
14

Perspectives vaccinales

Les anticorps anti-hémagglutinine (HA) et anti-neuraminidase (NA) sériques sont associés à la résistance à l'infection chez l'homme. La présence d'anticorps (AC) de type IgA dans les sécrétions nasales est associée à la résistance à l'infection et à la maladie lors d'une épreuve virulente expérimentale.

Chez l'homme, on peut détecter des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) très tôt après l'infection. Ces CTL peuvent inhiber la réplication virale et facilitent l'élimination du virus. Les cellules T CD8 cytotoxiques restreintes par les molécules de classe I du MHC reconnaissent HA surtout, mais également NA, du même sérotype et les protéines conservées entre différents sous-types (NP et PB2). Le taux de CTL mémoire est associé, chez l'homme, à une élimination accrue du virus du tractus respiratoire.

Limitation des vaccins actuels

Le vaccin actuel consiste en un virus purifié, inactivé à la formaldéhyde, de type A (H1 N1 et H3N2) et de type B. Injecté par voie intramusculaire (im) ou sous-cutanée (sc), il stimule principalement la production d'anticorps sériques, mais pas celle d'IgA locales. Le virus est soit utilisé intact, soit traité chimiquement pour éliminer les lipides membranaires ; ne restent alors dans le vaccin que les protéines du virus (vaccin splitté).

Stratégies

Les stratégies de développement d'un vaccin anti-influenza efficace doivent remplir cinq exigences :

- inclure les protéines de surface HA et NA de chaque souche de virus contemporaine puisque ces protéines sont responsables de l'immunité protectrice ;

- ce vaccin doit pouvoir être mis en œuvre rapidement d'une année sur l'autre ;
- induire une immunité locale et systémique qui assure la résistance à l'infection et une immunité à médiation cellulaire qui contribue à l'élimination du virus et à la guérison ; ces réponses doivent pouvoir être rappelées (réponse mémoire) ;
- prévenir la transmission du virus et la maladie et donc limiter efficacement la réplication virale ;
- être sûr et efficace pour les populations à risques (enfants, vieillards, malades chroniques).

Différentes stratégies ont été envisagées pour tenter de répondre à l'ensemble de ces critères, telles que l'utilisation de vaccins vivants atténués, les vaccins sous-unitaires, l'ADN ou ARN codant pour les protéines virales.

Les modèles animaux sont très utiles pour la mise au point de ces stratégies. Le furet, le hamster et la souris ont été utilisés pour étudier la réponse immune après infection et vaccination. Des études déjà anciennes ont montré que la primo-immunisation d'un animal par un virus inactivé entraîne la production d'anticorps mais que l'on n'observe pas toutes les réponses à médiation cellulaire : la suppression ou l'absence des lymphocytes T cytotoxiques est sans doute responsable de la faible protection alors que chez les animaux primo-infectés, l'immunité peut être restaurée par l'injection de virus inactivé.

Des publications plus récentes tentent de répondre à divers types de questions concernant la qualité de la réponse immune en fonction des modes et voies d'inoculation de vaccins vivants et inactivés.

Vaccins inactivés

Tamura et coll. (1992) comparent la protection contre l'infection après inoculation nasale d'un vaccin trivalent inactivé en présence de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) par rapport à la protection après inoculation sous-cutanée du vaccin trivalent. Les auteurs constatent :

- l'obtention des anticorps locaux IgA, plus avides et plus efficaces que les IgG, ils empêchent l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules respiratoires ;
- l'obtention des réactions de protections croisées plus importantes lorsqu'il y a rappel avec un virus variant ;
- l'augmentation globale de la réponse anticorps avec l'adjuvant : ici, la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB), une protéine de transfert non toxique. L'adjuvant provoque également l'augmentation de la production

d'interleukine I par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sans restriction CMH.

Des épitopes distincts sur l'HA peuvent être définis (Tamura et coll., 1993) ainsi : les uns neutralisant, d'autres augmentant l'infection et un troisième groupe qui peut avoir l'une ou l'autre des actions selon la concentration en anticorps.

