable, par simple synthèse chimique du peptide correspondant. De manière à obtenir une immunogénicité correcte, ces peptides doivent le plus souvent être couplés après synthèse à une protéine porteuse (comme l'ovalbumine) et être adjuvés. De tels peptides ont pu être utilisés avec succès pour vacciner les bovins contre certains sérotypes du virus de la fièvre aphteuse (Doel *et al* 1990) ou le chien contre la parvovirose canine (Langeveld *et al* 1994). Néanmoins cette approche n'a pour l'instant pas débouché sur un vaccin commercialisé.

Un commentaire général sur les vaccins constitués de protéines produites par génie génétique ou de peptides est leur grande innocuité, puisqu'à aucun moment l'agent pathogène ou un agent infectieux n'est utilisé pour la fabrication du vaccin. Cette sécurité limite également les risques de contamination du personnel pour les zoonoses et les risques d'échappement des sites de production pour les agents très diffusibles comme les virus aphteux.

L'immunisation génétique

Nous avons vu que des vecteurs viraux non réplicatifs permettaient d'introduire le gène d'une protéine immunogène dans des cellules *in vivo* et de susciter le développement d'une réponse immune. Plus récemment, il a été démontré dans de nombreuses espèces mammifères et aviaires que la simple inoculation intramusculaire du gène (c'est-à-dire de l'ADN nu) permettait d'obtenir les mêmes résultats, bien qu'avec une efficacité plus faible, nécessitant plusieurs injections (Ulmer *et al* 1993). Ce type de vaccin correspond à un quatrième type de vaccin recombinant. Pour l'instant, seule la voie musculaire se révèle efficace dans ces conditions, mais de nouvelles approches modifient cette notion : utilisation de microparticules de taille infracellulaire couvertes de l'ADN du gène et propulsées par voie transdermique sous l'action d'un pistolet électrique ou à helium (« gene gun »), incorporation du gène dans des liposomes... (revue de Davis et Whalen 1995). De nombreux laboratoires utilisent actuellement cette approche, sans qu'un vaccin commercialisé ni que des éléments convergents de comparaison avec des vaccins obtenus par d'autres stratégies soient actuellement disponibles.

2 / La réponse immune post-vaccinale : immunité générale et immunité muqueuse

2.1 / Les effecteurs de la réponse immune

a / Réponse antivirale

Deux effecteurs principaux (anticorps et lymphocytes T cytotoxiques) permettent de lutter contre l'infection virale en agissant soit

sur le virus extracellulaire, soit sur les cellules infectées.

Le virus extracellulaire peut être neutralisé par des anticorps reconnaissant certains épitopes particuliers (anticorps neutralisants). Ceux-ci peuvent agir de différentes manières : attachement à des protéines nécessaires à la fixation ou à la pénétration dans les cellules, déformation de la capsid. Ce virus extracellulaire peut également être recouvert par des anticorps et alors phagocyté par des cellules mononucléées. S'il s'agit d'un virus enveloppé, l'attachement des anticorps peut également entraîner l'activation du complément et la lyse de l'enveloppe.

Les cellules infectées présentant des fragments de protéines virales en association avec les antigènes d'histocompatibilité de classe I (CMH I) peuvent être détruites par les lymphocytes T cytotoxiques. Si elles expriment un antigène viral à leur surface (ce qui est fréquent), elles peuvent également être reconnues par des anticorps et en définitive détruites par des cellules tueuses (mécanisme dit ADCC : antibody dependant cell cytolysis). Enfin, elles peuvent être détruites par des cellules NK (natural killer), phénomène sans spécificité immunologique.

b / Réponse antibactérienne

La réponse immune contre des bactéries dont le pouvoir pathogène est fondé sur la sécrétion d'une exotoxine (tétanos et autres infections à *Clostridium*...) est basée sur la réponse en anticorps neutralisant la toxine, en empêchant sa fixation sur ses cibles cellulaires.

La réponse immune contre les bactéries à pouvoir d'infection systémique est surtout basée sur le développement d'anticorps. Ces anticorps jouent un rôle différent en fonction des situations. Par exemple, chez les bactéries possédant une capsule les protégeant de la phagocytose en inhibant leur adhésion au phagocyte, ils peuvent reconnaître les antigènes K de *E. Coli* avec neutralisation du pouvoir antiphagocytaire de la capsule ou neutralisation des facteurs d'attachement. Chez les bactéries non encapsulées, ils peuvent faciliter la phagocytose (cette facilitation est appelée opsonisation). Enfin, l'action conjointe des anticorps et du complément parfois associée au lysosyme (enzyme protéolytique) peut conduire à une lyse bactérienne.

