



HAL
open science

État des lieux des vaccins à acides nucléiques en médecine vétérinaire

Clément Weispecker

► **To cite this version:**

Clément Weispecker. État des lieux des vaccins à acides nucléiques en médecine vétérinaire. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04269771

HAL Id: dumas-04269771

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04269771>

Submitted on 3 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2023 - Thèse n° 40

ETAT DES LIEUX DES VACCINS A ACIDES NUCLEIQUES EN MEDECINE VETERINAIRE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 05 septembre 2023

par

Clément, Jérôme WEISPECKER

Sous la direction de

Madame Emmanuelle Moreau

Présidente du jury : Madame Nathalie Ruvoen, Professeure à Oniris

Membres du jury : Monsieur Kenny Oberlé, Maître de conférences à Oniris

Madame Emmanuelle Moreau, Professeure à Oniris

ANNEE 2023 - Thèse n° 40

ETAT DES LIEUX DES VACCINS A ACIDES NUCLEIQUES EN MEDECINE VETERINAIRE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 05 septembre 2023

par

Clément, Jérôme WEISPECKER

Sous la direction de

Madame Emmanuelle Moreau

Présidente du jury : Madame Nathalie Ruvoen, Professeure à Oniris

Membres du jury : Monsieur Kenny Oberlé, Maître de conférences à Oniris

Madame Emmanuelle Moreau, Professeure à Oniris

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie		
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (MC HDR) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC HDR) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (MC HDR)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénom de l'auteur : Clément WEISPECKER
- Année de soutenance : 2023
- Titre de la thèse : Etat des lieux des vaccins à acides nucléiques en médecine vétérinaire
- Unité de soutenance : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- Ecole de soutenance : Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 206 pages

Table des matières

<i>Introduction</i>	21
Partie I : Propriétés des vaccins et généralités sur la vaccination	23
1. Bases immunologiques de la vaccination.....	23
1.1. Notion d'immunité innée et adaptative.....	23
1.2. Mécanismes moléculaires de la mise en place de l'immunité innée.....	23
1.3. Mécanismes moléculaires de la mise en place de l'immunité adaptative.....	26
1.3.1. Présentation des cellules de l'immunité adaptative.....	26
1.3.2. Mécanismes de l'immunité adaptative.....	27
1.3.2.1. Reconnaissance de l'antigène et maturation des cellules présentatrices d'antigène.....	27
1.3.2.2. Activation des lymphocytes T.....	28
1.3.2.3. Activation des lymphocytes B.....	31
1.3.3. Effecteurs de la réponse immunitaire adaptative.....	31
1.3.3.1. Les anticorps.....	32
1.3.3.2. Effecteurs des lymphocytes T.....	35
1.3.3.2.1. Effecteurs des lymphocytes T CD8+.....	35
1.3.3.2.2. Effecteurs des lymphocytes T CD4+.....	36
1.3.4. Réponse primaire, secondaire et persistance de la réponse immunitaire.....	39
2. Généralités sur les vaccins conventionnels.....	41
2.1. Historique de la vaccination.....	41
2.1.1. La variolisation : Première étape vers la vaccination.....	41
2.1.2. Découverte de la vaccination.....	42
2.1.3. Evolution de la vaccination.....	43
2.2. Familles de vaccins.....	44
2.2.1. Vaccins de première génération :.....	44
2.2.1.1. Vaccins vivants atténués.....	44
2.2.1.2. Vaccins inactivés.....	46
2.2.2. Vaccins de seconde génération.....	50
2.2.2.1. Vaccins à sous-unités.....	50
2.2.2.2. Vaccins à sous-unités recombinantes.....	52
2.2.2.3. Vaccins peptidiques.....	54
2.2.2.4. Vaccins VLP.....	55
2.2.3. Vaccins de troisième génération.....	58
2.2.3.1. Vaccins à vecteurs recombinants.....	58
2.2.3.2. Vaccins chimériques.....	60

2.2.4.	Vaccins DIVA.....	61
2.3.	Adjuvants vaccinaux.....	62
2.3.1.	Mode d'action des adjuvants.....	63
2.3.2.	Types d'adjuvants.....	65
2.4.	Avantages et limites des vaccins conventionnels.....	68
3.	Objectifs de la vaccination dans le contrôle des maladies infectieuses.....	70
3.1.	Vaccins préventifs et thérapeutiques.....	70
3.2.	Protection des populations animales.....	71
3.2.1.	Protection individuelle.....	71
3.2.2.	Protection collective.....	72
3.3.	Niveaux de protection des vaccins et échecs vaccinaux.....	73
3.3.1.	Niveaux de protection des vaccins.....	73
3.3.2.	Echecs vaccinaux.....	74
	Partie II : Etat des lieux des vaccins à ADN en médecine vétérinaire.....	77
1.	Historique des vaccins à ADN.....	77
2.	Caractéristiques des vaccins à ADN.....	78
2.1.	Constitution des vaccins à ADN.....	78
2.1.1.	Le plasmide à ADN.....	78
2.1.2.	Production du plasmide à ADN.....	80
2.1.3.	Caractéristiques principales des vaccins à ADN.....	82
2.1.4.	Technologies d'amélioration des vaccins à ADN.....	84
2.1.4.1.	Optimisation du plasmide à ADN.....	85
2.1.4.1.1.	Optimisation des codons.....	85
2.1.4.1.2.	Optimisation du promoteur.....	85
2.1.4.1.3.	Optimisation du squelette du plasmide.....	85
2.1.4.2.	Adjuvants conventionnels.....	88
2.1.4.3.	Adjuvants génétiques.....	88
2.1.4.3.1.	Immunomodulation par des gènes codant des cytokines.....	88
2.1.4.3.2.	Immunomodulation par des plasmides encodant des molécules « signal de danger »	89
2.1.4.3.3.	ARN interférents.....	90
2.1.4.4.	Amélioration de l'adressage du vaccin à ADN.....	90
2.2.	Mécanismes d'action des vaccins à ADN.....	91
2.2.1.	Internalisation et prise en charge du plasmide à ADN.....	91
2.2.2.	Induction de l'immunité innée.....	92
2.2.3.	Induction de l'immunité adaptative.....	93

2.3.	Méthodes d'administration.....	95
2.4.	Comparaison avec les vaccins conventionnels.....	97
3.	Vaccins à ADN à usage vétérinaires commercialisés.....	99
3.1.	Vaccin contre le West-Nile virus chez les équidés	100
3.1.1.	Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée.....	100
3.1.1.1.	Importance	100
3.1.1.2.	Etiologie.....	101
3.1.1.3.	Cycle épidémiologique et présentation clinique chez le Vertébré	102
3.1.1.4.	Traitement et prévention	103
3.1.2.	Présentation du vaccin	104
3.1.2.1.	Composition du vaccin	104
3.1.2.2.	Protocole vaccinal	104
3.1.2.3.	Efficacité vaccinale	104
3.1.2.4.	Effets secondaires	105
3.2.	Vaccin contre le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse du saumon	105
3.2.1.	Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée.....	105
3.2.1.1.	Importance	105
3.2.1.2.	Epidémiologie.....	106
3.2.1.3.	Etiologie.....	106
3.2.1.4.	Pathogénie et présentation clinique	109
3.2.1.5.	Prévention	109
3.2.2.	Présentation du vaccin	110
3.2.2.1.	Composition du vaccin	110
3.2.2.2.	Protocole vaccinal	110
3.2.2.3.	Efficacité vaccinale	110
3.2.2.4.	Effets secondaires	111
3.3.	Vaccin contre la maladie pancréatique du saumon	111
3.3.1.	Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée.....	111
3.3.1.1.	Importance	111
3.3.1.2.	Epidémiologie.....	113
3.3.1.3.	Etiologie.....	113
3.3.1.4.	Pathogénie et présentation clinique	114
3.3.1.5.	Prévention	114
3.3.2.	Présentation du vaccin	115
3.3.2.1.	Composition du vaccin	115
3.3.2.2.	Protocole vaccinal	116

3.3.2.3.	Efficacité vaccinale	116
3.3.2.4.	Effets secondaires	116
3.4.	Vaccin contre le mélanome oral du chien	117
3.4.1.	Etude du mélanome oral canin	117
3.4.1.1.	Histopathologie et prédispositions génétiques	117
3.4.1.2.	Présentation clinique	117
3.4.1.3.	Etablissement d'un stade	118
3.4.1.4.	Traitement.....	119
3.4.2.	Présentation du vaccin	120
3.4.2.1.	Composition du vaccin	120
3.4.2.2.	Protocole vaccinal	120
3.4.2.3.	Efficacité vaccinale	121
3.4.2.4.	Effets secondaires	121
4.	Etat des recherches en cours sur d'autres applications des vaccins à ADN.....	122
4.1.	Vaccins à ADN contre les maladies infectieuses	122
4.2.	Vaccins à ADN contre les néoplasies	123
4.3.	Vaccins à ADN contre les parasites	123
4.4.	Vaccins à ADN contre les maladies auto-immunes	124
Partie III : Etat des lieux des vaccins à ARN en médecine vétérinaire		127
1.	Historique des vaccins à ARN	127
2.	Caractéristiques des vaccins à ARN	127
2.1.	Construction des vaccins à ARNm	127
2.1.1.	Types de vaccins à ARNm	127
2.1.2.	Production des vaccins à ARNm	129
2.1.3.	Avantages et inconvénients des différents types de vaccins à ARNm	132
2.2.	Mode d'action des vaccins à ARNm	133
2.3.	Technologies d'amélioration des vaccins à ARNm	135
2.3.1.	Amélioration de la stabilité et de la traduction des ARNm	135
2.3.2.	Régulation de la réponse immunitaire	139
2.3.3.	Amélioration de l'administration des vaccins à ARNm	141
2.4.	Comparaison avec les vaccins conventionnels et les vaccins à ADN.....	144
3.	Vaccins à ARN à usage vétérinaire avec autorisation conditionnelle	147
3.1.	Vaccin contre l'influenza aviaire.....	147
3.1.1.	Présentation de l'agent pathogène.....	147
3.1.1.1.	Importance	147
3.1.1.2.	Epidémiologie.....	148