L'augmentation de la protection antigrippale par obtention d'immunité locale (IgA) au niveau de tout le système muqueux, y compris respiratoire, est-elle applicable aux sujets âgés s'ils souffrent aussi d'un défaut d'anticorps sécrétoires ?

Waldman et coll. (1987) ont étudié cette question à partir des modèles de souris jeunes et âgées. Ils constatent que les souris vieilles sont moins résistantes à l'infection. Elles ont une réponse anticorps sériques et locaux inférieure à celle des souris jeunes. Enfin, la protection contre le virus épreuve est identique, ainsi que la production locale de virus.

Virus vivants atténués

Ces virus sont obtenus par réassortiment génétique de deux virus Influenza. Ils contiennent les gènes qui codent pour HA et NA de souches virulentes sauvages et les segments d'ARN internes qui confèrent l'atténuation et proviennent de virus donneurs atténués. Pour être admis comme virus donneurs, ces virus doivent transmettre des segments d'ARN capables de conférer de manière reproductible le phénotype atténué. De plus, ces virus doivent être peu réactogènes chez l'homme, stables génétiquement, peu susceptibles d'être transmis à des individus naïfs et capables d'induire une immunité protectrice de la maladie. A l'heure actuelle, les meilleurs candidats pour conférer l'atténuation sont les virus adaptés au froid. Le virus A/Ann Arbor/6/60 ca diffère par 24 acides aminés de la souche sauvage. Les mutations correspondant au phénotype thermo-sensible (ts) sont situées dans les gènes codant pour la polymérase (PB1 et PB2) et les mutations correspondant à la spécificité d'hôte sont situées dans les gènes PA et M et contribuent à l'atténuation du virus chez l'homme. Les techniques de recombinaison génétique devraient permettre d'introduire des délétions ou des mutations plus stables dans ces virus.

Virus recombinants de la vaccine exprimant les protéines virales (vaccins vivants)

Seuls les virus recombinants exprimant HA et NA permettent d'obtenir une protection complète (HA) ou partielle (NA), lorsqu'ils sont injectés

par voie intrapéritonéale (ip) et intranasale (in), lors d'une épreuve virulente avec un virus Influenza homologue (Epstein et coll., 1993). Les virus recombinants exprimant les autres protéines virales (y compris NP) ne confèrent pas la protection. Ces résultats ont été obtenus dans trois haplotypes de souris différents H2b, H2d, H2k. Chez des souris déficientes génétiquement en CMH de classe I et qui donc ne peuvent faire de réponse CTL, la protection peut être obtenue par immunisation avec les virus recombinants exprimant HA ou NA (Vac HA ou Vac NA).

Dans une autre étude (Tamura et coll., 1991) les auteurs montrent que le transfert passif d'IgA purifiées à partir de lavages nasaux et transférées dans le tractus respiratoire de souris naïves confère la protection contre une autre souche de virus (APR8/A Yamagata).

A partir d'un modèle expérimental souris, Ben Yeduda et coll. (1993) ont montré que l'excès de morbidité est lié à des déficits en anticorps anti-HA et en lymphocytes T cytotoxiques. Un vaccin vivant recombiné (Vac HA) peut corriger les déficits. L'apport d'IL2 n'améliore pas la réponse immunitaire et la protection chez les souris. Auparavant, Mbawuiké et coll. (1990) avaient montré que, chez les personnes âgées ayant un déficit en IL2, un vaccin influenza inactivé + liposomes IL2 augmentait la réponse immunitaire.

Est-il possible d'augmenter l'immunité hétérologue en utilisant des vaccins recombinants vivants (vac-HA, Vac-NP) qui stimulent les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de sous-types ?

Endo et coll. (1991) montrent que les vaccins recombinants contenant ou l'HA1 ou la NP1 provoquent une protection complète homologue, due surtout aux anticorps neutralisants homologues. Les anticorps neutralisants sont actifs dans le poumon sur les virus hétérologues. Les lymphocytes T cytotoxiques augmentent l'élimination des virus hétérologues.

