

# Nouveaux vaccins et nouvelles perspectives thérapeutiques d'intérêt vétérinaire issus des biotechnologies : exemples d'applications

P. Vannier<sup>(1)</sup> & L. Martignat<sup>(2)</sup>

(1) Agence française de sécurité sanitaire des aliments, B.P. 53, 22440 Ploufragan, France

(2) École nationale vétérinaire de Nantes, P.B. 40706, 44307 Nantes, France

## Résumé

Le concept de vaccins issus des techniques de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) permettant de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés, en association avec un kit de diagnostic approprié, est apparu au cours des dix dernières années. Les principes généraux des vaccins issus des biotechnologies sont rappelés et quelques exemples d'application sont décrits : vaccins contre la maladie d'Aujeszky, la peste porcine classique, la rage, les maladies aviaires, la peste bovine, en discutant de la place de ce type de vaccins dans certains plans de lutte. La catégorie des vaccins à ADN constitue une révolution dans le concept de vaccination, qui reposait sur l'injection d'une protéine ou d'un support exprimant une protéine. Or, il est possible désormais d'induire une immunisation par injection directe du gène codant pour l'antigène immunogène. Des exemples de ce type de vaccins sont décrits. Enfin, la production de molécules biologiques utilisées à des fins thérapeutiques grâce à des techniques de génie génétique est illustrée par quelques exemples relatifs surtout aux bioréacteurs animaux (animaux transgéniques).

## Mots-clés

Acide désoxyribonucléique – Animal transgénique – Application vétérinaire – Bioréacteur animal – Biotechnologie – Recombinaison génétique – Vaccin délété – Vaccin recombinant.

## Introduction

La biologie moléculaire et les avancées technologiques en matière de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ont ouvert une nouvelle ère en vaccinologie, aussi bien dans la conception de nouveaux vaccins que dans les stratégies utilisées pour identifier des antigènes candidats vaccins. Par ailleurs, les biotechnologies ont également des applications effectives et potentielles dans la santé animale, au travers de la production de biomolécules thérapeutiques.

Plus particulièrement, le concept de vaccins « délétés », utilisés en association avec un kit de diagnostic approprié, est apparu aux cours des dix dernières années. Les premiers vaccins de ce type ont été utilisés pour protéger les porcs contre la maladie d'Aujeszky, puis les mêmes

principes ont été appliqués pour développer des vaccins contre la rhinotrachéite infectieuse bovine ou contre la peste porcine classique, relançant, dans ce dernier cas, un débat sur les choix de prophylaxies de type sanitaire ou médical.

Par ailleurs, des vaccins recombinants ont été utilisés pour protéger les espèces aviaires contre la maladie de Newcastle et l'influenza aviaire et, depuis de nombreuses années, un autre vaccin recombinant administrable par voie orale a été utilisé avec succès pour vacciner les animaux sauvages contre la rage.

Une dernière catégorie de vaccins de nouvelle génération, dans leur concept comme dans leurs effets (prophylactiques mais aussi thérapeutiques), est basée sur l'utilisation directe d'ADN recombinant. De tels vaccins ont donné des résultats encourageants dans différentes espèces

et pour différentes maladies, même s'il reste d'importantes étapes à franchir avant qu'ils ne soient commercialisés.

La production de biomolécules à activité thérapeutique ou prophylactique a fait la preuve de sa faisabilité chez différents animaux de production utilisés comme « bioréacteurs ». Le nombre d'applications va sans aucun doute augmenter dans les années qui viennent. Ces applications impliquent en particulier les techniques de transgénèse, éventuellement associées à celles du clonage.

## Principes généraux des vaccins biotechnologiques

### Atténuation contrôlée

Avant le développement des techniques de biologie moléculaire, les souches vaccinales atténuées étaient obtenues par passages en série sur des supports cellulaires ou des espèces hétérologues. Plus tard, l'emploi d'anticorps monoclonaux capables d'exercer une pression de sélection qui favorise l'émergence de mutants apathogènes mais immunogènes a permis d'obtenir des vaccins très efficaces, notamment le vaccin Street Alabama Gif 2 (SAG-2) contre la rage (30).

Les techniques de recombinaison de l'ADN permettent désormais d'enlever (déléter) directement les gènes associés à la virulence de certains agents infectieux ou d'enlever les gènes codant pour des enzymes, qui jouent un rôle dans la réplication du (virus) pathogène dans l'organisme.

### Les vaccins à marqueurs sérologiques

Lorsqu'on délète un gène qui code pour une glycoprotéine dont la fonction n'est pas essentielle, mais qui est associée à la virulence de l'agent infectieux, l'absence d'expression de cette glycoprotéine peut être mise à profit pour créer un vaccin à marqueur sérologique. En effet, la souche vaccinale atténuée n'induit pas d'anticorps spécifiques de la glycoprotéine, qui n'est plus exprimée. Cela permettra de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés, car cette glycoprotéine étant exprimée systématiquement chez les souches sauvages virulentes, tout animal infecté produira des anticorps dirigés contre elle.

### Les vecteurs vivants recombinants

Il existe de très nombreux exemples de vecteurs vivants recombinants exprimant une glycoprotéine immunogène d'un autre agent infectieux. L'un des plus récents et certainement des plus connus, est celui du virus de la

vaccin modifié génétiquement qui exprime une glycoprotéine du virus de la rage et qui a été utilisé avec succès pour lutter contre la rage sylvatique (10).

## Quelques exemples d'application

### Le développement de nouveaux vaccins

#### Maladie d'Aujeszky

Dans un premier temps, les progrès en biologie moléculaire ont contribué à une meilleure connaissance du génome des souches vaccinales existantes. Puis, en étudiant des souches vaccinales classiques, il a été constaté que certaines séquences codantes de la zone courte à séquences uniques de la souche Bartha du virus de la maladie d'Aujeszky étaient délétées. Ces séquences, situées dans le fragment de restriction enzymatique BamH I n° 7 codent pour deux glycoprotéines structurales : gE, gI. Ainsi, la souche Bartha, isolée dans des conditions naturelles, n'exprime pas la gE, ce qui permet de distinguer les animaux vaccinés des porcs infectés, à condition d'utiliser, bien sûr, les kits de l'épreuve immuno-enzymatique (ELISA) correspondants. Ces derniers permettent de détecter, dans le sérum des porcs, les anticorps anti-gE grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux très spécifiques de certains épitopes de la gE, comme l'ont décrit Van Oirschot et coll. (60). Il est à noter que cette stratégie est d'utilisation générale. Ainsi, les vaccins marqueurs délétés gE contre la rhinotrachéite infectieuse bovine en constituent un autre exemple (59).

Dans un second temps, la connaissance de la biologie moléculaire des mutants du virus de la maladie d'Aujeszky a permis de mieux connaître les fonctions des glycoprotéines du virus. Le premier facteur de virulence qui a été identifié chez les herpesvirus est l'enzyme thymidine kinase qui permet au virus de se répliquer dans le système nerveux central. Plus tard, la virulence des souches de virus de la maladie d'Aujeszky n'exprimant pas la glycoprotéine d'enveloppe gE est apparue considérablement diminuée par rapport à celle des virus sauvages (6). Ainsi cette gE semble-t-elle jouer un rôle majeur dans la diffusion du virus au sein du système nerveux, l'infection se propageant aussi bien par voie olfactive que trigéminal (38). Cette connaissance a permis le développement de nouveaux vaccins obtenus par recombinaison génétique. Le génome des souches vaccinales a été alors modifié en utilisant les techniques de recombinaison génétique pour exciser, enlever ou déléter certaines séquences qui codent pour des glycoprotéines alors non exprimées. Ces dernières n'induisent pas d'anticorps chez les animaux vaccinés et sont donc utilisées

comme marqueurs sérologiques. Les fonctions de ces mêmes protéines sont souvent responsables d'une partie de la virulence des souches sauvages (comme la gE) ; leur absence (non-expression) contribue à diminuer ou supprimer le pouvoir pathogène de ces souches vaccinales, qui expriment toujours les glycoprotéines majeures (gB, gC, gD) induisant les réponses immunitaires protectrices chez les porcs vaccinés ou infectés.