3.1.1.3.	Etiologie.....	148
3.1.1.4.	Pathogénie et présentation clinique.....	151
3.1.1.5.	Traitement et prévention.....	152
3.1.2.	Présentation du vaccin à ARNm.....	152
3.1.2.1.	Composition du vaccin.....	152
3.1.2.2.	Protocole vaccinal.....	153
3.1.2.3.	Efficacité vaccinale.....	153
3.2.	Vaccin contre la diarrhée épidémique porcine.....	155
3.2.1.	Présentation de l'agent pathogène.....	155
3.2.1.1.	Importance.....	155
3.2.1.2.	Epidémiologie.....	155
3.2.1.3.	Etiologie.....	155
3.2.1.4.	Pathogénie et présentation clinique.....	157
3.2.1.5.	Traitement et prévention.....	158
3.2.2.	Présentation du vaccin.....	159
3.2.2.1.	Composition du vaccin.....	159
3.2.2.2.	Protocole vaccinal.....	159
3.2.2.3.	Efficacité vaccinale.....	160
4.	Etat des recherches en cours sur d'autres applications des vaccins à ARN.....	161
4.1.	Vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses.....	161
4.2.	Vaccins à ARNm modulateurs de la réponse inflammatoire.....	162
4.3.	Vaccins à ARNm contre les néoplasies.....	162
4.4.	Amélioration des vaccins à ARNm.....	163
4.4.1.	Vaccins à ARNm et vaccination hétérologue.....	163
4.4.2.	Vaccins à ARNm et interférence avec les anticorps maternels.....	164
4.4.3.	Vaccins à ARNm et induction de l'immunité muqueuse.....	165
	<i>Conclusion</i>	169
	<i>Bibliographie</i>	171

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme de transduction des TLR.....	25
Figure 2 : Rôle des IFN de type I dans le contrôle de l'immunité innée et adaptative	25
Figure 3 : Reconnaissance du PAMP par la CPA	27
Figure 4 : Mécanismes d'apprêtement du peptide antigénique.....	28
Figure 5 : Voie de présentation classique du CMH-I	29
Figure 6 : Voie de présentation classique du CMH-II	30
Figure 7 : Activation des lymphocytes T par le CD8 et le CD4.....	32
Figure 8 : Structure d'un antigène.....	33
Figure 9 : Mécanismes de neutralisation des virus	34
Figure 10 : Implication des mastocytes dans la communication cellulaire et la défense immunitaire	35
Figure 11 : Diversité des réponses T helper	36
Figure 12 : Orientation des réponses effectrices Th et CTL par les cellules dendritiques	38
Figure 13 : Graphique illustrant la réponse immunitaire primaire et secondaire	40
Figure 14 : Structure du virus Influenza	50
Figure 15 : Spodoptera frugiperda ou « Légionnaire d'automne ».....	53
Figure 16 : Classification des vaccins VLP	56
Figure 17 : Etapes de la production des vaccins VLP.....	57
Figure 18 : Schéma du principe des vaccins recombinants, chimériques et à ADN.....	61
Figure 19 : Schéma récapitulatif des modes d'action des adjuvants	63
Figure 20 : Mécanismes d'action des différents types d'émulsions lipidiques.....	66
Figure 21 : Mode d'action des virosomes	67
Figure 22 : Effet de la mise en place d'une immunité de groupe sur la transmission d'un agent pathogène dans une population	72
Figure 23 : Schéma d'un plasmide à ADN	79
Figure 24 : Schéma de la production de plasmide à ADN	81
Figure 25 : Comparaison entre la production de plasmide ADN et d'un plasmide à ADN mini-cercle.	86
Figure 26 : Schéma de synthèse du vecteur MIDGE.....	87
Figure 27 : Induction de l'immunité innée par les vaccins à ADN	92
Figure 28 : Mécanisme d'induction des différentes réponses immunitaires adaptatives par les vaccins à ADN.....	93
Figure 29 : Mécanismes d'induction de la réponse immunitaire adaptative.....	94
Figure 30 : Voies d'administration des vaccins à ADN	95
Figure 31 : Processus d'électroporation in vivo	97
Figure 32 : Distribution géographique du WNV	100
Figure 33 : Structure du génome et du WNV	101
Figure 34 : Cycle de transmission du WNV.....	102
Figure 35 : Image au microscope électronique à transmission du NIHV	107
Figure 36 : Schéma de l'organisation génomique du NIHV.....	108
Figure 37 : Distribution du virus de la maladie pancréatique en Europe.....	112
Figure 38 : Organisation génomique du SAV.....	113
Figure 39 : Schéma du plasmide vaccinal Puk-spdv-Poly2#1	115
Figure 40 : Stades de mélanome oral canin	118
Figure 41 : Dispositif de vaccination transdermique Vet Jet®	120
Figure 42 : Schéma des différents types de vaccins à ARNm	129
Figure 43 : Diagramme illustrant l'utilisation des outils informatiques dans la mise au point du vaccin contre le SARS-CoV2.....	130

Figure 44 : Procédé de fabrication des vaccins à ARNm in vitro	131
Figure 45 : Schéma du mode d'action des vaccins à ARNm	133
Figure 46 : Induction de l'immunité innée par l'ARNm exogène	135
Figure 47 : Récapitulatif des modifications structurelles de l'ARNm permettant l'amélioration de la stabilité et de la traduction	136
Figure 48 : Structure CleanCap®	137
Figure 49 : Structure en boucle fermée de l'ARNm	138
Figure 50 : Importance de la purification sur la production d'IFN-I et leurs conséquences sur la production d'antigènes et la réponse CTL.....	140
Figure 51 : Principales structures de délivrance des vaccins à ARNm	142
Figure 52 : Structure génomique du virus Influenza	149
Figure 53 : Effet de la vaccination avec un vaccin à ARN (RP) et avec un vaccin inactivé sur le taux de survie des poules de race Leghorn vaccinées à 1 semaine d'âge	153
Figure 54 : Effet de la vaccination contre le virus Influenza à l'aide d'injections répétées de vaccin à ARN ou inactivés sur le titre en anticorps	154
Figure 55 : Schéma du PEDV (a) et organisation génomique du virus (b).....	156
Figure 56 : MALT et réponse immunitaire muqueuse.....	166

Liste des tableaux

Tableau I : Exemple de PAMP reconnus par les différents TLR.....	24
Tableau II : Procédés d'inactivation du virus Influenza dans la conception d'un vaccin inactivé.....	47
Tableau III : Liste non exhaustive des vaccins à sous-unités naturelles et recombinantes à usage vétérinaire	52
Tableau IV : Liste non exhaustive des vaccins à usage vétérinaire à vecteurs viraux recombinants et chimériques	59
Tableau V : Liste non exhaustive des vaccins DIVA à usage vétérinaire	62
Tableau VI : Tableau récapitulatif des avantages et limites de chaque type de vaccin	68
Tableau VII : Vaccins à ADN à usage vétérinaire commercialisés	78
Tableau VIII : Principales caractéristiques des vaccins à ADN.....	82
Tableau IX : Influence de la vaccination des truies sur la mortalité des porcelets avant le sevrage ..	160

Introduction

La vaccination se définit comme un procédé consistant à inoculer tout type d'antigène susceptible d'être à l'origine d'une immunisation active contre un agent pathogène spécifique (Macnalty, 1966).

Mise au point par Jenner en 1796, mais utilisée sous la forme de variolisation depuis de nombreux siècles (Fenner *et al.*, 1988), la vaccination n'a eu de cesse d'évoluer : d'agents pathogènes atténués à leur début, les vaccins ont évolué pour devenir aujourd'hui des vecteurs génétiquement modifiés, capables de stimuler le système immunitaire et d'induire une protection contre de nombreux agents infectieux, et non-infectieux (cancers, maladies auto-immunes, addictions, ...) (Novicki, 2013). Les vaccins à acide nucléique sont les technologies les plus récentes : mis au point dans les années 90, les vaccins à ADN ont été les premiers vaccins génétiques à être développés et les recherches se sont concentrées sur leur développement. Ils ont progressivement été mis de côté au cours de la pandémie de COVID-19 et à la suite du développement de vaccins à ARNm contre le SARS-CoV2. L'exposition médiatique mondiale des vaccins à ARNm et la course au développement d'un vaccin permettant d'enrayer la pandémie, ont contribué à centrer les recherches sur leur amélioration (Sandbrink & Shattock, 2020; Su *et al.*, 2022; Y. Wang *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020).

La vaccination est une avancée technologique importante, qui a permis d'améliorer l'espérance de vie et a ainsi en grande partie contribué au bond de la croissance démographique ayant eu lieu ces deux derniers siècles en protégeant les individus mais aussi les populations (Canoui & Launay, 2019). Elle joue également un rôle dans la protection de la santé publique : en effet, la vaccination des animaux d'élevages permet d'une part de réduire le risque de transmission de zoonoses, et elle permet d'autre part de réduire l'utilisation d'antibiotiques en élevage, permettant ainsi de limiter l'apparition de résistances aux antibiotiques. D'un point de vue économique, la vaccination contribue à améliorer l'image des denrées d'origine animale auprès des consommateurs (ayant été entachée par l'épidémie d'encéphalite spongiforme bovine dans les années 1980-1990), car elle permet de réduire l'utilisation de médicaments considérés comme des « produits chimiques », mais également de réduire les risques de survenue d'épizooties, entraînant de lourdes pertes pour les éleveurs (Pastoret & Jones, 2004).

La vaccination permet enfin de préserver la biodiversité dans les écosystèmes : en identifiant et en vaccinant les animaux de la faune sauvage dits « super-excréteurs », qui sont au centre des interactions sociales d'un groupe, on peut enrayer la progression d'un agent pathogène dans une population animale sauvage, mais aussi au sein d'une population animale domestique, sensible à l'agent pathogène (Barnett & Civitello, 2020; Pastoret & Jones, 2004).

La vaccination joue donc un rôle central dans l'évolution de la médecine vétérinaire mais s'inclut également dans un contexte de prise de conscience collective de l'impact écologique de l'Homme et contribue à l'évolution des méthodes d'élevage (ex : vaccination pour la castration des porcelets pour limiter l'utilisation d'une chirurgie), des modèles d'études (ex : diminution du nombre d'animaux pour les études en laboratoire), à la prise en compte du rôle fondamental des animaux de la faune sauvage au sein des écosystèmes et à la nécessité de les protéger également (Pastoret & Jones, 2004).

L'objectif de cette thèse d'exercice est dans un premier temps d'étudier les bases immunologiques sur lesquelles se repose la vaccination, puis d'étudier les grandes familles de vaccins, le rôle des adjuvants ainsi que leurs avantages et leurs limites et enfin d'étudier les objectifs de la vaccination.

Dans un second temps, l'étude portera plus spécifiquement sur les vaccins à ADN puis à ARN, en plein développement actuellement en médecine humaine mais aussi en médecine vétérinaire, en se concentrant sur leurs caractéristiques principales et en les comparant aux vaccins conventionnels, puis en étudiant les différents vaccins à ADN et ARN disponibles sur le marché, et enfin, en approfondissant les recherches en cours sur d'autres utilisations futures de ces vaccins ainsi que sur leurs perspectives d'amélioration.