Les vaccins recombinants ont une efficacité différente selon le site d'insertion du gène. Le vaccin anti-NP ne protège pas mais réduirait la propagation du virus dans le poumon et le risque de pneumonie. Un vaccin recombinant (Vac HA1) stable stimule la production d'anticorps et la réponse en lymphocyte T cytotoxiques, mais, par voie intradermique (ID), il ne stimule pas la production d'IgA sécrétoires. Son activité est-elle modifiée par des anticorps préexistants ?

Johnson et coll. (1993) montrent que des anticorps anti-HA à un titre équivalent à un sérum de convalescence inhibent la production d'anticorps anti-HA pour au moins 62 semaines mais n'inhibent pas la répllication du virus Vac HA. Ceci ne serait pas observé lorsque le vaccin recombinant est administré par voie intranasale, comme cela a été montré avec un vaccin recombinant RSV. L'effet inhibiteur des anticorps sur l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) serait « négligeable ». Les mécanismes d'inhibition ne sont pas connus.

Protéines chimériques

Fries et coll. (1993) ont exprimé une protéine chimère du virus de l'Influenza (D) dans *E. Coli*. Cette protéine était constituée de 81 acides aminés de NS1 et 157 de HA2. Des souris inoculées avec cette protéine, utilisant un adjuvant de Freund ou d'hydroxyde d'alumine, induisaient des cellules T CD8. Les souris étaient protégées contre une dose mortelle de souche virale soit H1N1, soit H2N2. Aucun anticorps anti-H1 ou neutralisant n'était induit.

La protéine D a été testée chez l'homme en utilisant l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant. Elle induisait une bonne réponse T-auxiliaire, mais pas de réponse CTL. Lorsque les personnes vaccinées étaient soumises à l'épreuve du virus virulent, la sévérité de la maladie était fortement réduite par rapport aux contrôles, et la quantité de virus excrétée réduite d'environ 100 fois. Bien que les CTL ne soient pas induits dans cette approche, la méthode offre plusieurs avantages et devrait être encouragée.

ADN ou ARN codant pour les protéines virales

Il s'agit là de vaccin inerte. Dans une étude réalisée par Robinson (Robinson et coll., 1993 - Fynan et coll., 1993), l'ADN codant pour HA de sous-type H1 est injecté à des souris. Dans ce cas, 2 injections d'ADN protègent d'une épreuve de létalité utilisant un virus de sous-type homologue H1N1. Les voies d'injection les plus efficaces sont soit la voie intramusculaire (95 % de protection), soit la voie intraveineuse (83 % de protection). La voie intranasale induit 75 % de protection.

Enfin, les auteurs rapportent que l'injection d'une microquantité d'ADN (0,4 µg) délivrée dans l'épiderme confère la protection chez 95 % des souris lors d'une épreuve virulente létale. Cette voie d'injection de l'ADN, qui utilise des microprojectiles recouverts d'ADN, semble très efficace du fait du ciblage de l'ADN sur les cellules présentatrices d'antigène dans l'épiderme (cellules de Langerhans). Dans ces expériences, les taux d'anticorps (IgG, IgA) sont très faibles mais une mémoire est induite puisque, lors de l'épreuve virulente, on peut observer une montée caractéristique du taux d'anticorps.

Dans une autre étude, Ulmer et coll. (1993) utilisent de l'ADN codant pour NP injecté par voie intramusculaire à des souris. Une réponse humorale est induite (IgG anti-NP), ainsi qu'une réponse cellulaire de type cytotoxique. L'injection d'ADN induit des cellules cytotoxiques CD8 capables de lyser des cellules infectées par le virus ou des cellules présentant des peptides spécifiques de NP. De plus, les animaux ayant reçu une injection d'ADN viral NP de sous-type H1N1 sont protégés lors d'une épreuve viru-

lente hétérologue (H2N2). Cette protection semble corrélée à la présence des CTL puisque le transfert passif des Ac anti-NP seuls ne confère pas la protection à des souris naïves.