Une autre génération de vaccins, non encore commercialisés, est apparue qui utilise des souches vaccinales vivantes du virus de la maladie d'Aujeszky, génétiquement modifiées, comme vecteurs d'expression de gène codant pour les protéines immunogènes d'autres virus comme celui de la peste porcine classique (61). Ces virus « hybrides » protègent l'animal vacciné à la fois contre la maladie d'Aujeszky et contre la peste porcine classique. Par ailleurs, la connaissance approfondie de la biologie moléculaire du virus de la maladie d'Aujeszky a permis la création de recombinants qui ne peuvent être excrétés sous forme infectieuse chez l'animal vacciné. Ces recombinants peuvent cependant disséminer d'une cellule à l'autre de l'organisme infecté, comme le font les souches vaccinales conventionnelles, mais dans des sites assez restreints (24).

La glycoprotéine d'enveloppe gD (gp50) du virus de la maladie d'Aujeszky est essentielle pour que le virus pénètre dans les cellules, mais elle n'est pas indispensable aux étapes ultérieures de la réplication virale. Aussi des mutants n'exprimant pas cette glycoprotéine, mais phénotypiquement complétés, peuvent-ils infecter des cellules de proche en proche. Cependant, les virions descendants de ces clones relargués par les cellules infectées ne sont pas infectieux, puisqu'ils sont incapables d'exprimer la gD (43).

Enfin, il ne faut pas négliger les progrès considérables qui ont été réalisés dans la technologie des adjuvants de l'immunité, même s'ils ne sont pas directement liés à la biologie moléculaire. Ainsi a-t-on vu apparaître des vaccins contre la maladie d'Aujeszky qui sont utilisés en mélangeant extemporanément une souche atténuée vivante avec un adjuvant composé d'huiles minérales. Dans le même temps, la nature des huiles utilisées dans la composition des adjuvants a évolué, comme la technologie des émulsions, rendant les vaccins de plus en plus immunogènes tout en réduisant considérablement les réactions locales au point d'injection.

### La peste porcine classique

Des vaccins de nouvelle génération contre la peste porcine classique sont apparus récemment.

La glycoprotéine E1 du virus a été exprimée par un baculovirus qui se multiplie sur des cellules d'insectes.

Avec cette préparation, additionnée d'un adjuvant constitué d'une émulsion « eau dans l'huile », des porcs ont été vaccinés deux fois par voie intra-musculaire à l'âge de 10 à 12 semaines. Tous les porcs vaccinés ont été totalement protégés contre une épreuve avec la souche virulente « Brescia » (28).

Un autre vaccin sous-unité à marqueurs sérologiques a été élaboré, sur le même principe, qui exprimait la glycoprotéine E1 du virus de la peste porcine classique en baculovirus. L'efficacité de ce vaccin sous-unité a été jugée en prenant en compte deux critères : la protection contre une épreuve virulente et le degré de réduction de la transmission de porc à porc d'un virus sauvage virulent. Il a été montré qu'une seule dose de vaccin protégeait les porcs contre une épreuve virulente, deux semaines plus tard, avec une souche titrant 100 DL<sub>50</sub> par inoculum. Cependant, dans cet essai, le virus d'épreuve a été transmis d'un porc vacciné à un porc témoin. En revanche, entre trois semaines et six mois après la vaccination, les porcs n'ont présenté aucune manifestation clinique de la maladie et n'ont pas transmis le virus d'épreuve à des porcs placés à leur contact (40).

Par ailleurs, une souche vaccinale du virus de la maladie d'Aujeszky (« souche 783 ») a été utilisée comme vecteur d'expression du gène codant pour la glycoprotéine E1 du virus de la peste porcine classique (39, 61).

Enfin, la souche chinoise (« souche C ») protège effectivement les porcs contre la peste porcine classique. Utilisée depuis des décennies comme vaccin, elle est considérée comme la plus efficace et la plus sûre des souches vaccinales vivantes. Cependant, comme d'autres produits conventionnels, ce vaccin ne permet pas de différencier sérologiquement les porcs vaccinés des porcs infectés avec une souche sauvage. Un vaccin à marqueur sérologique a donc été développé à partir de la souche chinoise C. Entre autres, un virus hybride a été construit par génie génétique. Dans ce but, le gène qui code pour la partie antigénique N-terminale de la glycoprotéine E2 de la souche C a été remplacé par les séquences de la souche « Brescia » codant pour la partie équivalente de la glycoprotéine E2 de cette souche. Cette substitution de gène permet de différencier ce virus hybride de la souche « Brescia » et de la souche parentale C, grâce à l'utilisation combinée d'anticorps monoclonaux spécifiques de la souche Brescia et de la souche C (39).

La plupart de ces vaccins en sont encore au stade expérimental, mais certains ont obtenu une autorisation de mise sur le marché, bien qu'ils ne soient pas utilisés en Europe du fait de son statut indemne. De plus, des améliorations sont en cours pour les kits de diagnostic associés à l'utilisation de ces vaccins. Ils permettent tous, en principe, de différencier les porcs vaccinés des porcs infectés par une souche virulente.

## Impact des nouveaux vaccins sur les programmes de contrôle

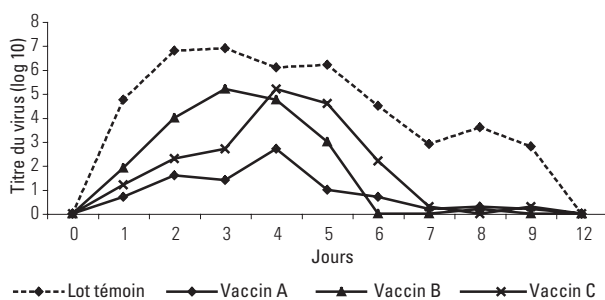
### Contrôle de la maladie d'Aujeszky

L'utilisation de vaccins déléétés à marqueurs sérologiques a constitué un progrès considérable dans les programmes de lutte contre la maladie d'Aujeszky.

D'une part, ces vaccins ont rendu possible les vaccinations de masse, tout en conservant les moyens du diagnostic sérologique. Cela a permis de repérer les élevages vaccinés et infectés et d'y appliquer les mesures nécessaires pour éviter que le virus sauvage ne diffuse hors de ces élevages.

D'autre part, dans les élevages vaccinés et infectés, il est devenu possible de mettre en œuvre des mesures progressives d'assainissement en réformant, plus ou moins rapidement, les truies infectées. Ces dernières ont été détectées grâce à un dépistage sérologique utilisant la technique ELISA qui permet de distinguer les porcs vaccinés de ceux qui sont vaccinés et infectés.

Dans ces conditions, la vaccination a des effets qui se conjuguent pour permettre de réaliser le programme de prophylaxie en toute sécurité. La vaccination de masse réalisée plusieurs années de suite limite la quantité de virus excrétée dans l'air par les porcs infectés (Fig. 1) et permet ainsi de diminuer considérablement la probabilité et l'importance de la transmission aérienne du contagion entre élevages (44, 58). De plus, la vaccination systématique évite les pertes économiques dues à une infection mal contrôlée. En conséquence, après plusieurs années de vaccination dans un pays ou une région, la prévalence de l'infection diminue progressivement grâce aux mesures d'assainissement mises en place dans les élevages infectés et à la réforme continue des truies les plus âgées et infectées ; par ailleurs, l'incidence de l'infection demeure très faible et reste sous contrôle.

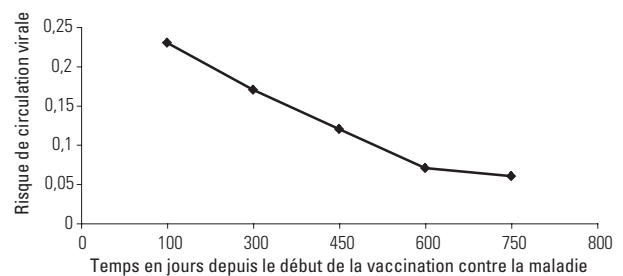


**Fig. 1**  
Titre moyen de virus de la maladie d'Aujeszky excrété par des porcs ayant reçu trois vaccins différents et par des porcs témoins non vaccinés

Cependant, le prix de la vaccination doit être pris en compte dans le calcul du coût total d'une prophylaxie mise en œuvre.

Si les informations disponibles étaient limitées dans le cadre de la seule prophylaxie médicale, une publication apporte un éclairage tout à fait intéressant sur les coûts cumulés des différentes stratégies prophylactiques (65). Ses auteurs montrent bien que le risque de circulation virale en porcherie d'élevage diminue fortement après la mise en place d'un programme de vaccination efficace, mais ils montrent également que la courbe de régression du risque étant de nature asymptotique, ce risque persiste à un niveau faible, mais durable (Fig. 2).