Partie I : Propriétés des vaccins et généralités sur la vaccination

La vaccination est une technologie qui a permis de protéger les populations humaines et animales de nombreuses maladies infectieuses. Cependant, son utilisation a longtemps été empirique et les mécanismes immunitaires précis, à l'origine de la mise en place d'une immunisation chez le patient sont en partie inconnus (Pulendran & Ahmed, 2011).

1. Bases immunologiques de la vaccination

1.1. Notion d'immunité innée et adaptative

Le système immunitaire peut être divisé en trois barrières protectrices :

- ❖ **Barrière cutanéomuqueuse** : Première ligne de défense contre les agents pathogènes. Par sa simple présence, elle permet d'empêcher le passage d'un agent pathogène dans les tissus de l'animal. Lors d'une brèche cutanée, c'est le système inné, qui constituera la seconde ligne de défense (Moser & Leo, 2010).
- ❖ **Immunité innée** : C'est un mécanisme de défense immunitaire non spécifique, ciblant des signaux de dangers communs à un grand nombre de micro-organismes. Il diffère de l'immunité adaptative par son induction rapide, sans mise en place d'une mémoire immunitaire contre l'agent pathogène rencontré (Moser & Leo, 2010). Il est composé de plusieurs cellules immunitaires (cellules dendritiques, granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles, macrophages, monocytes, etc...), qui, au contact d'un signal de danger, vont avoir plusieurs rôles (Karch & Burkhard, 2016).
- ❖ **Immunité adaptative** : Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative et le développement d'une mémoire immunitaire sont des mécanismes hautement spécifiques, qui mettent plus de temps à se mettre en place. Les cellules immunitaires de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B et T. Les lymphocytes vont reconnaître des régions particulières présentées par les agents pathogènes : les épitopes portés par des molécules antigéniques. La reconnaissance d'un épitope par un lymphocyte B va permettre la mise en place d'une réponse immunitaire dite « humorale » (basée sur la production d'anticorps dirigés contre l'antigène exogène). La reconnaissance d'un épitope par un lymphocyte T va permettre quant à elle, la mise en place d'une réponse immunitaire de type « cellulaire » (Karch & Burkhard, 2016).

1.2. Mécanismes moléculaires de la mise en place de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée forment deux grands groupes : les cellules résidentes dans les tissus de l'animal (cellules dendritiques, macrophages) et les cellules circulantes dans la circulation sanguine (granulocytes neutrophiles, éosinophiles et monocytes). Elles font office de sentinelles (Moser & Leo, 2010; Vajjhala *et al.*, 2017).

Ces cellules expriment une grande variété de récepteurs (*Tableau I*), les Pattern-Recognition Receptors (ou PRR), permettant la reconnaissance d'une quantité limitée de structures moléculaires très conservées, les Pathogen-Associated Molecular Pattern (ou PAMP), exprimées par un groupe d'agents pathogènes et les Damage-Associated Molecular Pattern (ou DAMP), signaux moléculaires exprimés par les cellules en souffrance, lors de stress cellulaire (Nucléotides extranucléaires, modifications ioniques, ATP, acide urique (Shi *et al.*, 2003), etc...). Parmi les PRR, une famille se distingue et serait un point central dans l'activation de l'immunité innée : il s'agit des **Toll-Like Receptors**, (ou TLR). Des études effectuées chez l'Homme ont démontré que les TLR 1,2,4,5 et 6 étaient exprimés par une majorité de cellules et intervenaient dans la reconnaissance des PAMP d'origine bactérienne (ex : LPS). Les TLR 3,7,8 et 9 sont retrouvés majoritairement dans les compartiments intracellulaires et permettent la reconnaissance de PAMP d'origine virale et d'acides nucléiques (Akira *et al.*, 2006; Moser & Leo, 2010; Vajjhala *et al.*, 2017).

Tableau I : Exemple de PAMP reconnus par les différents TLR selon Wicherska-Pawłowska et al., 2021

TLR	Location in the Cell	Ligand	Origin of the Ligand
TLR1/2	Cell membrane	Triacylated lipopeptides	Bacteria, Mycobacteria
TLR2	Cell membrane	Hemagglutinins, glycosylphosphatidylinositol, phospholipoman, lipoarabinomannan, peptidoglycans, porins, lipoproteins	Bacteria, Mycobacteria, viruses, fungi, parasites, self
TLR3	Endolysosomal membrane	dsRNA, ssRNA	Viruses
TLR4	Cell membrane	LPS, mannan, inositol phospholipids, envelope proteins	G- bacteria, viruses, self
TLR5	Cell membrane	Flagellin	Bacteria
TLR2/6	Cell membrane	Diacylated lipopeptides, zymosan, lipoteichoic acid	Bacteria, mycobacteria, viruses, fungi
TLR7 (and human TLR8)	Endolysosomal membrane	ssRNA	Viruses, bacteria, fungi
TLR9	Endolysosomal membrane	dsDNA, CpG DNA, hemozoin	Bacteria, viruses, protozoa, self
TLR10	Endolysosomal membrane	HIV-1 gp41	Viruses
TLR11 (mice)	Cell membrane	Profilin-like molecules	Protozoa

Dès que les PRR reconnaissent un PAMP ou un DAMP, une cascade de transduction déclenche la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (notamment les interleukines IL-6 et IL-12), des interférons de type I (dont IFN- β) ou des molécules de co-stimulation (*Figure 1*). Cela permet également d'activer les mécanismes effecteurs de l'immunité innée tels que la phagocytose ou le système du complément (Akira *et al.*, 2006; Vajjhala *et al.*, 2017).

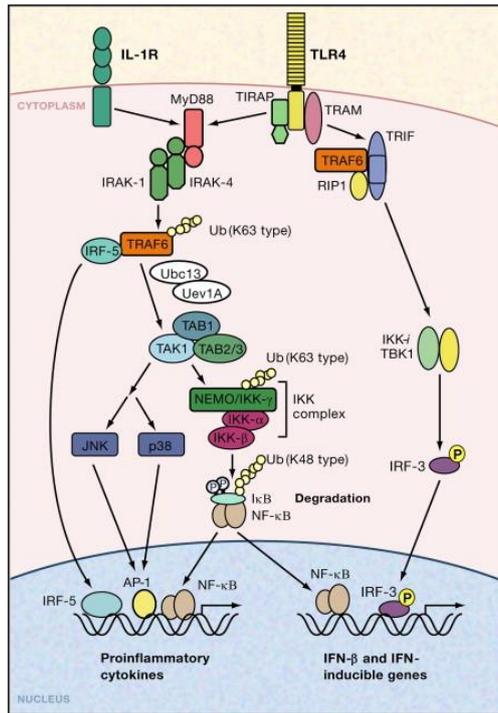


Figure 1 : Mécanisme de transduction des TLR selon Akira et al., 2006

Les IFN-I sont sécrétés par les cellules de l'immunité innée (macrophages et cellules dendritiques notamment) et sont impliqués dans l'induction de processus d'élimination des agents pathogènes intracellulaires (Figure 2). Ils permettent de stimuler les cellules de l'immunité innée en améliorant la présentation de l'antigène et contribuent ainsi à stimuler l'immunité adaptative en activant la réponse humorale T-dépendante, permettant la production d'anticorps à haute affinité contre les agents pathogènes intracellulaires. Cependant, les IFN-I jouent également un rôle d'immunomodulateurs, diminuant la production de cytokines, pouvant affecter négativement la mise en place des autres réponses effectrices de l'immunité adaptative et contribuent à la dégradation de molécules d'ARNm notamment (Ivashkiv & Donlin, 2014).

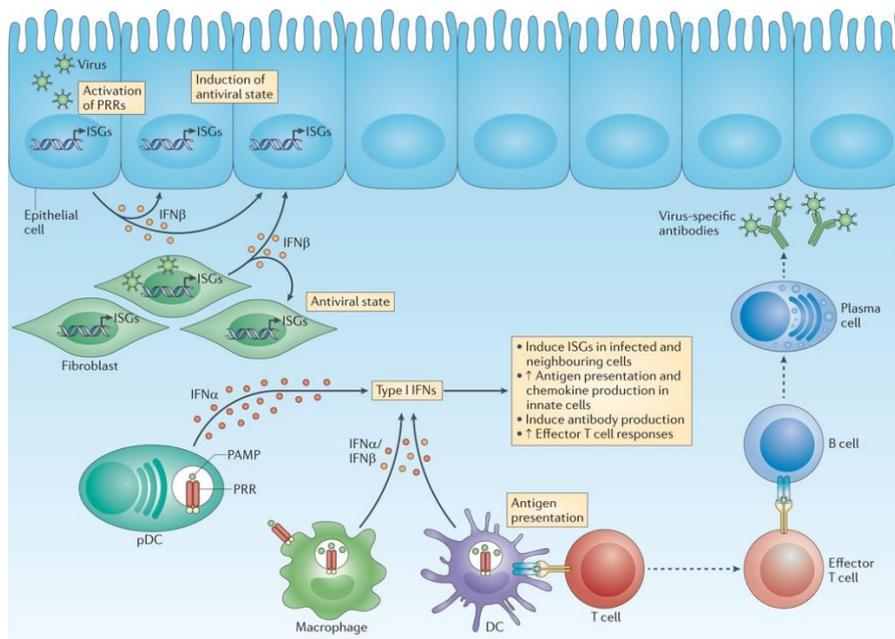


Figure 2 : Rôle des IFN de type I dans le contrôle de l'immunité innée et adaptative selon Ivashkiv & Donlin, 2014

L'immunité innée est le point de départ permettant d'activer l'immunité adaptative (Karch & Burkhard, 2016) : les cellules de l'immunité innée vont, grâce aux mécanismes de détection de signaux de dangers ou de PAMP, récolter les informations sur la présence d'un micro-organisme, sur sa nature et sa localisation, ce qui permettra l'aiguillage de la différenciation des cellules effectrices de l'immunité adaptative (Iwasaki & Medzhitov, 2015). L'orientation de la réponse immunitaire adaptative par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sera développée dans la partie sur les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative.

L'immunité innée joue un rôle prépondérant sur l'orientation de l'immunité adaptative et la connaissance des mécanismes précis ainsi que des molécules impliquées dans ces mécanismes (cytokines notamment) est fondamental dans la fabrication d'un vaccin. En effet, l'ajout d'adjuvants, qui peuvent alors jouer le rôle de signal de danger, permet d'orienter artificiellement la réponse adaptative selon le type de réponse immunitaire qu'on souhaite produire (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

1.3. Mécanismes moléculaires de la mise en place de l'immunité adaptative

Contrairement aux invertébrés, chez qui l'immunité innée est le seul type d'immunité, qui est extrêmement efficace, les vertébrés mettent en place une réponse immunitaire adaptative, qui se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunitaire, permettant une lutte plus efficace contre un agent pathogène précédemment rencontré (Little *et al.*, 2005). L'immunité adaptative se base sur des cellules spécifiques, les lymphocytes B et T. Ces cellules possèdent des récepteurs hautement spécifiques aux antigènes du pathogène. Elles peuvent être présentes dans la circulation sanguine et lymphatique, ou dans des organes lymphoïdes secondaires (rate, nœuds lymphatiques) (Moser & Leo, 2010).