Dans l'étude de Martinon et coll. (1993), l'ARN codant pour NP est encapsulé dans des liposomes et délivré à des souris par différentes voies dont les plus efficaces semblent être les voies intraveineuses et sous-cutanées. L'injection d'ARN permet d'obtenir une réponse du type CD8 cytotoxique dans 3 haplotypes de souris. Les cellules induites sont capables de reconnaître des cellules infectées par un virus homologue aussi bien que les cellules présentant un peptide spécifique de NP.

Brett et coll. (1991) avaient montré que les déterminants majeurs des cellules T sur la nucléoprotéine, présents après la vaccination avec NP chez la souris, sont aussi reconnus par les cellules T des souris exposées au virus.

L'ARN et l'ADN semblent être de bons vecteurs pour induire une réponse immune à large spectre : réponse mémoire humorale et cellulaire. Bien que ces deux modes d'administration paraissent très efficaces et soient compatibles avec une immunisation de masse, car peu coûteux, il reste néanmoins des problèmes de sécurité importants, surtout liés à l'utilisation de l'ADN.

Conclusion

Les vaccins vivants administrés par voie nasale (ou orale) stimulent tous les mécanismes immunitaires (anticorps sériques, locaux, et activité de lymphocytes cytotoxiques). Ils provoquent une immunité plus complète, plus large et plus longue que les vaccins inactivés administrés par voie parentérale, même à forte dose. Cependant, les problèmes de stabilité et d'innocuité demeurent.

Les vaccins recombinants vaccine augmentent la réponse hétérotypique (anti-HA et NA) par rapport à un vaccin inactivé ultérieur. Ils sont stables, stimulent les différents mécanismes immunitaires et restaurent ainsi la protection des sujets âgés. Il reste à résoudre les problèmes de tolérance et d'innocuité de la vaccine, ainsi que d'inhibition de la réponse par des anticorps préexistants. L'association de vaccins recombinants, vaccine-HA et vaccine-NP, serait très efficace pour une meilleure stimulation des lymphocytes cytotoxiques hétérologues et hétérotypiques, ce qui pourrait augmenter l'élimination des virus Influenza, même hétérotypiques, du poumon et réduire le risque de pneumopathie.

Plus que la composition protéique du vaccin, les voies et les vecteurs d'administration des vaccins semblent primordiaux. Un vaccin vivant (virus atténué ou virus recombinant vaccine) ou un vecteur, tel que ADN ou

ARN, devrait permettre d'obtenir une réponse CTL comparable à celle induite par l'infection. Avec les vaccins inertes (virus inactivé ou sous unité protéique purifiée), l'adjonction d'un adjuvant ou la formulation (couplage avec la toxine cholérique B, inclusion en microsphères) devrait permettre d'obtenir une meilleure immunité humorale.

Dans tous les cas, pour privilégier l'induction d'IgA sécrétoires, puisque celles-ci sont protectrices, l'administration intranasale semble la meilleure.

Les problèmes de sécurité, liés à ces modes d'administration de l'antigène, doivent être très sérieusement envisagés, aussi bien pour l'utilisation des virus réassortants que pour celle des virus recombinants ou de l'ADN.

BIBLIOGRAPHIE

ADA GL, JONES PD. The immune response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1986. **128.** 1-54.

ADA GL, LEUNG KN, ERTL HCJ. An analysis of effective T cell generation and function in mice exposed to influenza A or sendai viruses. *Immunol Rev.* 1981. **58.** 5-24,

BEN YEHUDA A, EHLEITER D, HU AR, WEKSLER ME. Recombinant vaccinia virus expressing the PR/8 Influenza hemagglutinin gene overcomes the impaired immune response and increased susceptibility of old mice to Influenza infection. *J Inf Dis.* 1993. **168.** 352-357.

BRETT SJ, GAO XM, LIEW FY, TITE JP. Selection of the same major T cell determinants of influenza nucleoprotein after vaccination or exposure to infectious virus. *J Immunol.* 1991. **147.** 1647-1652.

ENDO A, ITAMURA S, IINUMA H, FUNAHASHI S, SHIDA H, KOIDE F, NEROME K, OYA A. Homotypic and heterotypic protection against Influenza virus infection in mice recombinant vaccinia virus expressing the haemagglutinin or nucleoprotein gene of Influenza virus. *J Gen Virol* 1991. **72.** 699-703.