Enfin, nous avons vu que la réponse immune contre les bactéries intracellulaires était fondée sur un mécanisme d'activation macrophagique, rendant le macrophage apte à détruire de telles bactéries.

En fonction du ou des effecteurs majeurs du pouvoir pathogène, l'immunité anti-bactérienne sera un équilibre entre ces différentes modalités.

2.2 / La réponse immune post-vaccinale

La réponse immune post-vaccinale varie en fonction du mode de présentation de l'antigène au système immunitaire.

L'efficacité de la vaccination varie selon le mode de présentation de l'antigène au système immunitaire.

Le système le plus simple est représenté par les **vaccins vivants composés de souches atténuées**. A la fois par leur composition (tous les antigènes de l'agent pathogène, majeurs et mineurs, sont présents) et par le fait qu'il réalisent une multiplication chez l'hôte, ils sont les plus susceptibles d'induire une réponse immune proche de celle de l'infection naturelle. Ils sont en particulier capables d'induire à la fois une réponse cellulaire cytotoxique et une réponse anticorps systémiques. Ceci doit néanmoins être relativisé pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'atténuation d'une souche peut conduire à un très faible degré de réplication chez l'hôte, caractéristique bénéfique en terme de sécurité, mais néfaste pour l'induction d'une réponse immune. De plus, il est rare que les vaccins vivants soient administrés par la voie normale d'infection, généralement muqueuse. L'induction d'une immunité muqueuse solide est alors compromise, sauf si la souche vaccinale présente un pouvoir invasif élevé (*a priori* non souhaitable). Pour ces raisons, il est clair que s'il existe pour certaines maladies d'excellents vaccins vivants, bien supérieurs à leurs homologues inertes, cette règle n'est néanmoins pas générale. Tout au plus peut-on conclure que, idéalement, le vaccin le plus efficace devrait être une souche atténuée administrée par la voie naturelle d'infection... à condition qu'une telle souche soit disponible et puisse être administrée par cette voie sans risque de réexcrétion et de diffusion.

Les **vaccins vivants vectorisés** représentent *a priori* un bon compromis. Ils présentent également l'antigène au système immunitaire de manière adéquate et suscitent l'induction d'une immunité à la fois humorale et cytotoxique. Le choix entre vecteurs répliatifs et non répliatifs est avant tout fondé sur des considérations de dose nécessaire, les vecteurs non répliatifs nécessitant habituellement des doses plus élevées, mais fournissant des garanties plus solides en terme de dissémination dans l'environnement. La vaccination génétique semble présenter des caractéristiques voisines. On peut reprocher à ces systèmes une approche assez réductionniste, limitant les antigènes utilisés à un petit nombre, ce qui peut être limitant pour des agents pathogènes complexes (gros virus et bactéries). Enfin l'induction d'une immunité muqueuse est essentiellement fonction de la voie d'administration : de nombreux systèmes de vecteurs possèdent un potentiel démontré pour une administration par voie oronasale (poxvirus, adénovirus, salmonelles ...) (McClure et Emery 1993, McGhee et Kiyono 1993).

Les **vaccins inertes** (vaccins inactivés, sous-unités produites par purification ou par des techniques de génie génétique ou de synthèse *in vitro*) possèdent des propriétés communes. A l'état brut (sans adjuvant), ils sont uniquement capables d'induire une réponse en anticorps systémique. De manière générale, ils n'induisent pas de réponse cytotoxique (dont nous rappelons qu'elle nécessite généra-

lement une synthèse de protéines intracellulaires, ainsi qu'une présentation au système immunitaire au travers du CMH I). Enfin, ils sont incapables d'induire une immunité muqueuse significative, même lorsqu'ils sont administrés par une telle voie. Néanmoins une immunité générale protectrice aurait été obtenue chez le poulet après administration orale de virus inactivé de la maladie de Gumboro (Hoshi *et al* 1995). Lorsqu'on aura ajouté qu'ils sont plus coûteux à produire, on admettra que, comparés aux vaccins vivants, les vaccins inertes semblent ne posséder que des désavantages, uniquement compensés par leur innocuité. Pourtant l'expérience montre que nombre de ces vaccins se révèlent aussi efficace que des vaccins vivants, y compris contre des maladies virales dans lesquelles la composante cytotoxique de l'immunité est importante (comme la plupart des maladies virales). Ceci s'explique tout d'abord, comme nous l'avons vu, par le rôle des anticorps dans la neutralisation de virus ou de bactéries extracellulaires. Or nombre de virus et bien sûr de bactéries sont présents à un moment ou à un autre de leur cycle en position extracellulaire, voire suscitent une virémie ou une bactériémie. De plus, nous avons vu que des cellules infectées par des virus pouvaient être détruites par des mécanismes d'ADCC (antibody dependant cell cytolysis) en l'absence de réponse cellulaire cytotoxique.

