

10

Vaccins recombinants vivants multivalents et vaccins ADN

La recherche en vaccinologie moderne fait appel à un ensemble de technologies nouvelles en immunologie, biochimie, biologie moléculaire et microbiologie, et vise à répondre à une série de questions qui sont fondamentales pour le développement de nouveaux vaccins et l'amélioration de ceux déjà existants. Ces questions peuvent concerner la diminution du nombre de doses nécessaires à une protection, l'administration non invasive par la voie muqueuse, ou simplement la diminution des coûts. Les domaines d'investigation sont donc l'identification des mécanismes de la réponse immunitaire protectrice après vaccination ou infection, et les approches biotechnologiques nécessaires pour induire cette réponse protectrice, même dans le cas où l'infection naturelle ne le ferait pas.

Parmi ces nouvelles technologies en vaccinologie, le développement de vaccins recombinants vivants et multivalents et celui de la vaccination par ADN occupent des places très importantes dans les recherches par les laboratoires académiques et industriels, comme en témoigne le nombre impressionnant de publications scientifiques qui paraissent chaque semaine sur le sujet.

Vaccins recombinants vivants multivalents

De nombreux vaccins recombinants vivants multivalents sont fondés sur l'atténuation de pathogènes. Les avantages de ces vaccins sont liés à leur capacité d'imiter une infection naturelle. Dans beaucoup de cas, mais pas toujours, une infection naturelle entraîne une réponse immunitaire forte et de longue durée. La possibilité de faire produire des antigènes hétérologues par ces pathogènes atténués permet, en outre, d'induire une immunité contre plusieurs agents infectieux simultanément. Cependant, une des difficultés majeures est d'aboutir à une atténuation suffisante sans perte d'immunogénicité et sans risque de réversion.

Deux types de vecteurs atténués peuvent être distingués : les vecteurs bactériens et les vecteurs viraux. Chaque type comporte des avantages et des inconvénients. Les virus sont capables de produire des antigènes modifiés ou

de les exprimer dans le cytoplasme de la cellule hôte, tandis que les bactéries ne peuvent généralement pas modifier les antigènes et les présentent de manière extra-cytoplasmique dans la plupart des cas. D'autre part, le nombre d'antigènes qui peuvent être produits par une bactérie est, en principe, plus élevé que ceux qui peuvent être produits par des virus. Enfin, une bactérie peut être éliminée par un traitement aux antibiotiques, en cas de problème, ce qui est plus difficile pour un virus.

Vecteurs viraux

Plusieurs virus ont été modifiés génétiquement afin de pouvoir les utiliser comme vecteurs de vaccination.

Virus de la vaccine

Le vecteur viral le plus utilisé est, sans doute, le virus de la vaccine (Paoletti, 1996). Il s'agit d'un poxvirus à enveloppe, à ADN bicaténaire de grande taille (environ 190 kb) et à réplication cytoplasmique. Le virus de la vaccine a été le premier vaccin utilisé dans la prévention de maladies infectieuses, en l'occurrence de la variole. Connu par les Chinois déjà dans l'Antiquité et rendu célèbre par Jenner à la fin du XVIII^e siècle, il a été extensivement utilisé dans le programme de vaccination massive lancé par l'OMS en 1967 et a permis d'éradiquer la variole depuis 1980. Les premiers virus de la vaccine recombinants ont été décrits en 1982 et certains résultats spectaculaires ont été obtenus, notamment dans la lutte contre la rage par un virus de la vaccine produisant la glycoprotéine G du virus de la rage. Ce virus recombinant a été utilisé avec succès comme vaccin oral sur le terrain pour éliminer la rage du renard à l'échelle d'une région en Belgique. D'autres utilisations du virus de la vaccine peuvent être citées : l'expression de 7 antigènes différents de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme, l'expression des antigènes de carcinome colorectal, de l'hémagglutinine-neuraminidase du virus de la maladie de Newcastle. Les avantages du virus de la vaccine, par rapport à d'autres vecteurs viraux, incluent la grande taille de son génome qui tolère l'introduction de gros fragments d'ADN étranger (jusqu'à 25 kb), la stabilité des recombinants et sa capacité de se répliquer dans beaucoup de types cellulaires différents. Cependant, la réactogénicité de ce virus est trop importante, ce qui a conduit à développer des virus apparentés qui sont soit déficients dans leur réplication (NYVAC) ou dont la réplication est restreinte à des espèces animales non humaines (Avipox). D'autres inconvénients sont liés à la difficulté d'utiliser ces virus chez des sujets vaccinés contre la variole. D'autre part ce vecteur ne pourra, en principe, être utilisé qu'une seule fois en raison de l'immunité qu'il induit contre lui-même.