1.3.1. Présentation des cellules de l'immunité adaptative

Les lymphocytes sont les cellules de l'immunité adaptative. Ce sont des cellules dérivant de cellules souches présentes dans la moelle osseuse hématopoïétique (MOH). Il existe deux types de lymphocytes (Marshall *et al.*, 2018) :

1. Les **lymphocytes T** sont des cellules exprimant des récepteurs, nommés TCR pour T-cell Receptor, reconnaissant les peptides antigéniques présentés par les CPA via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chaque lymphocyte T exprime un TCR de spécificité unique et possède la capacité de proliférer lorsqu'il est activé. Les lymphocytes T expriment également à leur surface une molécule de costimulation, soit le cluster de différenciation 4 (CD4) ou le cluster de différenciation 8 (CD8), permettant de les scinder en lymphocytes T CD4+, reconnaissant les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH-II des CPA, et en lymphocytes T CD8+, reconnaissant les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH-I des CPA (Marshall *et al.*, 2018). Ces deux sous-catégories sont à l'origine de l'induction de différents mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative, qui seront développés dans une partie consacrée.

2. Les **lymphocytes B** sont des cellules exprimant des récepteurs nommés BCR pour B-cell Receptor, capables de reconnaître directement antigènes. Ils sont capables de se différencier en plasmocytes lorsqu'ils sont activés, aboutissant à la production d'anticorps (Marshall *et al.*, 2018).

1.3.2. Mécanismes de l'immunité adaptative

1.3.2.1. Reconnaissance de l'antigène et maturation des cellules présentatrices d'antigène

Les cellules présentatrices d'antigènes ou CPA (cellules dendritiques, macrophages notamment) sont des cellules de l'immunité innée exprimant à leur surface des PRR, capables de reconnaître des PAMP ou des DAMP (Karch & Burkhard, 2016). Seules les cellules dendritiques sont capables d'initier une réponse immunitaire en activant les lymphocytes T naïfs. Les CPA sont présentes partout dans l'organisme sous la forme de cellules résidentes au sein des tissus et sont les premières à être en contact avec un épitope lors d'une effraction cutanée d'un agent pathogène (Inaba & Inaba, 2005).

Lors d'une effraction bactérienne, virale, parasitaire, les signaux de dangers (PAMP ou DAMP) des agents pathogènes ou de la cellule infectée sont reconnus par les PRR des cellules dendritiques tissulaires, ce qui entraîne l'endocytose ou la phagocytose des antigènes produits par l'agent pathogène, de l'agent pathogène entier, ou de la cellule infectée (Moser & Leo, 2010) (Figure 3).

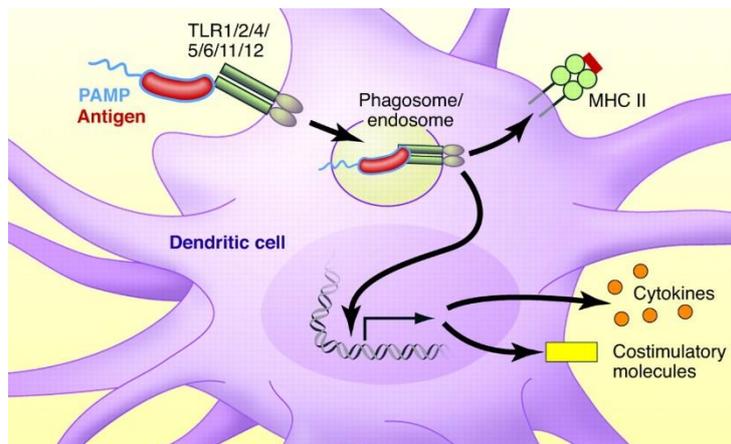


Figure 3 : Reconnaissance du PAMP par la CPA selon Iwasaki & Medzhitov, 2010

La cellule dendritique est alors activée et change de fonction : elle passe d'une cellule spécialisée dans la capture des antigènes à une cellule spécialisée dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T et contribue à leur activation. Ce changement de fonction a lieu au cours d'un phénomène appelé « maturation » des cellules dendritiques. De nombreux changements sont opérés pendant la maturation, les principaux étant l'expression en grande quantité de molécules du CMH liées aux antigènes de l'agent pathogène, la perte d'adhérence aux autres cellules environnantes, la perte de la fonction de phagocytose et la production de cytokines (notamment IL-1 β , IL-6 et TNF- α) (Moser & Leo, 2010; Takashima & Kitajima, 1998).

Les cellules dendritiques migrent ensuite jusqu'aux nœuds lymphatiques et notamment dans les zones T, riches en lymphocytes T. Cette migration est régie par la formation d'un gradient de concentration en chimiokines, notamment CCL21 et CCL19, qui vont attirer les cellules dendritiques jusqu'aux zones T des nœuds lymphatiques (Tiberio *et al.*, 2018). Les éléments endocytés ou phagocytés sont dégradés au sein de la DC, formant de nombreux débris protéiques, dont certains constituent des peptides antigéniques. Ces peptides antigéniques sont alors liés à un récepteur exprimé par les cellules de l'organisme, le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou CMH). Le complexe peptide antigénique-CMH est alors externalisé et présenté à la surface des DC aux lymphocytes T (Moser & Leo, 2010).

1.3.2.2. Activation des lymphocytes T

L'apprêtement du peptide par les cellules dendritiques est une étape clé permettant la présentation du peptide antigénique à la population lymphocytaire adéquate. En effet, les lymphocytes T CD4+ reconnaissent le complexe peptide antigénique/CMH-II tandis que les lymphocytes T CD8+ reconnaissent le complexe peptide antigénique/CMH-I. L'apprêtement antigénique passe par des mécanismes moléculaires intracellulaires permettant la formation du complexe antigène-CMH. Il existe plusieurs mécanismes d'apprêtement du peptide antigénique (Kotsias *et al.*, 2019; M. Y. Lee *et al.*, 2020) (Figure 4) :

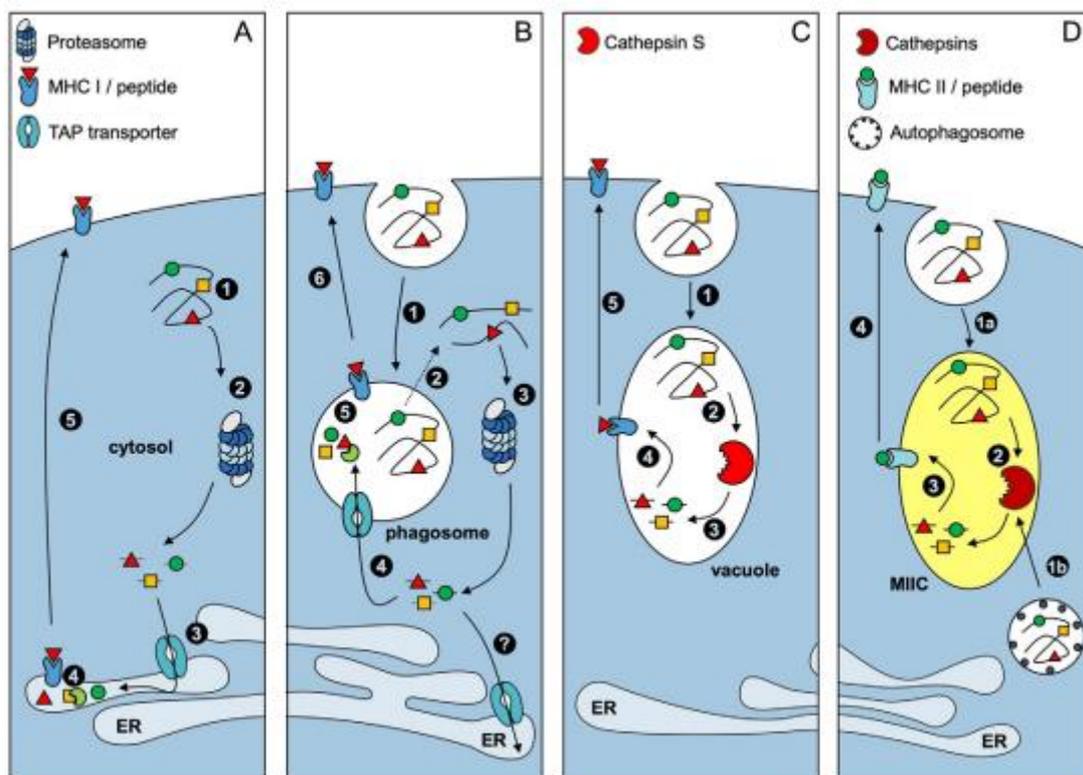


Figure 4 : Mécanismes d'apprêtement du peptide antigénique selon Kotsias *et al.*, 2019

1. La voie de **présentation classique du CMH-I** (*Figure 4A et Figure 5*): Les molécules du CMH-I sont exprimées constitutivement par la plupart des cellules nucléées. Cette voie permet la présentation des peptides antigéniques d'origine cytosolique par les cellules. Elle est principalement mise en place lors d'infections virales, par des agents pathogènes intracellulaires ou par des antigènes tumoraux et permet la reconnaissance du complexe peptide antigénique/CMH-I par les lymphocytes T CD8+ (*Kotsias et al., 2019; M. Y. Lee et al., 2020*). A la suite d'une infection virale, par exemple, des protéines virales sont produites dans le cytosol de la cellule dendritique (*Figure 5,1*). Ces protéines virales sont dégradées par un complexe enzymatique appelé protéasome, qui permet de produire des peptides antigéniques (*Figure 5,2*). Ces peptides sont ensuite pris en charge par des protéines TAP (Transporter associated with Antigen Processing), qui les transportent jusqu'au réticulum endoplasmique, dans lesquels sont présentes des molécules CMH-I (*Figure 5,3*). La molécule CMH-I et le peptide antigénique possédant une bonne affinité sont ensuite assemblés puis transportés à la surface de la cellule, où ils sont présentés aux lymphocytes T CD8+ et vont être reconnus par le TCR (*Figure 5,5 et 6*) (*Kotsias et al., 2019*). Après cette reconnaissance active, les lymphocytes T CD8+ vont proliférer et se différencier en cellules immunitaires cytotoxiques, à l'origine de la mort de la cellule infectée. Cette voie permet notamment de combattre les agents pathogènes intracellulaires (*Moser & Leo, 2010*).