EPSTEIN SI, MISPLON JA, LAWSON CM, SUBBARAO EK, CONNORS M, MURPHY BR. Beta 2-microglobulin-deficient mice can be protected against Influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuramidase. *J Immunol.* 1993. **150.** 5484-5493.

FRIES LF, DILLON SB, HILDRETH JE, KARRON RA, FUNKHOUSER AW, FRIEDMAN CJ, JONES CS, CULLETON VG, CLEMENTS ML. Safety and immunogenicity of a recombinant protein influenza A vaccine in adult human volunteers and protective efficacy against wild-type H1N1 virus challenge. *J Infect Dis.* 1993. **167.** 593-601.

FYNAN EF, WEBSTER RG, FULLER DH, HAYNES JR, SANTORO JC, ROBINSON HL. *Proc Natl Acad Sci. (USA).* 1993. **90.** 478-482.

JENNINGS R, POTTER CW, MC LAREN C. Effect of preinfection and preimmunization on the serum antibody response to subsequent immunization with heterotypic influenza vaccines. *J Immunol.* 1974. **113.** 1834-1843.

JOHNSON MP, MEITIN CA, BENDER BS, SMALL PA Jr. Recombinant vaccinia immunization in the presence of passively administered antibody. *Vaccine.* 1993. **11.** 665-669.

- KILBOURNE ED. *The Influenza viruses and Influenza. Laboratory propagation of Human Influenza viruses.* Academic Press, New York, 1975
- MARTINON F, KRISHNAN S, LENZEN G, MAGNÉ R, GOMARD E, GUILLET JG, LÉVY JP, MEULIEN P. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol.* 1993. **23**. 1719-1722.
- MBAWUIKE IN, WYDE PR, ANDERSON PM. Enhancement of the protective efficacy of inactivated influenza A virus vaccine in aged mice by IL-2 liposomes. *Vaccine.* 1990. **8**. 347-352.
- ROBINSON HI, HUNT LA, WEBSTER RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine.* 1993. **11**. 957-960.
- STUART-HARRIS CH, SCHILD GC, OXFORD JS. *Influenza. The viruses and the disease. Immunity.* 2nd ed, ARNOLD, 1985
- TAMURA M, WEBSTER RG, ENNIS FA. Neutralization and infection-enhancement epitopes of Influenza A virus hemagglutinin. *J Immunol.* 1993. **151**. 1731-1738.
- TAMURA SI, ITO Y, ASANUMA H, HIRABAYASHI Y, SUZUKI Y, NAGAMINE T, AIZAWA C, KURATA T. Crossprotection against Influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intra nasally with cholera toxin B submit. *J Immunol.* 1992. **149**. 981-988.
- TAMURA SI, FUNATO H, HIRABAYASHI Y, SUZUKI Y, NAGAMINE T, AIZAWA C, KURATA T. Cross-protection against influenza A virus infection by passively transferred respiratory tract IgA antibodies to different hemagglutinin molecules. *Eur J Immunol.* 1991. **21**. 1337-1344.
- TAMURA SI. Neutralization and infection-enhancement epitopes of influenza A virus hemagglutinin. *J Immunol.* 1993. **151**. 1731-1738.
- ULMER JB, DONNELLY JJ, PARKER SE, RHODES GH, FELGNER PL, DAWARKI VJ, GROMKOWSKI SH, DERK RR, DEWITT CM, FRIEDMAN A, HAWE LA, LEANDER KR, MARTINEZ D, PERRY HC, SHIVER JW, MONTGOMERY DI, LIU MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein see comments. *Science.* 1993. **259**. 1745-1749.
- WALDMAN RH, BERGMANN KC, STONE J, HOWARD S, CHIDO V, JACKNOWITZ A, WALDAMN ER, KHAKOO R. Age dependant antibody response in mice and humans following oral influenza immunization. *J Clin immunol.* 1987. **7**. 327-332.