Virus de la poliomyélite

Le virus de la poliomyélite, un picornavirus à ARN de petite taille (7,5 kb), sans enveloppe, a également été développé comme vecteur vaccinal (Andino

et coll., 1994). Ces vecteurs sont basés sur le virus atténué, largement utilisé comme vaccin contre la poliomyélite, et permettent de présenter des épitopes à la surface du virion, car la structure tridimensionnelle du virus est connue. Son administration orale est non-invasive, et permet d'induire une réponse immunitaire mucosale. Le vaccin peut être donné peu de temps après la naissance. Cependant, il persiste un faible risque d'induction de polio par la vaccination. D'autre part, son utilité est limitée par le fait que son génome ne tolère que des insertions de relativement petite taille et que les antigènes chimériques souffrent, souvent, d'instabilité génétique.

Adénovirus

Les adénovirus sont actuellement considérés comme vecteurs de vaccination, car ils sont utilisés en thérapie génique. Par ailleurs, certains sérotypes (4 et 7) de ce virus à ADN bicaténaire linéaire (30-40 kb), et à réplication nucléaire sans intégration, sont utilisés depuis 1969 comme vaccin oral contre des affections respiratoires, surtout chez les militaires. Ce virus est facile à cultiver et les recombinants induisent une bonne réponse immunitaire chez les rongeurs. Malheureusement, ils sont moins immunogènes chez les primates. Le virus est capable d'empaqueter jusqu'à 1,2 kb d'ADN étranger ; les constructions de plus grande taille sont souvent instables. Cependant, la délétion de certains gènes viraux permet d'augmenter la capacité d'empaquetage. Ces virus requièrent alors des virus « *helper* » auxiliaires pour leur réplication, ce qui pose souvent le problème de la purification des virus défectifs, sans contamination par les virus auxiliaires.

Rétrovirus

D'autres vecteurs viraux sont des rétrovirus. Un virus dérivé du virus du sarcome de Roux et exprimant l'hémagglutinine du virus de la grippe s'est montré efficace contre la grippe aviaire chez le poulet. Ces virus présentent une instabilité génétique en raison de l'infidélité notoire de la transcription inverse. Des constructions génétiques ont également conduit à l'utilisation du virus de la grippe comme vecteur de présentation d'épitopes T et B. Cependant, ce virus pose des problèmes d'atténuation. Le phénotype thermosensible, actuellement le plus utilisé, est sujet à réversion ou suppression. D'autres mutations sont donc nécessaires, comme des mutations ponctuelles multiples ou des mutations dans des régions codant des protéines aux fonctions essentielles, telles que l'ARN polymérase.

Le virus de l'Herpès simplex de type I (HSV) a aussi été étudié comme vecteur vaccinal. Sa taille génomique est relativement grande (125-229 kb) et tolère jusqu'à 9 kb d'ADN supplémentaire. Par ailleurs, une partie de son génome (30 kb) code des protéines non essentielles et peut donc être remplacée. Les différentes approches d'atténuation décrites concernent le gène de la thymidine kinase, celui d'un activateur « *immediate-early* », un gène impliqué dans la neurovirulence (RL1) ou dans la réplication du virus. Certaines de ces atténuations rendent le virus dépendant d'un virus auxiliaire, ce qui pose

encore le problème de sa purification. Par ailleurs, plus de 70 % de la population humaine est infectée par l'HSV, ce qui rend une recombinaison entre le virus sauvage et un virus atténué possible chez un sujet vacciné.