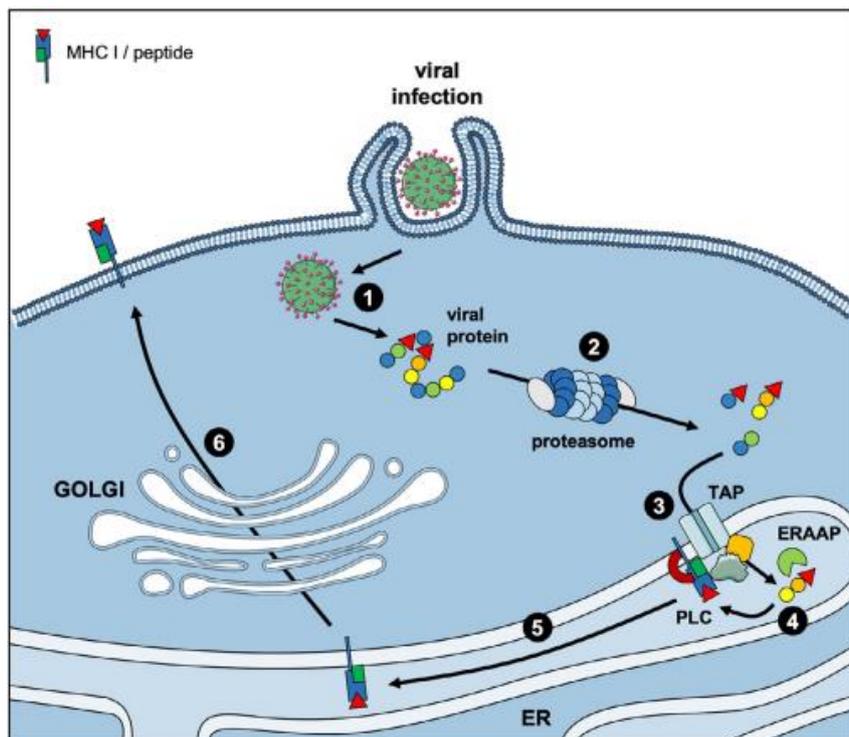


Figure 5 : Voie de présentation classique du CMH-I selon Kotsias et al., 2019

2. La voie de **présentation classique du CMH-II** (Figure 4D et Figure 6) : Les molécules du CMH-II sont des molécules exprimées uniquement par quelques cellules immunitaires spécialisées (cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B). Cette voie permet la prise en charge de peptides antigéniques d'origine endosomale (Kotsias *et al.*, 2019). Après l'internalisation de l'antigène par endocytose, pinocytose ou phagocytose (Figure 6, 1 noir), l'antigène est dégradé partiellement par des protéases présentes dans la vésicule de phagocytose ou d'endocytose (Figure 6, 2 noir). La vésicule endosomale fusionne avec le compartiment MIIC (Figure 6, 3a noir). Au sein de ce compartiment, les peptides antigéniques sont à nouveau dégradés par des cathepsines et des protéases lysosomales pour former des peptides encore plus petits (Figure 6, 4 noir). Le peptide CLIP présent sur les molécules du CMH-II est également dégradé, ce qui permet la fixation des peptides antigéniques sur les molécules du CMH-II (Figure 6, 5 noir). Les complexes peptides antigéniques/CMH-II sont ensuite transportés vers la membrane plasmique de la cellule et vont être reconnus spécifiquement par les TCR des lymphocytes T CD4+ (Figure 6, 6a et 6b noir) (Kotsias *et al.*, 2019). La liaison du CD4 avec la molécule CMH-II entraîne une cascade de phosphorylations, à l'origine de l'expression de facteurs de transcription (NF- κ B, NFAT, AP-1), qui vont permettre l'activation du lymphocyte T (Rudd *et al.*, 1988). Le lymphocyte T activé devient alors un lymphocyte T helper (Th) ou un lymphocyte T régulateur (Treg) et agit selon plusieurs mécanismes, qui seront développés dans la partie sur les mécanismes effecteurs des lymphocytes T CD4+.

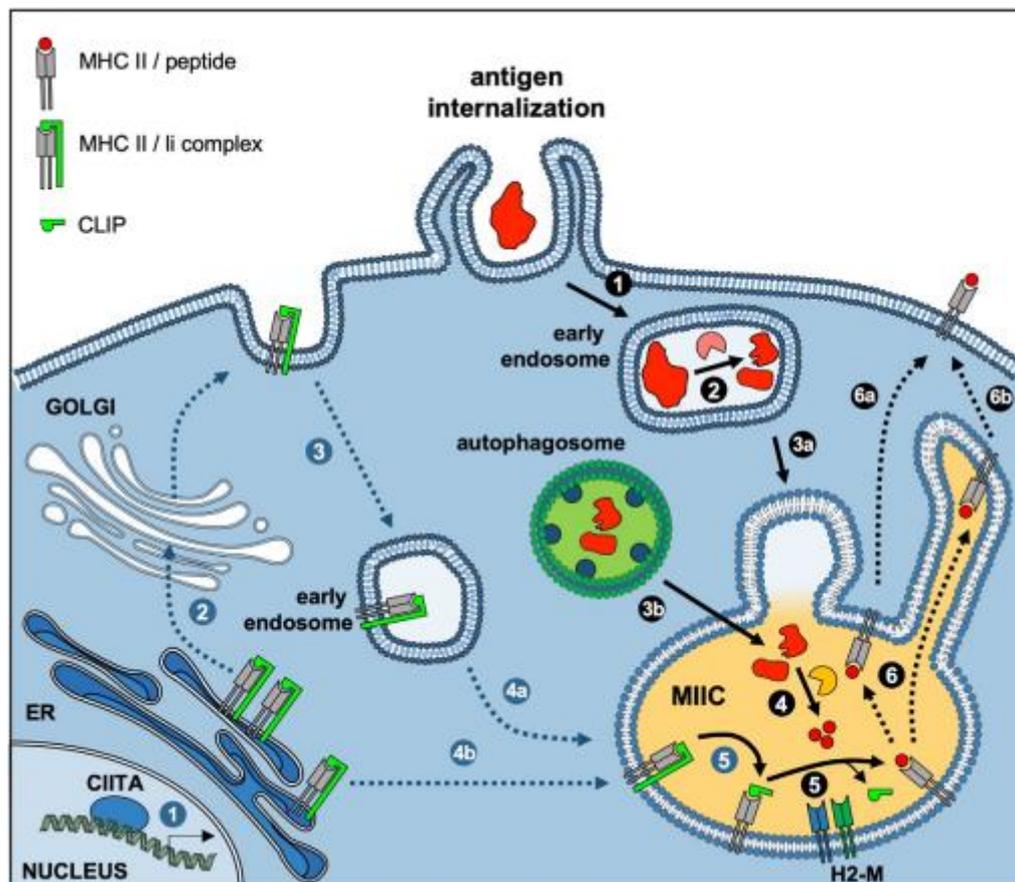


Figure 6 : Voie de présentation classique du CMH-II selon Kotsias *et al.*, 2019

3. Les voies de **présentation croisée** (Figure 4B et C) : La voie classique de présentation du CMH-I permet la reconnaissance du peptide antigénique d'origine cytosolique qui est donc issu majoritairement d'antigène endogène, produit par la cellule elle-même et apprêté par la voie protéasomale par les lymphocytes T CD8+. La voie classique de présentation du CMH-II permet la reconnaissance du peptide antigénique majoritairement d'origine exogène et apprêté par la voie endosomale par les lymphocytes T CD4+. Cependant, des mécanismes de présentation croisée sont décrits, à savoir des mécanismes permettant la présentation des antigènes endogènes via le CMH-II aux lymphocytes T CD4+ et inversement, la présentation des antigènes exogènes via le CMH-I aux lymphocytes CD8+. Des antigènes endogènes peuvent être pris en charge dans des autophagosomes, qui fusionnent alors avec le compartiment MIIC (Figure 6, 3b noir) et qui suivent alors la voie classique de présentation du CMH-II. Des antigènes exogènes peuvent être internalisés par endocytose, phagocytose ou pinocytose (Figure 4B, 1). Dans la vésicule d'endo-phagocytose, l'antigène est dégradé en peptides antigéniques, qui sont libérés dans le cytosol, où ils sont pris en charge par la voie protéasomale et qui suivent alors la présentation classique de présentation du CMH-I (Figure 4B, 2 et 3) (Kotsias *et al.*, 2019).

1.3.2.3. Activation des lymphocytes B

L'activation des **lymphocytes B** est permise par deux mécanismes :

- ❖ La reconnaissance de l'antigène de l'agent pathogène par le récepteur des lymphocytes B (le BCR pour B-Cell Receptor) qui permet d'initier son activation. Cependant, la finalisation de cette activation est permise par l'intervention de lymphocytes T CD4+ activés, les lymphocytes T folliculaires (lymphocytes Tfh), qui sécrètent des cytokines responsables de l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes. C'est l'activation B « T-dépendante » (Janeway *et al.*, 2001).
- ❖ Parfois, l'activation des lymphocytes B et leur maturation en plasmocytes est entraînée sans l'intervention de lymphocytes Tfh. Ce mode d'activation est appelé activation B « T-indépendante » (Karch & Burkhard, 2016).

L'activation des lymphocytes entraîne la mise en place de mécanismes immunitaires effecteurs (Siegrist, 2013).

Après activation, les lymphocytes vont se multiplier pour ensuite se différencier en lymphocytes effecteurs et en lymphocytes mémoires (Siegrist, 2013).

1.3.3. Effecteurs de la réponse immunitaire adaptative

Les réponses effectrices de l'immunité adaptative se divisent en plusieurs catégories (Figure 7) :

Les lymphocytes T CD8+ se différencient en lymphocytes cytotoxiques, qui vont produire une réponse cellulaire (Siegrist, 2013).

Les lymphocytes T CD4+ se différencient en lymphocytes helpers, à l'origine d'une grande diversité de réponses (Th1, Th2, Th17 et Treg notamment) (Siegrist, 2013).

Concernant, les lymphocytes B, les cellules effectrices sont les plasmocytes, qui produisent des anticorps (Siegrist, 2013).