Conclusion

A l'issue de cette synthèse, plusieurs paradoxes peuvent apparaître.

Le premier d'entre eux est le décalage apparent entre les progrès de la biologie moléculaire et l'absence d'entrée en force sur le marché de produits relevant d'une telle technologie. Plusieurs raisons synergiques permettent de l'expliquer. Tout d'abord, puisque des vaccins conventionnels satisfaisants existent pour la plupart des maladies majeures, ces nouvelles approches sont réservées à des maladies qui ne bénéficient pas de couverture vaccinale. Ces maladies sont souvent celles qui posent des problèmes d'ordre immunologique non résolus : nature des antigènes protecteurs mal connue, mécanisme d'échappement à la réponse immune. Les échecs sont donc relativement nombreux, alors que ces mêmes approches se révèlent satisfaisantes pour d'autres maladies qui bénéficient déjà de vaccins. A cela s'ajoute la lourdeur des procédures d'enregistrement pour les produits dérivés de la biotechnologie, qui peut rendre les industriels réticents à privilégier cette approche.

Un autre paradoxe correspond à l'absence apparente de lignes directrices évidentes dans la définition d'un vaccin. Ainsi, une même maladie, comme la rhinotrachéite infectieuse bovine, peut bénéficier de plusieurs types de vaccin, vivants et inactivés, sur le marché européen, parfois fabriqués à partir de la même souche dans ses versions vivante et

inactivée. Parallèlement, de nombreux travaux démontrent des protections satisfaisantes avec des vaccins vectorisés ou inertes à base de certaines protéines d'enveloppe. Il faut admettre que la conception d'un vaccin dépend certes du type d'immunité attendue, mais également de facteurs conjoncturels comme l'existence d'une souche vaccinale vivante satisfaisante (vaccin vivant) ou d'une souche ayant des rendements de culture satisfaisants pour la production d'un vaccin inactivé, sans parler des coûts du développement et de l'enregistrement. De plus, l'utilisation d'adjuvants tend à modifier la réponse naturelle contre un antigène inactivé. En définitive, le risque dans ce domaine est de raisonner en termes qualitatifs généraux vis-à-vis de certains types de vaccin (présence ou absence d'une immunité muqueuse, d'une réponse T cytotoxique...), alors que la protection résulte d'une combinaison de différents mécanismes immunologiques. Ainsi, un titre

élevé en anticorps neutralisants peut compenser l'absence d'immunité muqueuse à la porte d'entrée de l'infection dans le cas d'infection systémique. La comparaison en terme généraux des différentes approches est difficile, car elle ne peut s'affranchir du problème des doses, difficilement standardisables : comment en effet comparer, pour une même maladie, des approches vaccin vivant, inactivé, subunitaire et vectorisé ? La seule comparaison possible est celle qui porte sur le produit fini sur espèce cible : elle se révèle souvent très coûteuse et n'apporte d'information que sur les produits étudiés.

En définitive la vaccinologie reste un domaine en pleine évolution, qui se situe à l'intersection de la virologie et bactériologie, de l'immunologie, de la galénique et de l'épidémiologie. En ce sens, il ne faut guère attendre de solution unique à un objectif *a priori* simple, celui de protéger contre une maladie infectieuse.