Vecteurs bactériens

L'utilisation de vecteurs bactériens est possible grâce, d'une part à l'atténuation génétique de bactéries pathogènes, et d'autre part à l'expression d'antigènes chez des bactéries commensales, non pathogènes.

Salmonella typhi

La souche *Salmonella typhi* Ty21a est la seule souche actuellement licenciée et utilisable, comme vaccin vivant contre la fièvre typhoïde chez l'homme. Elle est administrable oralement et induit une immunité mucosale et systémique. Cependant, la mutation responsable de l'atténuation n'est pas clairement identifiée et l'immunogénicité d'antigènes recombinants exprimés chez ce micro-organisme est relativement faible. Par la suite d'autres souches ont été développées en ciblant de manière dirigée des gènes à muter pour conduire à une atténuation (Hormaeche et Kahn, 1996). Certains de ces gènes candidats interviennent dans la biosynthèse d'acides aminés aromatiques (les gènes *aroA*, *aroC*) ou dans la régulation par l'AMPc (les gènes *cya* et *crp*, codant respectivement l'adénylate cyclase et le récepteur de l'AMPc). D'autres atténuations visent plus les mécanismes directement impliqués dans la virulence, tel le gène *cdt* (pour « *deep-tissue colonization* ») ou les gènes *phoP/Q*, codant un système de régulation de la virulence chez *Salmonella*. Pour toutes ces approches, la difficulté majeure est de trouver un équilibre acceptable entre la virulence résiduelle et l'immunogénicité.

L'exemple de *Salmonella* illustre aussi très bien les problèmes généraux rencontrés lors de l'utilisation de bactéries comme vecteurs de vaccination hétérologue. Ces problèmes concernent les difficultés à prédire le niveau d'expression d'un gène étranger, la stabilité et l'immunogénicité de son produit ; le niveau d'expression n'étant pas nécessairement corrélé au niveau d'immunogénicité. La stabilité génétique chez les salmonelles recombinantes peut aussi poser des problèmes, car des plasmides recombinants peuvent être perdus facilement, surtout si le transgène est exprimé à un niveau élevé. Un certain nombre de nouvelles stratégies tentent de remédier à ces inconvénients par l'introduction des transgènes dans le chromosome bactérien ou par l'imposition d'une pression sélective *in vivo* chez le sujet vacciné afin de maintenir le plasmide recombinant.

BCG

Le bacille de Calmette et Guérin (BCG), souche atténuée de *Mycobacterium bovis* après plus de dix années de passages, a été utilisé depuis de nombreuses années comme vaccin contre la tuberculose. Il s'agit peut-être du vaccin le

plus utilisé dans le monde, avec une incidence d'effets secondaires graves remarquablement faible. Les bases moléculaires de l'atténuation ne sont pas connues. Le vaccin peut être administré dès la naissance. Sa production est facile. Il porte une adjuvantité incorporée par la composition de la paroi mycobactérienne. Il induit une réponse cellulaire et humorale et peut être administré par voie sous-cutanée, orale ou intranasale (Lagranderie et coll., 1997). Depuis une dizaine d'années, plusieurs laboratoires ont développé des outils moléculaires permettant de produire des antigènes hétérologues chez le BCG (Stover et coll., 1992). Certains résultats d'immunogénicité et de protection chez l'animal sont très encourageants, mais l'immunogénicité chez l'homme n'a pas encore été établie. L'utilisation du BCG recombinant est compliquée par l'existence de différentes sous-souches qui ont été générées au départ de la souche originale. Par ailleurs, l'utilisation du BCG entrave l'utilisation de la tuberculine pour le diagnostic de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, une stratégie qui est utilisée dans plusieurs pays pour le contrôle de la tuberculose. Finalement, le BCG est de croissance très lente et la biologie moléculaire des mycobactéries n'est qu'à ses débuts.