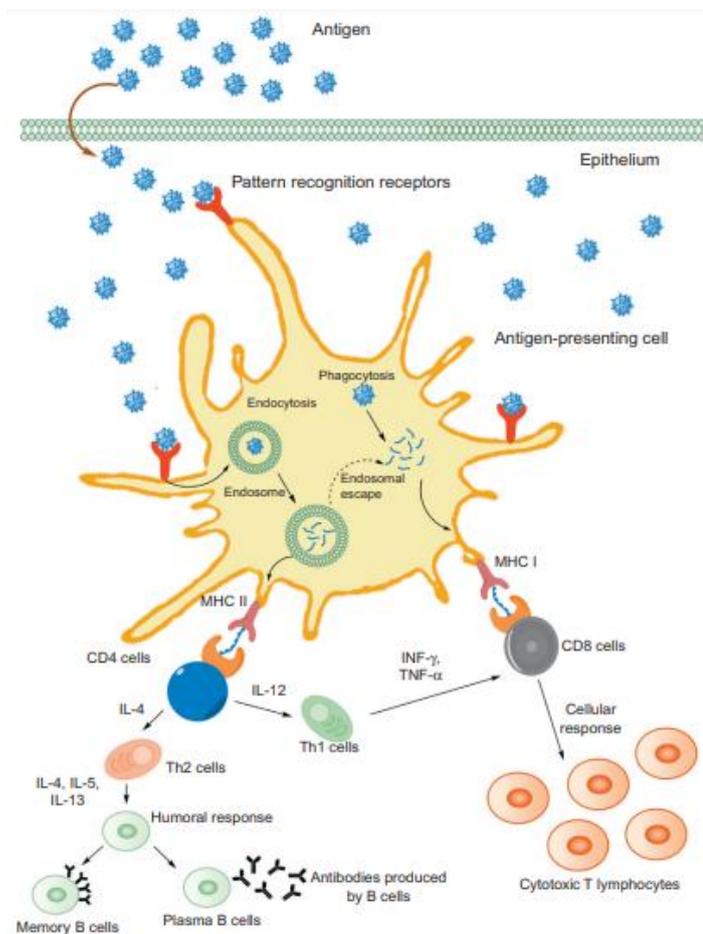


Figure 7 : Activation des lymphocytes T par le CD8 et le CD4 selon Nevagi et al., 2018

1.3.3.1. Les anticorps

Les anticorps sont les principaux effecteurs de l'immunité humorale. Ce sont des glycoprotéines en forme de Y et sont constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères liées entre elles par le biais de ponts disulfures. Ce sont des molécules capables de reconnaître spécifiquement un antigène et de s'y associer selon un modèle « clé-serrure ». Les chaînes légères sont composées de deux sous-types (κ et λ) et s'associent à l'un des cinq classes de chaînes lourdes (α , γ , δ , ϵ et μ), qui vont déterminer la classe d'immunoglobuline produite : respectivement IgA, IgG, IgD, IgE et IgM (Moser & Leo, 2010; Schroeder & Cavacini, 2010).

Les anticorps sont également composés de deux parties (Figure 8) : Le fragment Fab est constitué d'une chaîne légère complète et des segments V et C_{H1} de la chaîne lourde (Schroeder & Cavacini, 2010). Le fragment Fc est le fragment qui permet à l'anticorps de se fixer sur des leucocytes et de les activer (Birdsall, 2015).

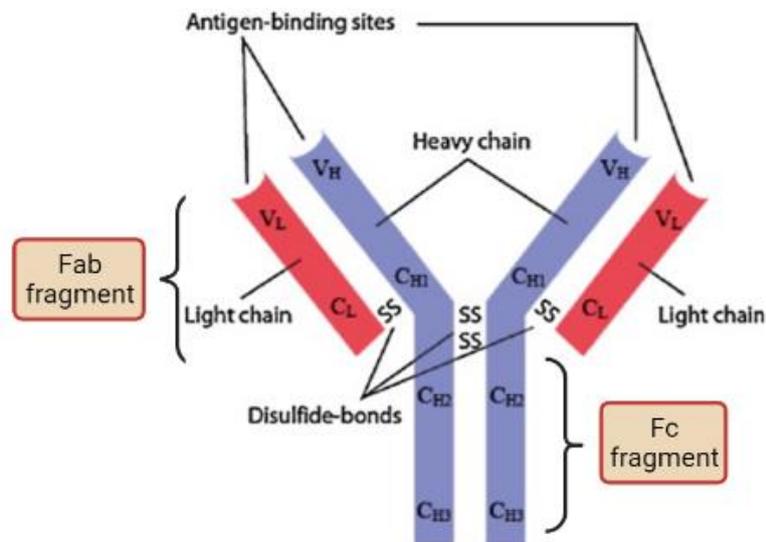


Figure 8 : Structure d'un antigène selon Moser & Leo, 2010

La reconnaissance antigène-anticorps se base sur la liaison entre le paratope (structure de l'anticorps sur lequel se fixe l'antigène) et l'épitope (structure de l'antigène qui se fixe à l'anticorps) et cette interaction est à l'origine de plusieurs phénomènes (Schroeder & Cavacini, 2010) :

- ❖ **L'opsonisation** : Les phagocytes possèdent à leur surface des récepteurs capables de reconnaître la fraction Fc des anticorps. La partie Fab est liée à l'antigène de l'agent pathogène, et la partie Fc se fixe au récepteur phagocytaire, augmentant ainsi leur efficacité (Hiemstra & Daha, 1998).
- ❖ **L'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)** : A la suite d'une double fixation d'IgG sur un antigène cellulaire par leur partie Fab, et par leur partie Fc sur les récepteur FcγR des cellules cytotoxiques (cellules NK notamment). Ces dernières sont activées et libèrent des granules cytotoxiques contenant des enzymes lytiques (perforines et granzymes) à l'origine de la lyse de la cellule infectée ou anormale et de son apoptose (Garvin *et al.*, 2021).
- ❖ **Activation du complément** : Le système du complément est un ensemble de protéines (plus de 40) impliquées dans une cascade de réactions et activé par plusieurs voies (classique, des leptines et alternative. Les anticorps ne sont impliqués que dans l'activation de la voie classique. Cela entraîne notamment la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui crée des pores dans la membrane plasmique d'un micro-organisme, induisant sa lyse mais aussi la production d'opsonines et d'anaphylatoxines impliquées dans la réaction inflammatoire (Schartz & Tenner, 2020).
- ❖ **La neutralisation** : C'est un mécanisme qui permet aux anticorps de se lier à l'antigène et d'inactiver ses fonctions biologiques. Le cas de la neutralisation des virus permet de comprendre l'ensemble de mécanismes à l'origine de ce phénomène (Reading & Dimmock, 2007) :
 - **Agrégation des particules virales (Figure 9a)** : Les anticorps sont constitués de deux fractions Fab, pouvant se lier à deux virus à la fois, entraînant la diminution du nombre de protéines de surface disponibles pour la fixation sur la membrane cellulaire (Reading & Dimmock, 2007).

- **Déstabilisation de la structure virale (Figure 9b)** : La fixation de certains anticorps sur les antigènes viraux mime la fixation à un récepteur cellulaire et entraîne la libération prématurée du matériel génétique viral dans le milieu extracellulaire (Reading & Dimmock, 2007).
- **Inhibition de la fixation du virus sur la cellule (Figure 9c)** : L'infection cellulaire par un virus débute par l'étape de fixation d'une protéine virale d'attachement au récepteur cellulaire. Certains anticorps neutralisants sont capables de recouvrir les particules virales et d'empêcher cette fixation aux récepteurs cellulaires (Reading & Dimmock, 2007).
- **Inhibition de l'entrée du virus dans la cellule (Figure 9d)** : La fixation d'un anticorps aux protéines de fusions inhibe la fusion des deux membranes dans le cas des virus enveloppés. La fixation des anticorps aux protéines de la capsidie des virus permet la stabilisation de ces protéines et donc d'inhiber les réarrangements nécessaires à l'endocytose des virus nus (Reading & Dimmock, 2007).
- **Inhibition de la réplication (Figure 9e)** : Certains anticorps sont capables de se fixer sur des récepteurs extra-cellulaires et d'activer ainsi la transduction d'un signal à l'origine de la modification du complexe de réplication viral, inhibant le processus infectieux (Reading & Dimmock, 2007).
- **Neutralisation post-entrée (Figure 9f)** : Certains anticorps peuvent être endocytés avec la particule virale, se fixer aux épitopes viraux et induire une modification du virus, le rendant incapable de se répliquer (Reading & Dimmock, 2007).
- **Transcytose des IgA (Figure 9g)** : Les IgA ont la capacité d'être endocytées lors du phénomène de transcytose. La neutralisation est alors intracellulaire et a lieu lors de la fusion de la vésicule de transcytose des IgA et de la vésicule d'endocytose virale (Reading & Dimmock, 2007).
- **Inhibition de la libération des virions (Figure 9h)** : Les anticorps se fixent sur les protéines de surface des nouveaux virions, qui fusionnent avec la membrane. Cette fixation crée une conformation nouvelle, permettant de bloquer la particule virale sur le récepteur cellulaire, qui est alors piégée (Reading & Dimmock, 2007).

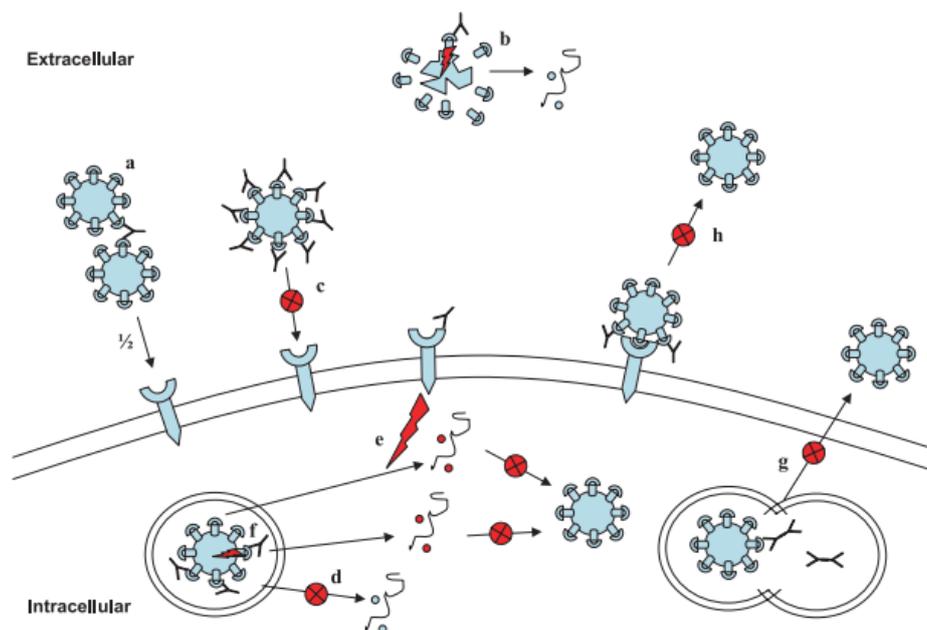


Figure 9 : Mécanismes de neutralisation des virus selon Reading & Dimmock, 2007

- ❖ La **dégranulation des mastocytes** : Les mastocytes sont capables de fixer la partie Fc des IgG et IgE grâce aux FcR associés, ce qui entraîne la dégranulation de leurs granules contenant des médiateurs chimiques tels que l'histamine, à l'origine de réactions inflammatoires et parfois de réactions d'hypersensibilité. Ces médiateurs chimiques interviennent dans la communication cellulaire : l'histamine, certaines IL, des chimiokines et les TNF produits par les mastocytes favorisent le recrutement de DC, de lymphocytes et des neutrophiles par chimiotactisme dans les tissus et favorisent la présentation de l'antigène par les DC, les eicosanoïdes (leucotriènes et prostaglandines) participent à la contraction des cellules musculaires lisses et à la transduction nerveuse d'un signal de douleur (*Figure 10*) (Abraham & St John, 2010).