Les mêmes auteurs ont par ailleurs comparé les coûts cumulés, sur dix ans, des différentes mesures de lutte contre la maladie d'Aujeszky dans le nord de l'Allemagne après la mise en place de la prophylaxie (Tableau I). Parmi les cinq stratégies possibles, la plus économique est la stratégie dite « G4 » qui est basée sur une vaccination systématique suivie d'un dépistage des élevages infectés,



**Fig. 2**  
Risque de circulation du virus de la maladie d'Aujeszky (65)

**Tableau I**  
Coûts totaux, estimés en 1996, des différentes mesures de lutte contre la maladie d'Aujeszky en Allemagne sur les dix ans qui ont suivi le démarrage de la prophylaxie (65)

Stratégie	Mesures alternatives	Coût cumulé sur dix ans (en milliers d'ECU*)
G1	Vaccination des truies deux fois par an	18 085
G2	Vaccination des truies trois fois par an	18 143
G3	Vaccination des truies trois fois par an et des porcs charcutiers une fois par an	13 534
G4	Vaccination des truies trois fois par an et des porcs charcutiers une fois par an. Contrôles sérologiques et abattage des porcs présentant des anticorps infectieux (quand la prévalence est < 10 %)	9 907
G5	Contrôle et abattage des porcs possédant des anticorps infectieux	19 342

\* Taux de conversion au 1<sup>er</sup> janvier 1999 : 1 ECU = 1 euro

associé à l'abattage des truies possédant des anticorps. Il est bien évident qu'il s'agit d'un coût cumulé prenant toutes les dépenses en compte : celles de l'État, celles des structures professionnelles et celles des éleveurs. Les auteurs constatent que, les deux premières années, la prévalence de l'infection diminue, mais que la vaccination seule est insuffisante pour éliminer l'infection ; au cours des dernières années du programme, le virus de la maladie d'Aujeszky persiste dans un petit nombre d'élevages. Après trois ans et demi de vaccination, il reste peu d'élevages abritant encore des sujets reproducteurs infectés. La détection et l'élimination de ces reproducteurs entraînent une chute brutale de la prévalence de l'infection dans les troupeaux reproducteurs, alors que le risque d'infection des élevages engraisseurs (ou des sujets engraisés dans d'autres élevages) devient nul (65).

Ainsi, à la lumière des expériences présentes et passées, il devient possible d'élaborer une stratégie d'utilisation des vaccins pour le contrôle de la maladie d'Aujeszky.

### Contrôle et éradication de la peste porcine classique

Après la grave épizootie qui a frappé plusieurs pays européens en 1997, nombreux sont ceux qui estiment que l'utilisation des vaccins de nouvelle génération à marqueurs sérologiques pourrait éviter une nouvelle catastrophe zoonositaire.

Si l'intérêt de ces vaccins ne fait aucun doute, il faut néanmoins réfléchir à leur utilisation et en apprécier les limites. Si l'on analyse, par exemple, la situation lors de l'apparition des premiers foyers aux Pays-Bas, il s'est avéré que plus de 22 élevages étaient déjà infectés lorsque le foyer primaire de la région de Venhorst a été identifié, le 4 février 1997. La situation est devenue rapidement dramatique dans la région car les éleveurs avaient commercialisé des porcelets, avant que l'administration vétérinaire ne puisse isoler la zone infectée. Ce comportement a entraîné l'extension rapide de l'infection dans le sud du pays. Or, au début d'une épizootie, le succès des mesures de contrôle dépend de la rapidité de leur mise en œuvre après l'apparition du premier foyer. Une vaccination ne peut être substituée aux mesures de base pour la lutte contre les maladies contagieuses.

Dans ces circonstances, l'utilisation d'un vaccin à marqueur sérologique ne changerait pas radicalement les données du problème, car elle n'évite pas la nécessité d'intervenir sur les animaux potentiellement infectés, de les identifier, de prélever du sérum avant tout transport et donc de pouvoir contrôler strictement le mouvement des porcs. Au début d'une épizootie, dans des régions comportant une densité élevée d'élevages de porcs, une vaccination en anneau pourrait tout de même être envisagée pour éviter une réplique trop rapide du virus et limiter le coût des abattages préventifs. Mais dans ce cas,

la transmission du virus doit être limitée et les mesures de contrôle doivent être réellement appliquées et efficaces. De plus, il faut que les propriétés de ces vaccins soient adaptées aux situations d'urgence.

Enfin, comme pour la maladie d'Aujeszky, les vaccins de nouvelle génération peuvent rendre de grands services aux pays en développement qui ne peuvent envisager une éradication, mais souhaitent tout de même contrôler certains secteurs de la filière et limiter la diffusion du virus, tout en maintenant une couverture vaccinale.

## Les vaccins de nouvelle génération utilisant des vecteurs d'expression

Parmi de nombreux vecteurs recombinants utilisés, les poxvirus offrent des avantages certains du fait de leur grande résistance dans le milieu extérieur permettant leur utilisation dans des conditions relativement extrêmes, leur distribution dans des appâts pour la vaccination, par voie orale, de la faune sauvage ou leur distribution dans l'eau de boisson pour une vaccination de masse dans les élevages industriels, notamment aviaires.

### Vaccin contre la rage

Le seul vaccin à usage vétérinaire commercialisé utilisant comme vecteur d'expression le poxvirus recombinant de la vaccine, est un vaccin antirabique administré par voie orale (68). Ce vaccin est administré aux renards en Europe ainsi qu'aux rats laveurs, aux mouffettes ou aux coyottes en Amérique du Nord, ces espèces étant les principaux réservoirs du virus rabique sur les deux continents. Ce vaccin recombinant a été élaboré en insérant le gène codant pour la glycoprotéine G du virus rabique dans le génome de la souche « Copenhague » du virus de la vaccine, une des souches utilisées pour la vaccination contre la variole humaine (8). La plus grande résistance du poxvirus recombinant aux fluctuations thermiques rencontrées dans l'environnement, par rapport à celle des souches vaccinales naturellement atténuées du virus rabique, en fait un vaccin idéal pour être inclus dans les appâts qui sont dispersés dans la nature. Le pouvoir antigénique du vaccin reste stable pendant plusieurs mois, même après plusieurs cycles de congélation-décongélation.

De très nombreux essais ont été conduits en station expérimentale pour démontrer la parfaite innocuité de ce vaccin chez les espèces animales domestiques, sauvages et de laboratoire. Ces travaux ont été suivis par des essais de vaccination d'animaux sauvages en Europe et aux

États-Unis d'Amérique. Entre 1989 et 1995, environ 8,5 millions de doses de ce vaccin ont été dispersées sur le terrain sans aucun problème, démontrant l'efficacité de la vaccination à grande échelle de la faune sauvage à l'aide d'un vaccin recombinant. De plus, en Europe de l'Ouest, l'utilisation de vaccins de nouvelle génération (dont le vaccin SAG-2) a conduit à la disparition de la rage sylvatique de vastes régions de plusieurs pays (20). L'absence prolongée de cas de rage dans ces régions indique sans ambiguïté que le virus rabique a été éliminé des populations animales sauvages (10).

### Vaccins contre les maladies aviaires

Un vaccin recombinant contre la maladie de Newcastle a été élaboré en utilisant comme vecteur d'expression un vaccin atténué contre la variole aviaire. Dans ce vecteur ont été insérés les gènes codant pour les protéines RN et F du virus de la maladie de Newcastle. Ce vaccin est commercialisé aux États-Unis d'Amérique depuis 1994 (33). Par ailleurs, le gène hémagglutinant du virus influenza aviaire a été inséré dans un vecteur-vaccin atténué de la variole aviaire et le recombinant obtenu s'est révélé capable de protéger les poussins contre une épreuve virulente avec un virus influenza aviaire. Le Département d'Agriculture des États-Unis d'Amérique (USDA) a d'ailleurs interdit l'utilisation de vaccins conventionnels contre l'influenza aviaire afin de ne pas compromettre les programmes de dépistage sérologique visant à éradiquer l'infection, les vaccins recombinants étant utilisés comme vaccins à marqueurs sérologiques (68).