Références bibliographiques

- Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Bau-
duin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Des-
mettre P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P.,
1991. Large scale eradication of rabies using recom-
binant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*, 354, 520-522.
- Castrucci M.R., Hou S., Doherty P.C., Kawaoka Y.,
1994. Protection against lethal lymphocytic chori-
meningitis virus (LCMV) infection by immunization
of mice with an influenza virus containing an LCMV
epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J.*
Virool., 68, 3486-3490.
- Davis H.L., Whalen, R.G., 1995. DNA-based immu-
nization. In : G. Dickson (ed), *Molecular and Cell*
Biology of Human Gene Therapeutics. Chapman and
Hall, London.
- Doel T.R., Gale C., Do Amaral C.M.C.F., Mulcahy G.,
Dimarchi R., 1990. Heterotypic protection induced
by synthetic peptides corresponding to three sero-
types of foot-and-mouth disease. *J. Virool.*, 64, 2260-
2264.
- Eloit M., Adam M., 1995. Isogenic adenoviruses type
5 expressing or not expressing the E1A gene : effi-
ciency as virus vectors in the vaccination of permis-
sive and non permissive species. *J. General Virool.*,
76, 1583-1589.
- Gilligan C.A., Li Wan Po A., 1991. Oral vaccines :
design and delivery. *Intl J. Pharmaceutics*, 75, 1-24.
- Hoshi S., Nakamura T., Nunoya T., Ueda S., 1995.
Induction of protective immunity in chickens orally
immunized with inactivated infectious bursal
disease virus. *Vaccine*, 13, 3, 245-252.
- Langeveld J.P.M., Casal J.I., Osterhaus A.D.M.E.,
Cotes E., De Swart R., Veal C., Dalsgaard K., Puijck
W.C., Shaaper W.M.M., Meløen R.H., 1994. First peptide
vaccine providing infection against viral infec-
tion in target animal : studies of canine parvovirus
in dogs. *J. Virool.*, 68, 4506-4513.
- McClure S.J., Emery D.L., 1993. Recent advances in
veterinary immunology, particularly mucosal immu-
nity. In : A.R. Peters (ed), *Vaccines for veterinary*
applications. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford.
- McGhee J.R., Kiyono H., 1993. New perspectives in
vaccine development : mucosal immunity to infec-
tions. *Infect. Agents Dis.*, 2, 55-73.
- Peeters B., Bouma A., de Bruin T., Moormann R.,
Gielkens A., Kimman T., 1994. Non transmissible
pseudorabies virus gp50 mutants : a new generation
of safe live vaccines. *Vaccine*, 12, 375-380.
- Selvakumar R., Borenstein L.A., Lin Y.L., Ahmed R.,
Wettstein F.O., 1995. Immunization with non struc-
tural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillo-
mavirus stimulates regression of virus-induced
papillomas. *J. Virool.*, 69, 602-605.
- Ulmer J.B., Donnelly J., Parker S.E., Rhodes G.H.,
Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck
R.R., DeWitt C.M., Friedman A., Hawe L.A., Lean-
der K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W.,
Montgomery D.L., Liu M.A., 1993. Heterologous pro-
tection against influenza by injection of DNA encod-
ing a viral protein. *Science*, 259, 1745-1749.
- Van Oirschot J.T., Gielkens A.L.J., Moorman R.J.M.,
1990. Marker vaccines, virus protein-specific anti-
body assays and the control of Aujeszky's disease.
Veterinary Microbiology, 23, 85-101.
- Van Zijl M., Wensvoort G., De Kluyver E., Hulst M.,
Van der Gulden H., Gielkens A., 1991. Live attenua-
ted pseudorabies virus expressing envelope glycopro-
tein E1 of hog cholera protects swine against both
pseudorabies and hog cholera. *J. Virool.*, 65, 2761-
2765.

Abstract

Traditional and recombinant vaccines.

Several types of vaccines are currently used or being developed. They can be split into two categories : live and inactivated vaccines. Traditional live vaccines are attenuated by various methods, including growth in unusual conditions (for bacteria) or in cells or animal species to which they are not initially adapted (for viruses). New generation of live vaccines are obtained through recombinant DNA technology (recombinant vaccines) : they can be generated either by directed mutagenesis of virulence genes or by cloning genes of immunogenic proteins into vectors i.e. other bacteria or viruses with attractive properties of safety and efficiency. Conventional inactivated vaccines are made by the use of physical or chemical treatment of micro-organisms. As the immunogenic components of micro-organisms

are more and more well identified, they can be used to make vaccines containing only these major immunogenic components (subunit vaccines), in which the antigenic fraction is derived by purification of antigens, or by *in vitro* gene expression of proteins (another type of recombinant vaccines) or chemical synthesis of peptides. Finally, recent advances demonstrated that direct inoculation of an immunogenic protein encoding gene into muscle of several animal species (known as genetic immunisation, which defines another type of recombinant vaccines) was able to elicit antibody and cellular immune responses. Systemic and mucosal immunity conferred by live and inactivated vaccines are analysed.

Eloit M., 1998. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. INRA Prod. Anim., 11, 5-13.