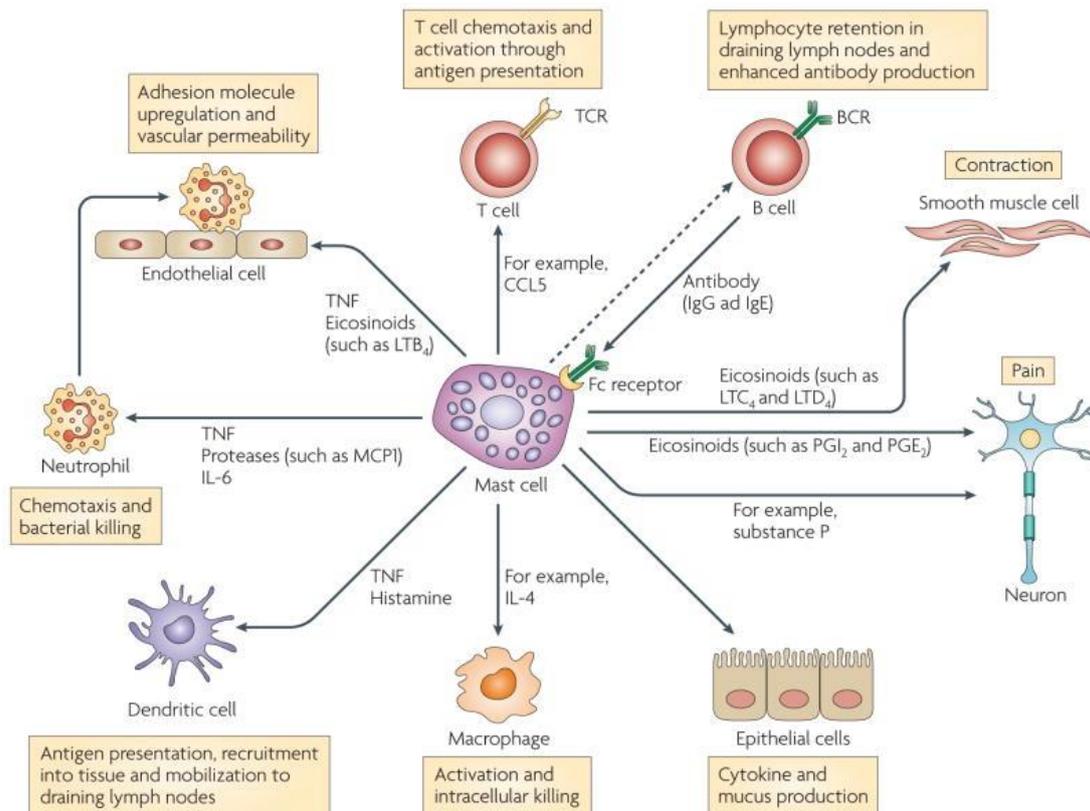


Figure 10 : Implication des mastocytes dans la communication cellulaire et la défense immunitaire selon Abraham & St John, 2010

1.3.3.2. Effecteurs des lymphocytes T

1.3.3.2.1. Effecteurs des lymphocytes T CD8+

La reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH-I de la CPA par le TCR des lymphocytes T CD8+ permet de les activer, entraînant leur différenciation en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL). Ces cellules ont la capacité de synthétiser des protéines formant des pores (appelées « perforines ») dans la membrane des cellules infectées, par lesquels les CTL vont introduire différentes protéases dans le milieu intracellulaire. L'action des protéases va permettre l'induction d'un signal apoptotique, ou la lyse de ces cellules infectées (Moser & Leo, 2010).

Il a été démontré que ces CTL sont également capables d'inhiber le processus de réplication des agents pathogènes intracellulaires, limitant ainsi la propagation de l'infection. Dans le cas des virus, les CTL sont même capables d'inhiber la réplication virale, tout en maintenant l'intégrité de la cellule infectée. Ce mécanisme est permis par les protéases, qui n'induisent pas un signal apoptotique mais cible les complexes de réplication des virus (Knickelbein *et al.*, 2008; Moser & Leo, 2010).

Il repose sur la production de cytokines (notamment les TNF et les interférons) (Bartee *et al.*, 2008; Knickelbein *et al.*, 2008; Moser & Leo, 2010).

1.3.3.2.2. Effecteurs des lymphocytes T CD4+

La reconnaissance du peptide antigénique présenté par le CMH-II de la CPA par le TCR des lymphocytes T CD4+ permet d'activer de nombreuses voies de réponses immunitaires (Réponses Th). Le rôle de ces cellules effectrices va permettre la synthèse de nombreuses cytokines (IL, TNF, IFN) à l'origine de nombreuses actions comme le maintien de l'inflammation, le renforcement de certaines réponses Th, la stimulation de la production des anticorps par les plasmocytes, le recrutement de cellules de l'immunité innée ou adaptative, etc... (Moser & Leo, 2010).

Les différentes réponses induites par les lymphocytes Th sont (Figure 11) :

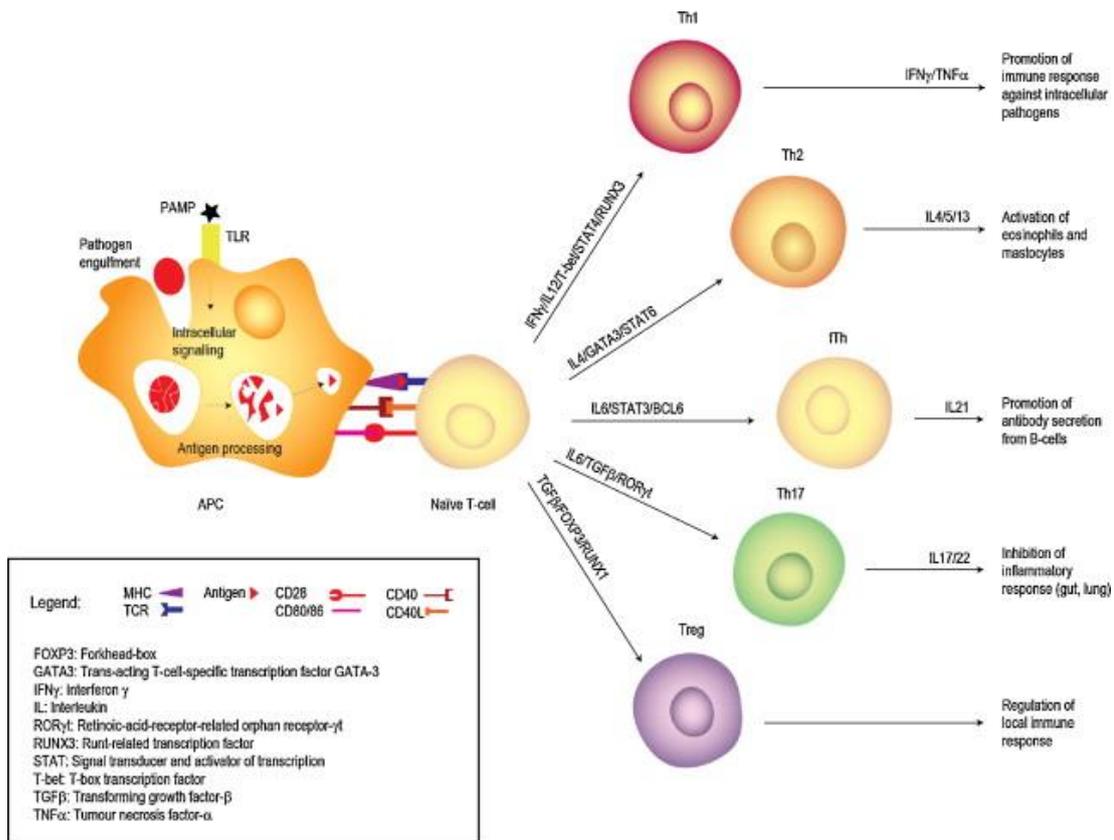


Figure 11 : Diversité des réponses T helper selon Moser & Leo, 2010

- ❖ La réponse **Th1** : Les cellules activées en lymphocytes Th1 produisent majoritairement l'IFN- γ , cytokine à l'origine d'une expression massive de molécules du CMH et avec des propriétés antivirales. Le TNF- α joue également un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD8+, jouant ainsi un rôle important dans la mise en place d'une immunité contre les agents pathogènes **intracellulaires** (Moser & Leo, 2010). La réponse Th1 permet l'induction d'une **réponse cellulaire cytotoxique** et l'activation des macrophages, qui voient leur activité microbicide augmentée (Karch & Burkhard, 2016).
- ❖ La réponse **Th2** : Les lymphocytes Th2 produisent notamment des IL-4, IL-5 et IL-13, connues notamment pour activer les granulocytes éosinophiles et les mastocytes, à l'origine d'une immunisation contre les **parasites extracellulaires** (nématodes intestinaux notamment) (Finkelman *et al.*, 2004; Moser & Leo, 2010). Une hyperstimulation de cette réponse immunitaire est corrélée à des réponses allergiques, dues à une production excessive d'IgE (Moser & Leo, 2010). La réponse Th2 intervient également dans la régulation de la **réponse humorale** par le biais d'une activation des lymphocytes B en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps (Karch & Burkhard, 2016).
- ❖ La réponse **fTh** : Ces cellules sont des lymphocytes Th folliculaires, jouant un rôle promoteur de la sécrétion humorale des lymphocytes B. En effet, ils sont capables d'induire un haut niveau de production d'anticorps par les lymphocytes B, notamment en sécrétant des IL-21. Ils sont également capables d'intervenir dans la maturation de la réponse humorale en induisant une commutation de classe et une maturation d'affinité des anticorps produits par les plasmocytes. Cette lignée fTh est connue pour favoriser la production d'anticorps post-vaccinale (Moser & Leo, 2010).
- ❖ La réponse **Th17** : Les lymphocytes Th17 permettent l'immunisation contre certaines espèces de bactéries et de moisissures à multiplication extracellulaire en produisant des IL-17 et IL-22 régulant les mécanismes de phagocytose notamment, et en augmentant l'efficacité de la barrière cutané-muqueuse (augmentation de la production de peptides antimicrobiens). Ils régulent les inflammations locales au niveau des poumons et des intestins, mais ils constituent en revanche la population majoritaire dans les réactions auto-immunes (Moser & Leo, 2010; Park *et al.*, 2005).