### Vaccins contre la peste bovine

La peste bovine est l'une des maladies virales contagieuses les plus graves des bovins et des buffles. L'un des obstacles aux campagnes d'éradication de cette maladie est la relative thermolabilité des vaccins actuellement disponibles. Dans le but de produire un vaccin doté d'une meilleure thermostabilité, trois vaccins recombinants différents ont été produits (68). Le premier exprime le gène codant pour la protéine H du virus de la peste bovine utilisant comme vecteur la souche atténuée de la vaccine « LC16mO ». Le second exprime les deux gènes codant pour les protéines H et F du virus de la peste bovine utilisant la souche atténuée « Wyeth » de la vaccine comme vecteur. Enfin, le troisième associe deux recombinants qui expriment chacun la protéine H ou F du virus de la peste bovine utilisant comme vecteur un poxvirus caprin atténué. Le premier de ces vaccins a fait l'objet de nombreux essais, en conditions confinées, en vue de vérifier son efficacité vis-à-vis d'une épreuve virulente. Son innocuité pour les bovins, sa stabilité génétique après plusieurs passages chez les bovins et la durée de l'immunité induite (supérieure à un an) ont été confirmées. La thermostabilité de ce vaccin est excellente, quand il est lyophilisé (68).

## Vaccins à acide désoxyribonucléique

### Principes et avantages des vaccins à acide désoxyribonucléique

Cette catégorie de nouveaux vaccins constitue une révolution (1, 22, 53). En effet, jusqu'ici le concept de vaccination reposait sur l'administration de protéines, isolées ou exprimées à la surface d'une souche vaccinale. Or, il est également possible d'induire une immunisation par injection directe du gène correspondant à l'antigène immunogène, intégré dans un vecteur d'expression plasmidique. Cet ADN est donc transcrit, puis traduit *in situ* chez l'animal ou le sujet vacciné, en une protéine qui déclenche la réponse immunitaire (50, 66).

Ce concept donne lieu depuis une décennie à une production scientifique considérable qui reflète l'intérêt de cette démarche, même si pour le moment, quelques vaccins humains seulement sont en cours d'évaluation (phases I et II), avec des résultats mitigés ([www.dnavaccine.com](http://www.dnavaccine.com)).

Ces vaccins n'étant pas capables d'intégration dans le génome de l'hôte, leur expression est transitoire, mais néanmoins suffisamment durable pour induire une forte réponse immunitaire protectrice, au moins chez la souris. Ceci suggère que la vaccination à ADN pourrait être utilisée, non seulement à titre préventif, mais également comme traitement thérapeutique une fois que le contact avec le pathogène a eu lieu. La vaccination à ADN présente ainsi d'énormes potentialités pour la prévention de maladies infectieuses, particulièrement contre des agents intracellulaires (virus, parasites intracellulaires, mycobactéries), mais aussi comme le démontrent les modèles animaux, pour les maladies allergiques, auto-immunes, les cancers.

Les principaux avantages de la vaccination à ADN sont :

- une production endogène de l'antigène, particulièrement pour les antigènes viraux, qui permet des modifications post-traductionnelles mimant l'infection naturelle ;
- une présentation à la fois dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II, permettant la mise en jeu des composantes humorales et cellulaires de la réponse immunitaire (56). En fonction du mode d'injection du vaccin, il est même possible de créer un biais au profit des lymphocytes CD4+ de type Th1, favorisant ainsi l'induction d'une réponse cellulaire cytotoxique médiée par des lymphocytes CD8+. Différents travaux ont montré qu'il était possible d'orienter la réponse immunitaire vers la réponse protectrice recherchée (humorale ou cellulaire, par la co-expression de vecteurs produisant des cytokines (IL-4, et IL-12 respectivement) (14, 22) ;

- l'expression relativement durable de l'antigène, d'où une protection de longue durée. Par exemple, une réponse cellulaire est détectée plus d'un an après vaccination intradermique avec un plasmide contenant le gène d'une protéine du virus de la grippe (55) ;
- la possibilité de multiplier le nombre de gènes codant pour différents antigènes (polyvalence), et même d'améliorer l'immunogénicité d'un antigène du pathogène sous forme de protéines de fusion (avec un antigène très immunogène d'un autre virus par exemple) ;
- l'absence de réaction au site d'injection, liée à l'absence d'utilisation d'adjuvant. Il est d'ailleurs à noter que l'ADN du plasmide, lui-même, pourrait jouer un rôle d'adjuvant de l'immunité (voir ci-dessous) ;
- la possibilité, particulièrement intéressante, que la vaccination à ADN induise une réponse immunitaire chez les nouveaux-nés, même en présence d'anticorps maternels (31) ;
- la vaccination à ADN pourrait également permettre de produire très rapidement un vaccin contre un nouvel agent pathogène. Après isolement de ce dernier et séquençage de son génome, il est en effet possible d'en tester des fragments, sous forme d'ADN recombinants, directement chez l'animal, afin de déterminer ceux dont les produits sont immunogènes et induisent une protection efficace (4). L'utilisation des outils de bio-informatique pour identifier les gènes codant des protéines immunogènes est également d'un grand intérêt ;
- d'un point de vue pratique et économique, ces vaccins sont plus faciles à préparer que les vaccins « classiques », ne nécessitent ni cultures, ni purification coûteuses de l'antigène. Ils posent moins de problèmes de stabilité et de stockage que des vaccins « protéiques » (température). Ceci constitue un avantage majeur pour les pays en développement.

### **Quelques exemples d'essais de vaccins à acide désoxyribonucléique dans le domaine vétérinaire**

Aucun vaccin à ADN n'est actuellement disponible en médecine humaine ou vétérinaire. Ces approches nécessitent en effet d'importants progrès techniques avant la mise au point de vaccins performants. Surtout, et contrairement à la souris, l'homme, le singe et les grands animaux développent à la suite de la vaccination à ADN une réponse immunitaire en général trop faible pour conférer une protection. Les voies de recherche actuelles se focalisent donc essentiellement, sur la mise au point de stratégies visant à augmenter cette réponse immunitaire. En dépit de ces obstacles, et compte tenu de leurs avantages potentiels considérables, des vaccins à ADN devraient être mis sur le marché dans un avenir relativement proche.

Des essais de vaccins à ADN vétérinaires ont lieu pour différentes espèces et contre des pathogènes variés (2, 5, 42). Une attention particulière est portée aux maladies affectant les bovins, les porcs et les volailles, pour lesquelles des essais de vaccination à ADN sont engagés avec des résultats préliminaires encourageants.

Des résultats très récents chez le poulet suggèrent qu'une protection au moins partielle pourrait être obtenue par vaccination à ADN contre le virus responsable de la maladie de Gumboro (27, 29). Dans ces deux études, les vaccins à ADN utilisés exprimaient la protéine virale VP2, seule ou en association avec de l'interleukine-2. Des résultats encourageants ont également été obtenus par vaccination à ADN contre le virus de la diarrhée virale bovine chez le veau (41), ou encore contre le virus syncytial respiratoire bovin (52).

Ces résultats très récents suggèrent des avancées déterminantes vers la mise au point de vaccins à ADN vétérinaires. Néanmoins, la littérature sur le sujet fait apparaître des avancées modestes depuis une décennie.

Ceci est en particulier illustré dans l'espèce bovine par un travail très important réalisé sur la vaccination à ADN contre l'herpèsvirus bovin (BHV)-1, en particulier par une équipe canadienne. La démonstration de principe d'une telle approche a été initialement réalisée chez la souris (16). Cette approche a donné initialement des résultats préliminaires encourageant chez les veaux (57), notamment sur l'augmentation de la rapidité d'élimination du virus chez les veaux vaccinés ainsi que sur l'accélération d'apparition d'anticorps neutralisants. Cependant une protection efficace contre une épreuve virale n'a pu être obtenue (13). Toujours chez les bovins, la vaccination à ADN contre *Mycobacterium bovis* ne permet pas de protection contre une épreuve d'infection par l'agent de la tuberculose (64).

Il est donc nécessaire, chez les bovins comme chez tous les grands animaux, de développer différentes stratégies susceptibles d'augmenter l'impact de la vaccination à ADN (2).

### **Améliorer l'efficacité des vaccins à acide désoxyribonucléique dans le domaine vétérinaire**

Les stratégies actuellement testées visent schématiquement et de façon complémentaire, à augmenter la transfection du vaccin à ADN, l'expression de la protéine correspondante, ou encore à stimuler la réponse immunitaire. Une autre possibilité prometteuse, consiste à réaliser une primo-immunisation suivie d'un rappel, en associant un vaccin à ADN et un vaccin recombinant ciblant le même antigène.