Autres bactéries

Parmi les autres pathogènes atténués testés pour l'instant dans des modèles animaux, on peut citer *Listeria monocytogenes*, bactérie capable de pénétrer dans le cytoplasme (Ikonomidis et coll., 1997). De ce fait, certains antigènes produits par cette bactérie peuvent induire une bonne réponse cellulaire de type TH1 et de type cytotoxique (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocytes*). La manipulation du germe est relativement aisée et l'administration peut être orale. Cependant, l'atténuation génétique de ce micro-organisme n'a pas encore été beaucoup étudiée et aucun essai chez l'homme n'a été rapporté.

L'agent de la coqueluche, *Bordetella pertussis*, a récemment été proposé comme vecteur recombinant vivant. D'administration nasale facile, ce vecteur est un bon inducteur de réponses mucosales, humorales et cellulaires. Les antigènes étrangers peuvent être exposés à la surface ou sécrétés par la bactérie et l'atténuation est possible grâce à l'avancement des connaissances au niveau moléculaire des facteurs principaux de virulence (Mielcarek et coll., 1998). Cependant, même si ce vecteur s'est avéré prometteur chez la souris, aucun essai chez l'homme n'a encore été réalisé.

La bactérie *Shigella* a également fait l'objet de nombreuses tentatives d'atténuation et plus de 15 souches sont actuellement testées, dont certaines chez l'homme. Des vaccins trivalents ont été développés en exprimant des gènes de *Shigella sonnei* et *Shigella dysenteriae* chez *Shigella flexneri* 2a T32. Un certain nombre de systèmes génétiques développés pour *Salmonella*, tels que le « *Asd-balanced lethal vector system* » (Tacket et coll., 1997) ont été adaptés pour *Shigella* afin d'augmenter la stabilité des transgènes.

Bactéries commensales

Les bactéries commensales, ne nécessitant pas d'atténuation, constituent une alternative aux pathogènes atténués potentiellement intéressante (Medaglini et coll., 1997). Certaines de ces bactéries, comme les bactéries lactiques, sont d'ailleurs utilisées depuis longtemps dans l'industrie agro-alimentaire et considérées comme « GRAS » (pour *generally regarded as safe*). Cependant, l'immunogénicité des antigènes étrangers produits par ces bactéries n'a pas encore été beaucoup étudiée et les outils moléculaires restent encore à développer pour beaucoup d'entre eux. Une question importante à résoudre est celle de la nécessité éventuelle d'une colonisation par ces bactéries pour induire une réponse immune. Certains systèmes génétiques ont récemment été développés pour les bactéries telles que *Streptococcus gordonii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* et, dans certains cas, une bonne réponse immune a pu être obtenue contre un antigène modèle chez la souris (Robinson et coll., 1997).

Vaccins ADN

Déjà, dans les années cinquante, il a été observé que l'injection de chromatine isolée de tumeurs pouvait induire des tumeurs chez les rongeurs. Ensuite, il fut établi que le principe actif de cette chromatine était l'ADN. Une dizaine d'années plus tard, il fut montré que l'injection d'ADN du *Polyoma virus* induisait à la fois des tumeurs et la production d'anticorps contre ce virus. Mais c'est dans les années quatre-vingt-dix que « l'immunisation génétique » a pris son véritable essor (Chattergoon et coll., 1997 ; Donnelly et coll., 1997 ; Manickan et coll., 1997 ; Molling, 1997). L'injection dans la peau ou dans le muscle d'ADN plasmidique (quelques nanogrammes à 100 µg) peut aboutir à l'induction d'une réponse immune cellulaire et humorale contre l'antigène codé par le plasmide, voire même à la protection contre une infection. Plusieurs types d'infections ont été testés chez la souris, tels que celles par le virus de la grippe, le virus de l'hépatite B, *Plasmodium yoelii*, *M. tuberculosis*, cas pour lesquels une protection significative a pu être obtenue.