Concernant l'amélioration des constructions génétiques des vaccins à ADN, des efforts portent sur l'amélioration des promoteurs utilisés et/ou des séquences codantes. Cela concerne le choix de codons « eucaryotes » plutôt que de certains codons rares dans la séquence codant pour l'antigène ; la présence éventuelle d'intron qui pourrait, au moins dans certains cas, améliorer la stabilité et le transport des messagers ; le choix de la nature et de la force des promoteurs utilisés pour la transcription de l'acide ribonucléique (ARN) messenger ; l'addition éventuelle de séquences destinées à faciliter le transport intracellulaire du vaccin à ADN (séquences de localisation nucléaire).

Une autre voie d'amélioration possible très étudiée, vise à augmenter la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis du vaccin à ADN, en réalisant une co-stimulation immunologique. On espère ainsi augmenter les chances d'obtenir une protection. Cette co-stimulation peut être obtenue par des moyens variés.

Une première possibilité correspond à un effet « adjuvant ». Les séquences d'origine bactérienne des vecteurs utilisés dans les vaccins à ADN possèdent en effet des motifs « CpG ». Ces motifs, reconnus par des récepteurs de type « Toll » des cellules présentatrices d'antigène (en particulier les cellules dendritiques), vont potentialiser la réponse immunitaire. Ainsi l'addition de séquences CpG à un vaccin à ADN contre une protéine modifiée « gD » du BHV-1 permet d'augmenter la réponse primaire à cet antigène (45). L'effet de ces CpG (et de leur nombre) dans le vaccin à ADN serait variable en fonction des espèces.

La réponse immunitaire peut également être potentialisée par la présence de cytokines. Une solution élégante consiste à faire exprimer ces molécules localement, également à partir de constructions génétiques. La production de cytokines crée un micro-environnement favorable à l'attraction de cellules présentatrices d'antigène et à l'inflammation. Chez le porc, l'utilisation d'interféron gamma et d'interleukine-2 avec un vaccin à ADN contre le virus responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin peut ainsi augmenter son efficacité (67). De façon similaire, la co-administration d'un plasmide codant pour un facteur de croissance et de différenciation (GM-CSF) augmente l'effet d'un vaccin à ADN « Aujeszky » (49).

Différentes études testent également la possibilité d'augmenter la réponse à un vaccin à ADN, en activant la co-stimulation entre cellule présentatrice d'antigène et lymphocyte T. Un tel effet a pu être démontré avec un vaccin à ADN chez le mouton (34), même si cet effet semble spécifique d'espèce (35). Dans le cas de la tuberculose, toujours chez les bovins, un vaccin à ADN devient efficace si on réalise conjointement une co-stimulation par des molécules B7, ligand du CD28 des LcT (37).

La voie, ainsi que le site d'administration des vaccins à ADN font l'objet de nombreux essais. Il est possible d'administrer le vaccin en intradermique, intramusculaire, nu ou associé à différentes formulations destinées à faciliter son passage trans-membranaire. On peut également utiliser la biolistique (le vaccin est alors associé à des particules d'or, et envoyé à travers la peau sous pression). Récemment l'efficacité de transfection a été améliorée par l'utilisation de méthodes d'électroporation non invasives lors de l'injection (3, 54). Le ciblage des muqueuses par administration du vaccin à ADN en suppositoire a fait l'objet d'essais encourageants chez les bovins, concernant le BHV (32).

Une autre piste de recherche, distincte ou associée aux précédentes, vise à augmenter la réponse immunitaire en associant pour un antigène particulier, une administration de vaccin à ADN avec un rappel réalisé avec un vecteur viral recombinant (stratégie du « *prime/boost* », 46). Cette approche démontre une augmentation de l'immunisation très importante par rapport à la double injection d'un même vaccin. Un vaccin à ADN codant pour un antigène de l'agent de la tuberculose bovine a ainsi été utilisé avec succès, comme immunisation primaire, associé à un rappel par un « poxvirus » recombinant pour le même antigène (51). L'inverse, c'est-à-dire une primo-vaccination par un vecteur vaccinant, suivie d'un rappel par un vaccin à ADN, semble également donner de bons résultats, en particulier dans le cas du ciblage des muqueuses (18). Toujours pour la tuberculose, l'immunisation primaire avec le bacille de Calmette et Guérin (48), ou avec un antigène recombinant adjuvé (62), suivie d'un rappel par un vaccin à ADN, permettrait également d'obtenir une protection contre le pathogène chez les bovins.

Des porcelets ont été vaccinés avec succès, avec des plasmides composés de gènes codant pour la protéine Orf2 du circovirus porcin de type 2 associé avec le syndrome de la maladie d'amaigrissement du porcelet (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* : PMWS) associé à un gène codant pour le GM-CSF (7).

## Production de biomolécules à intérêt thérapeutique et vétérinaire

### Différentes solutions biotechnologiques pour la production de biomolécules

Un nombre croissant de molécules biologiques utilisées à des fins thérapeutiques en médecine humaine mais aussi vétérinaire, sont actuellement produites grâce à des techniques de génie génétique. Différents systèmes de production sont possibles.



Comme c'est le cas des antigènes des vaccins recombinants sous-unités, des protéines peuvent être synthétisées par culture *in vitro* de cellules isolées, génétiquement modifiées (11). Différents types de cellules sont utilisables, des plus faciles à manipuler et des moins coûteuses (bactéries, levures), à des cellules eucaryotes plus « sophistiquées », c'est-à-dire capables de réaliser un certain nombre de modifications post-traductionnelles spécifiques, souvent indispensables à une activité biologique. C'est par exemple le cas des glycosylations de certaines hormones et facteurs de croissance. On utilise alors des cellules d'insectes, ou de mammifères. Ces systèmes, s'ils sont évidemment satisfaisants sur le plan qualitatif, présentent quantitativement des rendements beaucoup moins importants que ceux des cellules précédentes. Ils sont également plus difficiles à maîtriser et plus coûteux.

L'immense majorité des biomolécules à intérêt thérapeutique sont actuellement produites par ces « bioréacteurs cellulaires ». Par rapport à l'extraction à partir de matériel biologique, ce mode de production constitue un progrès considérable : il évite les problèmes d'approvisionnement en organes, les techniques lourdes d'extraction, et surtout les importants problèmes de sécurité sanitaire en regard de la possible transmission d'agents pathogènes à « l'utilisateur » animal ou humain.

L'Union européenne a ainsi accordé une autorisation de mise sur le marché à plus de 80 protéines recombinantes (63). L'essentiel de ces molécules concerne la santé humaine. Elles se répartissent en cinq grandes classes : les hormones, les cytokines, les produits sanguins solubles, des vaccins, et des anticorps monoclonaux. Les deux premières catégories représentent à elles seules la moitié des produits biotechnologiques autorisés. Il est notable qu'un certain nombre de biomolécules destinées à la santé animale font partie de cette liste. Ce nombre devrait donc logiquement s'accroître dans les années qui viennent.

Les systèmes cellulaires ne sont néanmoins pas toujours satisfaisants en termes de qualité, de quantité et de coût, surtout si l'on doit utiliser des cellules mammifères. La production de molécules « hétérologues » à grande échelle dans des plantes est également envisagée (19). Pour diverses raisons, il semble que cette stratégie intéressante ne soit pas à privilégier comme source possible de médicaments à court terme. En effet, il existe une limitation importante en termes de rendement dans la production par les plantes de molécules hétérologues. De plus, les organismes génétiquement modifiés végétaux présentent un risque important de dissémination et leur acceptabilité sociétale reste difficile. En dépit de quelques travaux encourageants sur les « bioréacteurs végétaux », il semble que des applications plus nombreuses et plus précoces émergent plutôt de « bioréacteurs animaux ».

## Les animaux transgéniques producteurs de biomolécules

Un certain nombre de molécules biologiques utilisées à des fins thérapeutiques, peuvent déjà être produites par des mammifères génétiquement modifiés. Il est en effet possible d'introduire et de faire exprimer de façon stable un gène dans un organisme qui ne le possède pas initialement. Différentes techniques de « transgénèse » sont disponibles (17, 25, 26). L'une des plus utilisées est la micro-injection du « transgène » dans un œuf fécondé (21). Dans de rares cas favorables, il y a intégration stable dans le génome de l'embryon au cours des divisions cellulaires. Les embryons sont ensuite réimplantés chez des femelles pseudo-gestantes. Celles-ci pourront éventuellement donner naissance à des animaux porteurs du « transgène ». Ces « fondateurs » permettront de créer une lignée d'animaux « transgéniques ». Cette technique de transgénèse est maintenant bien maîtrisée chez différentes espèces incluant de gros animaux (lapin, porc, mouton, chèvre, porc, vache), même si son rendement reste limité à environ 1 %. Le coût d'obtention d'un animal transgénique peut donc constituer un facteur limitant, en particulier pour des espèces à long temps de génération. D'autres techniques de transgénèse devraient permettre des développements ultérieurs prometteurs : l'utilisation de cellules souches embryonnaires à la place d'œufs fécondés (actuellement limitée à certaines espèces uniquement), et surtout l'association des techniques de clonage des mammifères par transfert nucléaire, avec un transfert de gène *in vitro* (15, 47).

La liste des protéines déjà produites par transgénèse s'allonge, mais aucune n'est encore commercialisée. Sont concernés en particulier les produits sanguins, labiles comme l'hémoglobine, ou stables comme certains facteurs de la coagulation, l'albumine, des facteurs anti-protéasiques. Un certain nombre d'hormones humaines font également l'objet de tels travaux, comme les hormones gonadotropes impliquées dans la reproduction, l'érythropoïétine impliquée dans le développement des précurseurs des cellules sanguines, l'hormone de croissance et certaines lymphokines. Plus d'une dizaine de molécules produites par des animaux transgéniques (mouton, chèvre, lapin, taureau, porc) sont en cours ou en attente d'essais cliniques. Les principales sont la protéine C humaine, l'activateur du plasminogène tissulaire (hTPA), les facteurs VIII et IX qui possèdent des activités anticoagulantes, l'alpha-1 anti-trypsine ( $\alpha_1$ AT), l'hormone de croissance (hGH), le facteur de croissance (IGF-1), la lactoferrine (hLF) et le lysozyme doués de propriétés antibactériennes, et l'hémoglobine. Les concentrations obtenues sont très variables (quelques dizaines de microgrammes par litre pour la hGH par exemple, à quelques dizaines de grammes pour le hTPA).

Une caractéristique importante des techniques de transgénèse est la possibilité de cibler l'expression du

transgène dans un compartiment ou un organe donné (glande mammaire, vessie, liquide séminal, blanc d'œuf). On utilise pour cela un transgène incluant un promoteur spécifique du tissu cible (par exemple celui de la protéine acide du lactosérum, ou de la caséine, pour la glande mammaire). L'accumulation des protéines recombinantes, et leur purification éventuelle ultérieure peuvent ainsi être facilitées. Le ciblage du transgène vers la glande mammaire est particulièrement intéressant et a donc été utilisé en particulier pour la production des molécules présentées ci-dessus, avec différentes constructions génétiques et chez différentes espèces (25).

Comme pour les vaccins à ADN, c'est la « bonne combinaison » de régions régulatrices et du gène à exprimer qui détermine en grande partie l'obtention de quantités significatives d'une protéine. Un autre paramètre déterminant est de veiller à l'absence d'interférence avec le développement ou les fonctions physiologiques de la glande mammaire (la molécule produite peut en effet être active au-delà de la barrière d'espèce).

Contrairement à une idée reçue, la vache laitière n'est pas l'organisme transgénique de choix. La truie, au contraire, ou la lapine, en particulier pour leurs caractéristiques de reproduction (période de gestation courte, premières portées précoces, prolificité), sont plus attractives. La truie, par exemple, produit des quantités importantes de lait (environ 300 l/an), et peut être élevée en conditions sanitaires contrôlées (12).

Porc et lapin, en particulier, ont été retenus comme « bioréacteur transgénique idéal » pour la production de molécules thérapeutiques pour l'homme. À titre d'exemple, l'entreprise française Bioprotein travaille en collaboration avec l'Institut national de la recherche agronomique pour la production dans le lait de lapines transgéniques d'anticorps monoclonaux destinés au traitement de cancers ([www.bioprotein.com](http://www.bioprotein.com)). L'entreprise néerlandaise Pharming a également adopté cette stratégie, et présente un certain nombre de molécules en cours d'essais cliniques chez l'homme (inhibiteur recombinant humain C1 en essai de phase III ; collagène recombinant humain en essai préclinique de phase I ; essai clinique terminé pour la lactoferrine recombinante humaine) ([www.pharming.com](http://www.pharming.com)).

D'autres entreprises comme TGN Biotech Inc. (Canada) ont privilégié la production de molécules thérapeutiques dans le liquide séminal de porcs transgéniques (hormone folliculo-stimulante humaine [FSH]) ([www.tgnbiotech.com](http://www.tgnbiotech.com)).

PPL Therapeutics en Écosse et GTC Biotherapeutics aux États-Unis d'Amérique, pionniers en la matière, utilisent également le mouton et la chèvre, avec différentes molécules en cours d'essais cliniques (h $\alpha$ ,AT, anticorps monoclonaux) ([www.ppl-therapeutics.com](http://www.ppl-therapeutics.com) et [www.transgenics.com](http://www.transgenics.com), respectivement).

Il existe donc un réel débouché pour la synthèse de biomolécules par des animaux de production. Ces techniques peuvent également servir à la production de protéines utiles chez l'animal : des animaux transgéniques résistant à certains pathogènes ou présentant des caractères d'intérêt économique ont été produits (25).

## Des médicaments non protéiques ?

Les progrès du génie génétique permettent de tester de nouvelles possibilités d'intervention thérapeutique, basées sur l'utilisation non pas de protéines mais d'acides nucléiques (nous l'avons déjà évoqué concernant les vaccins à ADN). Ce n'est pas la seule possibilité, puisqu'un médicament nucléique a déjà été mis sur le marché en Europe et aux États-Unis d'Amérique. Il s'agit d'un ARN antisens (Vitravene), capable de se complexer, et donc de bloquer l'expression d'un ARN messenger du cytomégalovirus humain. Néanmoins les exemples dans ce domaine sont, actuellement, extrêmement limités.

Plus récemment, la découverte des ARN interférents, capables d'induire *in vivo* une destruction enzymatique ciblée, d'un ARN donné, permet d'envisager des perspectives thérapeutiques importantes (23), en particulier dans le domaine des maladies infectieuses chroniques (35) et des cancers. L'enthousiasme justifié soulevé par cette découverte, et les travaux sur le sujet qui s'accumulent, sont encore loin de pouvoir fournir des retombées positives en clinique humaine, et encore moins dans le domaine vétérinaire. L'exemple des vaccins à ADN (voir ci-dessus) démontre qu'il est nécessaire de franchir un certain nombre d'étapes fondamentales avant d'espérer la mise sur le marché d'un nouveau médicament « révolutionnaire ».

## Conclusion

Les techniques de recombinaison de l'ADN ont déjà permis depuis plus d'une décennie d'améliorer les vaccins vétérinaires « classiques », par exemple en renforçant leur innocuité. C'est le cas pour les vaccins biotechnologiques de première génération, comme les vaccins sous-unités recombinants (les plus nombreux à avoir donné lieu à des applications commerciales). Leur production en système cellulaire est réalisée à moindre coût, et renforce leur sécurité d'utilisation par rapport à ceux produits par les méthodes d'extraction « classiques ». Il est également possible, grâce aux techniques de génie génétique, de cibler précisément l'atténuation de différents pathogènes, et de créer des vaccins multivalents. Différents vaccins vétérinaires sont déjà disponibles dans la catégorie de l'atténuation ciblée de souches vaccinales. Cette stratégie permet également de conférer de nouvelles propriétés aux

vaccins correspondants, comme la possibilité de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés avec les « vaccins marqueurs ».

De nouvelles modalités de vaccination sont possibles, grâce aux techniques de génie génétique, comme la vaccination à ADN. Son développement permet d'envisager l'évolution de la notion vaccinale de prévention, à la notion de « vaccin thérapeutique ». Des solutions sont à optimiser pour déclencher et orienter la réponse immunitaire protectrice spécifique, en fonction de tel ou tel pathogène et de son hôte. Des recherches très actives sont menées sur différentes stratégies destinées à amplifier les réponses immunitaires protectrices. Compte tenu des avancées réalisées et des avantages potentiels considérables de ces vaccins à ADN, il est probable qu'ils auront un avenir en médecine vétérinaire. Enfin, des vaccins produits dans des végétaux transgéniques pourraient également fournir de nouvelles solutions vaccinales.