Avantages des vaccins ADN

Les vaccins à ADN présentent certains avantages. Les vecteurs sont relativement faciles à construire et à produire en grandes quantités. Ils sont stables à température ambiante et ne nécessitent pas une chaîne du froid. Ils permettent même de vacciner avec des antigènes « rares » ou instables. Généralement, quelques dizaines de microgrammes suffisent pour induire une réponse cellulaire et/ou humorale. Il est possible de construire des vecteurs multiples, comprenant différents gènes codant de multiples antigènes. Comme pour les vecteurs viraux, les vaccins à ADN permettent une modification post-traductionnelle fidèle du ou des antigène(s) produit(s). Il est possible de

moduler à façon la réponse immune par la coexpression de cytokines ou d'autres molécules immunomodulatrices. Certaines séquences plasmidiques, appelées « *immunostimulatory sequences* » (ISS), sont immunostimulatrices par elles-mêmes. La présence de ces séquences augmente les réponses humorales et cellulaires après injection intradermique ; chez la souris, le profil isotypique des anticorps peut même être changé après coadministration intramusculaire avec un antigène.

Chez la souris, les réponses immunitaires sont généralement de longue durée. Elles semblent être moins persistantes chez les primates. La production d'IgA sécrétoire ou de réponse mucosale n'est généralement observée ni chez la souris ni chez les primates. Chez la souris, l'isotype dominant est, souvent, l'IgG2a et la production d'IgE est souvent inhibée. Ces profils sont compatibles avec une prédominance de cytokines de type TH1. Non seulement le type de réponse immune peut être modulé, d'une part par les ISS ou la coexpression de molécules immunomodulatrices, mais aussi par le mode d'administration. Ainsi, une injection intramusculaire induit plutôt la production de cytokines de type TH1, tandis que l'injection par « *gene gun* » induit plutôt une réponse de type TH2 (Feltquate et coll., 1997) ; l'injection par « *gene gun* » ne nécessite souvent que quelques nanogrammes, tandis que plusieurs dizaines de µg sont nécessaires par injection intramusculaire ; l'expression des antigènes ne dure que 2 à 3 jours après injection par « *gene gun* », mais peut durer plusieurs mois après injection intramusculaire.

De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour améliorer la compréhension des mécanismes de présentation d'antigènes par des vaccins à ADN. L'expression des transgènes dans les cellules musculaires peut conduire à une présentation dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité, mais les molécules costimulatrices, nécessaires à une bonne induction du système immunitaire, font défaut au niveau de ces cellules. Il est donc possible qu'il y ait d'abord expression dans les cellules somatiques et ensuite transfert de l'antigène aux cellules présentatrices d'antigènes.

Une nouvelle voie particulièrement intéressante est la combinaison des vaccins à ADN et des vecteurs bactériens. En effet, plusieurs systèmes bactériens, tels que *Shigella*, *Escherichia coli* et *Salmonella*, sont maintenant en voie de développement pour délivrer l'ADN nu par application mucosale (Darji et coll., 1997 ; chapitre 9 du présent ouvrage).

Inconvénients potentiels des vaccins ADN

Un certain nombre de questions concernant l'innocuité doivent être abordées avant de pouvoir proposer un vaccin à ADN. Ainsi, il existe une possibilité théorique que l'ADN étranger puisse s'intégrer dans un des chromosomes du sujet vacciné. Les plasmides utilisés actuellement sont circulaires, et restent sous forme d'épisomes sans répllication chez l'hôte. Il convient également d'éviter toute région homologue avec l'ADN de l'hôte, afin de prévenir une

recombinaison homologue. Généralement l'ADN pénètre dans des cellules qui ne se divisent pas (cellules musculaires, cellules dendritiques). Des tests chez la souris ont montré que la fréquence d'intégration devait être inférieure à 1 000 fois le taux de mutations somatiques. Un autre aspect important à considérer est la possibilité éventuelle d'induction de tolérance ou d'auto-immunité. Il a été observé depuis longtemps que l'injection répétée de petites quantités d'antigène peut induire une tolérance. Cependant, ce phénomène n'a jamais été observé chez les souris adultes immunisées avec l'ADN ; au contraire, certaines expériences ont montré que la vaccination par ADN pouvait lever une tolérance (Davis et coll., 1997). En revanche, chez la souris nouveau-né l'ADN peut induire une tolérance, alors que l'antigène protéique correspondant ne le fait pas (Donnelly et coll., 1997). L'étude de l'induction éventuelle de la production d'anticorps anti-ADN est particulièrement importante, dans la mesure où les anticorps anti-ADN sont rencontrés pour certaines maladies auto-immunes telles que *Lupus erythematosus*.