Comme pour les vaccins, des biomolécules peuvent être produites à grande échelle dans des systèmes de production hétérologues, qu'il s'agisse des cellules isolées, de végétaux, ou même d'animaux génétiquement modifiés. Les systèmes de bioréacteurs cellulaires ont fait largement leurs preuves depuis plus de vingt ans. Ils fournissent l'essentiel des molécules thérapeutiques (hormones, cytokines, facteurs solubles sanguins, anticorps monoclonaux) actuellement disponibles.

Les animaux transgéniques vont probablement contribuer, d'ici quelques années, à la production de molécules thérapeutiques, au moins dans un premier temps à

destination de l'homme. Il est néanmoins probable de voir également un certain nombre d'animaux transgéniques produire des substances d'intérêt vétérinaire ou conférant à l'animal des propriétés nouvelles contribuant à une meilleure santé. Des végétaux transgéniques pourraient également avoir de telles applications.

Comme pour la vaccination à ADN, il faudra attendre probablement un peu plus longtemps avant de disposer de biomédicaments basés sur des acides nucléiques. L'utilisation des technologies antisens ou plus récemment la découverte des ARN interférents devraient déboucher sur des nouveaux médicaments de type acide nucléique. Ceux-ci permettraient de bloquer l'expression d'oncogènes ou de gènes viraux dans les infections chroniques. Si des avancées significatives sont réalisées chez l'homme, il est certain que des applications verront ensuite rapidement le jour chez l'animal.

À plus long terme également, on peut s'attendre à des retombées des programmes de cartographie et de séquençage des génomes humains et animaux. La génomique et la protéomique vont en effet fournir d'énormes quantités de données qui permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (gènes, protéines) et donc de nouveaux médicaments. Il est déjà admis, au moins en médecine humaine, que les traitements du futur pourraient être adaptés à l'individu à traiter, en particulier grâce aux approches pharmacogénomiques.



## New vaccines and new veterinary therapies derived from biotechnologies: examples of applications

P. Vannier & L. Martignat

### Summary

The last ten years have seen the development of vaccines derived from deoxyribonucleic acid (DNA) recombination, which, when used in association with appropriate diagnostic kits, make it possible to distinguish vaccinated from infected animals. This article describes the general principles behind these vaccines, provides examples of different applications, e.g. vaccines against Aujeszky's disease, classical swine fever, rabies, avian diseases and rinderpest, and discusses the role of this type of vaccine in certain control plans. Deoxyribonucleic acid vaccines constitute a revolution in the concept of

vaccination, which was previously based on the injection of a protein or a medium expressing a protein. It is now possible, however, to induce immunisation by direct injection of the gene that codes for the immunogenic antigen. Examples of such vaccines are described. Finally, the production of biological molecules used for therapeutic purposes thanks to genetic engineering techniques is illustrated by some examples concerning, in particular, animal bioreactors (transgenic animals).

**Keywords**

Animal bioreactor – Biotechnology – Deleted vaccine – Deoxyribonucleic acid – Genetic recombination – Recombinant vaccine – Transgenic animal – Veterinary application.



## Ejemplos de aplicación de nuevas vacunas y nuevas posibilidades terapéuticas de interés veterinario derivadas de la biotecnología

P. Vannier & L. Martignat

**Resumen**

En los últimos diez años ha ido surgiendo el concepto de vacunas resultantes de técnicas de recombinación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y que, asociadas a un equipo de diagnóstico apropiado, permiten distinguir entre animales vacunados e infectados. Tras recordar los principios generales de ese tipo de vacunas, los autores ofrecen algunos ejemplos de su aplicación (contra la enfermedad de Aujeszky, la peste porcina clásica, la rabia, las enfermedades aviarias o la peste bovina) y describen también el lugar que ocupan las vacunas de esta clase en determinados planes de lucha. Las vacunas de ADN han venido a revolucionar el concepto de vacunación, basado hasta ahora en la inyección de una proteína o un soporte que la exprese. Ahora bien, también es posible inducir una inmunización inyectando directamente el gen que codifica el antígeno inmunógeno, y los autores describen ejemplos de esta técnica. Por último, ilustran la obtención de biomoléculas de uso terapéutico gracias a técnicas de ingeniería genética mediante una serie de ejemplos, relativos sobre todo a biorreactores animales (animales transgénicos).

**Palabras clave**

Ácido desoxirribonucleico – Animal transgénico – Aplicación veterinaria – Biorreactor animal – Biotecnología – Recombinación genética – Vacuna con delección – Vacuna recombinante.



## Bibliographie

1. Ada G. & Ramshaw I. (2003). – DNA vaccination. *Expert Opin. emerg. Drugs*, **8**, 27-35.
2. Babiuk L.A., Pontarollo R., Babiuk S., Loehr B. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (2003). – Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, **21**, 649-658.
3. Babiuk S., Baca-Estrada M.E., Foldvari M., Middleton D.M., Rabussay D., Widera G. & Babiuk L.A. (2004). – Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *J. Biotechnol.*, **110**, 1-10.
4. Barry M.A., Lai W.C. & Johnston S.A. (1995). – Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature*, **377**, 632-635.
5. Beard C.W. & Mason P.W. (1998). – Out on the farm with DNA vaccines. *Nature Biotechnol.*, **16**, 1325-1328.
6. Berns A., Van den Ouweland A., Quint W., Van Oirschot J. & Gielkens A. (1985). – Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. *J. Virol.*, **53**, 89-93.
7. Blanchard P., Mahé D., Cariolet R., Keranflech A., Baudouard M.A., Cordioli P., Albina A. & Jestin A. (2003). – Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, **21**, 4565-4575.
8. Blancou J., Kieny M.P., Lathe R., Lecoq K.P., Pastoret P.-P., Soulebot J.-P. & Desmettre Ph. (1986). – Oral vaccination of the pox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, **322**, 373-375.
9. Bostock C.J. (1998). – Contribution de la biologie moléculaire à la lutte contre les maladies animales. In Rapports de synthèse sur les thèmes techniques présentés au Comité international ou aux Commissions régionales de l'OIE. Organisation mondiale de la santé animale (OIE), Paris, 51-54.
10. Brochier B., Aubert M.F.A., Pastoret P.-P., Masson E., Schon J., Lombard R., Chappuis G., Languet B. & Desmettre Ph. (1996). – Field use of a vaccinia-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (3), 947-970.
11. Brooks G. (1998). – Biotechnology in healthcare. Pharmaceutical Press, Londres, 228 pp.
12. Cariolet R., Marie P., Moreau G. & Robert H. (1994). – Rappel des différentes méthodes d'obtention de porcelets assainis : conditions de maintien du statut sanitaire et valorisation de ces animaux. *J. Rech. porcine*, **26**, 1-12.
13. Castrucci G., Ferrari M., Marchini C., Salvatori D., Provinciali M., Tosini A., Petrini S., Sardonini Q., Lo Dico M., Frigeri F. & Amici A. (2004). – Immunization against bovine herpesvirus-1 infection. Preliminary tests in calves with a DNA vaccine. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **27**, 171-179.
14. Chow Y.H., Chiang B.L., Lee Y.L., Chi W.K., Lin W.C., Chen Y.T. & Tao M.H. (1998). – Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by co-delivery of various cytokine genes. *J. Immunol.*, **160**, 1320-1329.
15. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A. & Robl J.M. (1998). – Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotechnol.*, **16**, 642-646.
16. Deshpande M.S., Ambagala T.C., Hegde N.R., Hariharan M.J., Navaratnam M. & Srikumaran S. (2002). – Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization. *Vaccine*, **20**, 3744-3751.
17. Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F. & Sirard M.A. (2003). – Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *Trends Biotechnol.*, **21**, 394-399.
18. Eo S.K., Gierynska M., Kamar A.A. & Rouse B.T. (2001). – Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J. Immunol.*, **166**, 5473-5479.
19. Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. & Twyman R.M. (2004). – Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Op. Plant Biol.*, **7**, 152-158.
20. Flamand A. (1997). – La vaccination orale contre la rage, bilan et perspectives. *Virologie*, **1** (2), 91-93.
21. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. & Ruddle F.H. (1980). – Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **77**, 7380-7384.
22. Gurunathan S., Klinman D.M. & Seder R.A. (2000). – DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 927-974.
23. Hannon G.J. (2002). – RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
24. Heffner S., Kovacs F., Klupp B. & Mettenleiter T. (1993). – Glycoprotein gp 50-negative pseudorabies virus: a novel approach toward a non-spreading live herpesvirus vaccine. *J. Virol.*, **67**, 1529-1537.
25. Houdebine L.M. (2002). – Transgenesis to improve animal production. *Livest. Prod. Sci.*, **74**, 255-268.
26. Houdebine L.M. (2002). – The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J. Biotechnol.*, **98**, 145-160.
27. Hulse D.J. & Romero C.H. (2004). – Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes. *Vaccine*, **22**, 1249-1259.

28. Hulst M.M., Westra D.F., Wensvoort G. & Moormann R.J.M. (1993). – Glycoprotein EI of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.*, **67** (9), 5435-5442.
29. Kim S.J., Sung H.W., Han J.H., Jackwood D. & Kwon H.M. (2004). – Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Vet. Microbiol.*, **101**, 39-51.
30. Lafay F., Bénéjean J., Tuffereau C., Flamand A. & Coulon P. (1994). – Vaccination against rabies: construction and characterization of SAG2, a double avirulent derivative of SAD Bern. *Vaccine*, **12**, 317-320.
31. Lewis P.J., van Drunen Littel-van den Hurk S. & Babiuk L.A. (1999). – Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization with a DNA-based vaccine. *J. gen. Virol.*, **80**, 2829-2837.
32. Loehr B.I., Pontarollo R., Rankin R., Latimer L., Willson P., Babiuk L.A. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (2001). – Priming by DNA immunization augments T-cell responses induced by modified live bovine herpesvirus vaccine. *J. gen. Virol.*, **82**, 3035-3043.
33. McMillen J.K., Cochran M.D., Junker D.E., Reddy D.N. & Valencia D.M. (1994). – The safe and effective use of fowlpox virus as a vector for poultry vaccines. *Dev. Biol. Standard.*, **82**, 137-145.
34. Manoj S., Griebel P.J., Babiuk L.A. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (2003). – Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J. Immunol. (Baltimore)*, **170**, 989-996.
35. Manoj S., Griebel P.J., Babiuk L.A. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (2004). – Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154. *Immunology*, **112**, 328-338.
36. Martinez M.A., Clotet B. & Este J.A. (2002). – RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol.*, **23**, 559-561.
37. Maue A.C., Waters W.R., Palmer M.V., Whipple D.L., Minion F.C., Brown W.C. & Estes D.M. (2004). – CD80 and CD86, but not CD154, augment DNA vaccine-induced protection in experimental bovine tuberculosis. *Vaccine*, **23** (6), 769-779.
38. Mettenleiter T. (1994). – Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. In OIE Symposium on Aujeszky's disease, 30 juin-1<sup>er</sup> juillet, Bangkok. Organisation mondiale de la santé animale (OIE), Paris, 1-9.
39. Moormann R.J.M., Van Rijn P.A., de Smit A.J., Wensvoort G. & Terpstra C. (1996). – Recent developments in pig vaccinology. In Proc. 14th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Bologne. IPVS, Hambourg, 25-28.
40. Moormann R.J.M., Bouma A., Kramps J.A., Terpstra C. & de Smit A.J. (1998). – Recent developments in vaccine research. In OIE Symposium on classical swine fever, 11-12 juillet 1997, Birmingham. Organisation mondiale de la santé animale (OIE), Paris, 14.
41. Nobiron I., Thompson I., Brownlie J. & Collins M.E. (2003). – DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, **21**, 2082-2092.
42. Oshop G.L., Elankumaran S. & Heckert R.A. (2002). – DNA vaccination in the avian. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **89**, 1-12.
43. Peeters B., Bouma A.M., de Bruin T., Moormann R., Gielkens A. & Kimann T. (1994). – Non transmissible pseudorabies virus gp 50 mutants: a new generation of safe live vaccines. *Vaccine*, **12** (4), 375-380.
44. Pensaert M.B., de Smet K. & de Waele K. (1990). – Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **22**, 107-117.
45. Pontarollo R.A., Babiuk L.A., Hecker R. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (2002). – Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *J. gen. Virol.*, **83**, 2973-2981.
46. Ramshaw I.A. & Ramsay A.J. (2000). – The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today*, **21**, 163-165.
47. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. & Campbell K.H. (1997). – Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, **278**, 2130-2133.
48. Skinner M.A., Buddle B.M., Wedlock D.N., Keen D., de Lisle G.W., Tascon R.E., Ferraz J.C., Lowrie D.B., Cockle P.J., Vordermeier H.M. & Hewinson R.G. (2003). – A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.*, **71**, 4901-4907.
49. Somasundaram C., Takamatsu H., Andreoni C., Audonnet J.C., Fischer L., Lefevre F. & Charley B. (1999). – Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 277-287.
50. Tang D.C., DeVit M. & Johnson S.A. (1992). – Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, **356**, 152-154.
51. Taracha E.L., Bishop R., Musoke A.J., Hill A.V. & Gilbert S.C. (2003). – Heterologous priming-boosting immunization of cattle with *Mycobacterium tuberculosis* 85A induces antigen-specific T-cell responses. *Infect. Immun.*, **71**, 6906-6914.

52. Taylor G., Bruce C., Barbed A.F., Wyld S.G. & Thomas L.H. (2005). – DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccine* **23** (10), 1242-1250.
53. Tighe H., Corr M., Roman M. & Raz E. (1998). – Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol. Today*, **19**, 89-97.
54. Tollefsen S., Vordermeier M., Olsen I., Storset A.K., Reitan L.J., Clifford D., Lowrie D.B., Wiker H.G., Huygen K., Hewinson G., Mathiesen I. & Tjelle T.E. (2003). – DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scand. J. Immunol.*, **57**, 229-238.
55. Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dworki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A., Hawe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.L. & Liu M.A. (1993). – Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259**, 1745-1749.
56. Ulmer J.B., Fu T.M., Deck R.R., Friedman A., Guan L., DeWitt C., Liu X., Wang S., Liu M.A., Donnelly J.J. & Caulfield M.J. (1998). – Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.*, **72**, 5648-5653.
57. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Braun R.P., Lewis P.J., Karvonen B.C., Baca-Estrada M.E., Snider M., McCartney D., Watts T. & Babiuk L.A. (1998). – Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J. gen. Virol.*, **79**, 831-839.
58. Vannier P., Hutet E., Bourgueil E. & Cariolet R. (1991). – Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **29**, 213-223.
59. Van Oirschot J.T., Kaashoek M. & Rijsewijk F.A.M. (1996). – Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, **53**, 43-54.
60. Van Oirschot J.T., Rziha R.L., Moonen P.L., Pol L.M. & Van Zaane D. (1986). – Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J. gen. Virol.*, **67**, 1179-1182.
61. Van Zijl M., Wensvoort G., de Kluyver E., Hulst M., van der Gulden H., Gielkens A., Bems A. & Moormann R. (1991). – Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.*, **65**, 2761-2765.
62. Vordermeier H.M., Lowrie D.B. & Hewinson R.G. (2003). – Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. *Vet. Microbiol.*, **93**, 349-359.
63. Walsh G. (2003). – Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **55**, 3-10.
64. Wedlock D.N., Skinner M.A., Parlane N.A., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., de Lisle G.W. & Buddle B.M. (2003). – Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*, **83**, 339-349.
65. Willeberg P., Leontides L., Ewald C., Mortensen S., McInerney L.P., Howe H.S. & Kooij D. (1996). – Effect of vaccination against Aujeszky's disease compared with test and slaughter programme: epidemiological and economical evaluations. *Acta vet. scand.*, **90**, 25-51.
66. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. & Felgner P.L. (1990). – Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, **247**, 1465-1468.
67. Xue Q., Zhao Y.G., Zhou Y.J., Qiu H.J., Wang Y.F., Wu D.L., Tian Z.J. & Tong G.Z. (2004). – Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **102**, 291-298.
68. Yamanouchi K., Barrett T. & Kai C. (1998). – New approaches to the development of virus vaccines for veterinary use. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17** (3), 641-653.