En conclusion, les nouvelles approches pour le développement de vecteurs vivants recombinants et pour la vaccination par ADN sont très prometteuses. Une première génération de vecteurs a permis de montrer la faisabilité des concepts, mais reste d'utilisation assez limitée avec parfois des résultats décevants chez l'homme en regard des résultats préliminaires encourageants obtenus chez les rongeurs. Cependant, une nouvelle génération de vecteurs se développe dans plusieurs laboratoires et il est permis d'espérer qu'avec les progrès de nos connaissances en immunologie humaine et en biotechnologie, ils pourront aboutir à une, voire plusieurs, stratégies vaccinales efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

ANDINO R, SILVERA D, SUGGETT SD, ACHACOSO PL, MILLER CJ et coll. Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* 1994, **265** : 1448-1451

CHATTERGOON M, BOYER J, WEINER DB. Genetic immunization. A new era in vaccines and immune therapeutics. *Faseb J* 1997, **11** : 753-763

DARJI A, GUZMAN CA, GERSTEL B, WACHHOLZ P, TIMMIS KN et coll. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997, **91** : 765-775

DAVIS HL, MILLAN CLB, MANCINI M, MCCLUSKIE MJ, HADCHOUEL M et coll. DNA based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice. *Vaccine* 1997, **15** : 849-852

DONNELLY JJ, ULMER JB, SHIVER JW, LIU MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997, **15** : 617-648

FELTQUATE DM, HEANEY S, WEBSTER RG, ROBINSON HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997, **158** : 2278-2284

HORMAECHE C, KAHN CMA. Recombinant bacteria as vaccine carriers for heterologous antigens. In : Concepts in Vaccine Development, KAUFMANN SHE Ed. Walter de Gruyter, Berlin, 1996 : 327-359

KONOMIDIS G, PORTNOY DA, GERHARD W, PATERSON Y. Influenza-specific immunity induced by recombinant *Listeria monocytogenes* vaccines. *Vaccine* 1997, **15** : 433-440

LAGRANDERIE M, BALAZUC AM, GICQUEL B, GHEORGHIU M. Oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG simian immunodeficiency virus nef induces local and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. *J Virol* 1997, **71** : 2303-2309

MANICKAN E, KAREM KL, ROUSE BT. DNA vaccines. A modern gimmick or a boon to vaccinology. *Crit Rev Immunol* 1997, **17** : 139-154

MEDAGLINI D, RUSH CM, SESTINI P, POZZI G. Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases : vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine* 1997, **15** : 1330-1337

MIELCAREK N, RIVEAU G, REMOUE F, ANTOINE R, CAPRON A, LOCHT C. Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nat Biotechnol* 1998, **16** : 454-457

MOLLING K. Naked DNA for vaccine or therapy. *J Mol Med* 1997, **75** : 242-246

PAOLETTI E. Applications of pox virus vectors to vaccination : an update. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** : 11349-11353

ROBINSON K, CHAMBERLAIN LM, SCHOFIELD, KM, WELLS, LM, LE PAGE, RWF. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997, **15** : 653-657

STOVER CK, DE LA CRUZ VF, BANSAL GP, HANSON MS, FUERST TR et coll. Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. *Adv Exp Med Biol* 1992, **327** : 175-182

TACKET CO, KELLY SM, SCHODEL F, LOSONSKY G, NATARO JP et coll. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the ASD-balanced lethal vector system. *Infect Immun* 1997, **65** : 3381-3385