Une autre action de ces cellules T CD4+ effectrices est la régulation de l'inflammation par le biais de la réponse Treg : Les lymphocytes T régulateurs sont un type de lymphocytes CD4 exprimant le CD25 ainsi que le facteur de transcription Foxp3 et ayant une activité inhibitrice de la réaction inflammatoire et de la réaction immunitaire, en inhibant une grande partie des cellules impliquées dans la réponse immunitaire (CPA, cellules effectrices et lymphocytes T helper) (Moser & Leo, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2008). Les cellules Treg jouent donc un rôle fondamental dans l'équilibre de la réaction inflammatoire et de la réaction immunitaire par le biais de la libération de TGF- β et d'IL-10 (Horwitz *et al.*, 2008; Moser & Leo, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2008)

L'orientation de la réponse effectrice T helper est grandement influencée par le type de CPA reconnaissant le PAMP, qui diffère selon le type d'agent pathogène :

A la suite d'une **infection virale** et la détection des acides nucléiques viraux par les détecteurs de l'immunité innée, une production d'IFN de type I (IFN-I) et d'IL-12 est déclenchée par les DC CD8 α +, CD103+ Batf3-dépendants (*Figure 12*). Ces DC sont également capables de reconnaître les signaux de dangers exprimés par les cellules nécrotiques (F-actine) par le biais de leur récepteur CLECL9A. La production de ces cytokines entraîne l'induction de la réponse cytotoxique (CTL) (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

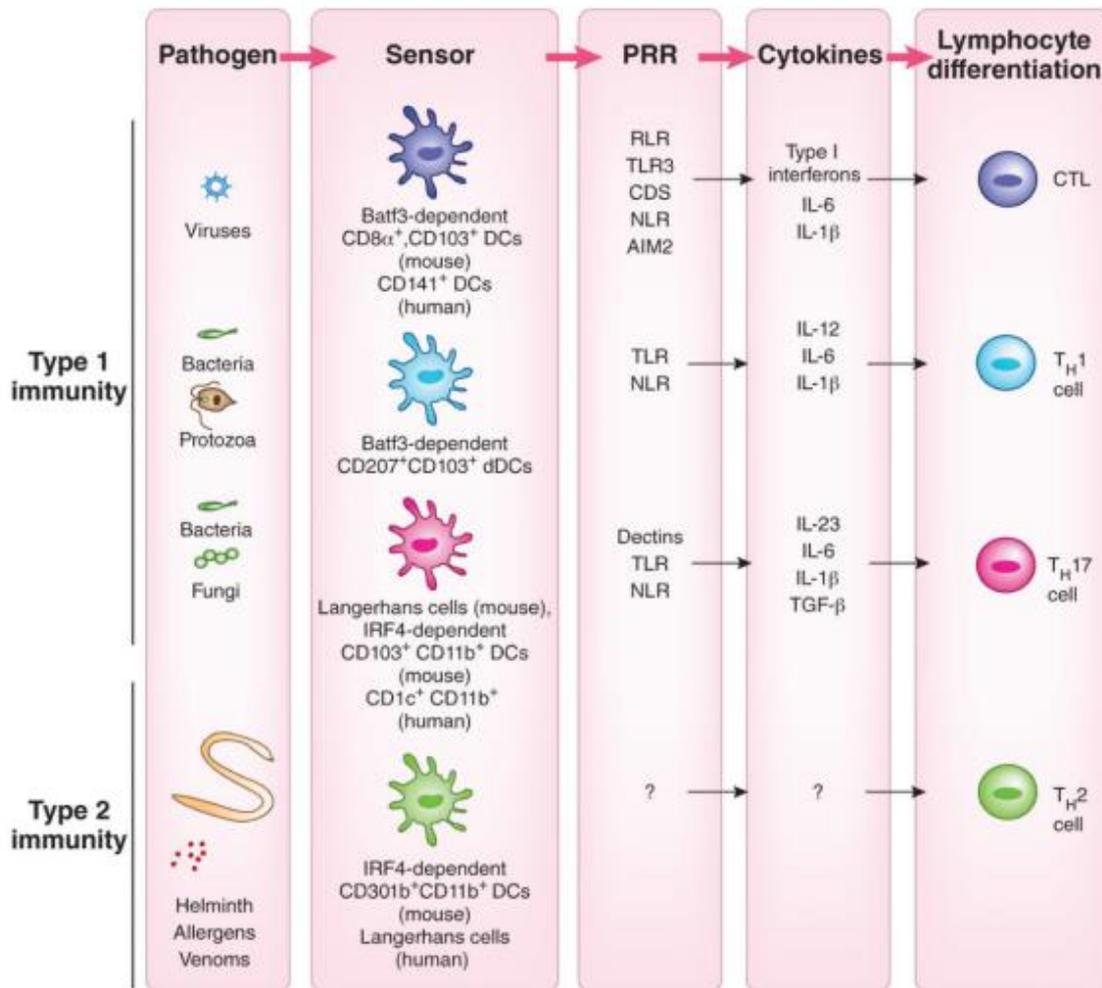


Figure 12 : Orientation des réponses effectrices Th et CTL par les cellules dendritiques selon Iwasaki & Medzhitov, 2015

Les infections par des **bactéries et des protozoaires intracellulaires** nécessitent la mise en place d'une réponse CTL et d'une réponse Th1 (*Figure 12*). La reconnaissance des PAMP de ces agents pathogènes intracellulaires par les TLR des DC CD103+, CD207+ Batf3-dépendants entraîne la production et la libération d'IL-12, à l'origine de la mise en place des réponses CTL et Th1 (Karch & Burkhard, 2016).

Les infections par des **bactéries et champignons extracellulaires** nécessitent la mise en place d'une réponse Th17 (*Figure 12*). Les PRR nommées C-type lectine receptors (CLR) comme les dectines-1 et dectines-2 exprimés par les DC CD103+, CD11b+ dépendants du facteur de transcription IRF4, les cellules de Langerhans et les macrophages reconnaissent les PAMP des micro-organismes extracellulaires, entraînant une production de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-23, cytokines jouant un rôle majeur dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th17 (Karch & Burkhard, 2016).

Les mécanismes de détection des **allergènes** et des **parasites** ne sont pas entièrement élucidés mais des études ont montré l'implication des DC 301b+, CD207- dans la mise en place d'une réponse Th2 (Karch & Burkhard, 2016).

La mise en place d'une **production d'anticorps T-dépendante par les lymphocytes B** nécessite trois facteurs : la fixation d'un antigène par les BCR des lymphocytes B, de stimulation des lymphocytes B par les lymphocytes T folliculaires (Tfh) et de l'action de nombreuses cytokines, qui induisent des changements de classe d'immunoglobulines. La fixation de la molécule de co-stimulation CD21 sur le BCR n'est permise que si l'antigène a été opsonisé par une protéine du complément, le tout formant le complexe C3d du complément. La formation de ce complexe et sa reconnaissance par les lymphocytes B est à l'origine d'une augmentation significative de la sensibilité de ces lymphocytes B. Le choix de l'isotype d'immunoglobuline est régulé par la présence de TLR présents sur les lymphocytes B, qui permettent de détecter l'antigène seul, ou associé à un PAMP, ce qui modifie le type d'anticorps produit (Karch & Burkhard, 2016).

1.3.4. Réponse primaire, secondaire et persistance de la réponse immunitaire

Lors de la reconnaissance d'un antigène par le récepteur spécifique, les lymphocytes exprimant ce récepteur s'activent puis se multiplient et prolifèrent, au détriment des autres populations lymphocytaires n'exprimant pas ce récepteur. Ce phénomène est appelé « sélection clonale » (Moser & Leo, 2010).

Une partie des lymphocytes sélectionnés vont se différencier en lymphocytes effecteurs, qui vont permettre d'éliminer ou de neutraliser l'antigène porté par l'agent pathogène et de réguler la réponse immunitaire. Une autre partie des lymphocytes sélectionnés (les lymphocytes mémoires) va être conservée tout au long de la vie de l'animal et va circuler durablement dans l'organisme. Des études ont ainsi montré chez l'Homme une persistance des lymphocytes B pouvant aller jusqu'à 90 ans chez un patient ayant rencontré le virus H1N1 en 1918. Lorsque ces lymphocytes sélectionnés (les lymphocytes mémoires) vont reconnaître à nouveau l'antigène spécifique, ils induisent une réponse immunitaire beaucoup plus rapide et efficace que lors du premier contact avec ce même antigène (Moser & Leo, 2010).

La réponse primaire se met en place lors de la première rencontre d'un antigène porté par un agent pathogène avec le système immunitaire. Ces antigènes sont pris en charge par les cellules dendritiques ou diffusent jusqu'aux nœuds lymphatiques, où ils vont activer les lymphocytes B et/ou T. On peut distinguer trois types de réponses selon la nature de l'antigène : la **réponse B T-dépendante**, déclenchée par des antigènes protéiques induisant des réponses B et T, à l'origine d'une différenciation très efficace des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps très spécifiques et en cellules B mémoire au sein de structures spécifiques nommées centres germinatifs (CG), la **réponse B T-indépendante**, déclenchée par des antigènes polysaccharidiques, incapables d'activer les lymphocytes T ainsi que les CG et sont donc incapables d'induire une mémoire immunitaire et la **réponse T**, déclenchée par une grande majorité des antigènes, capables d'induire la différenciation des lymphocytes B et T naïfs en lymphocytes B et T mémoires (Siegrist, 2013).

L'intensité de la réponse immunitaire primaire est régie par de nombreux facteurs tels que l'immunogénicité intrinsèque de l'antigène (certains sont plus immunogènes que d'autres), le type de réponse induite (la réponse T-dépendante permet de produire une mémoire immunitaire et des anticorps à haute affinité, contrairement à la réponse T-indépendante), ou encore l'âge lors de l'immunisation (les jeunes et les animaux âgés ont parfois un système immunitaire encore imparfait ou sénéscent, l'immunité produite est donc moins importante que chez l'adulte) (Siegrist, 2013).

La réponse immunitaire secondaire a lieu quand l'organisme est remis en contact avec l'antigène (soit vaccinal lors des rappels, soit du pathogène lors d'une infection). Cette réponse est rapide et ne nécessite pas la mise en place d'une réponse germinative, car ce sont les lymphocytes B mémoires qui vont être activés et différenciés en plasmocytes (Figure 13). Les anticorps produits ont encore plus d'affinité que les anticorps produits lors de la réponse primaire car les plasmocytes ont subi des hypermutations somatiques (Siegrist, 2013).

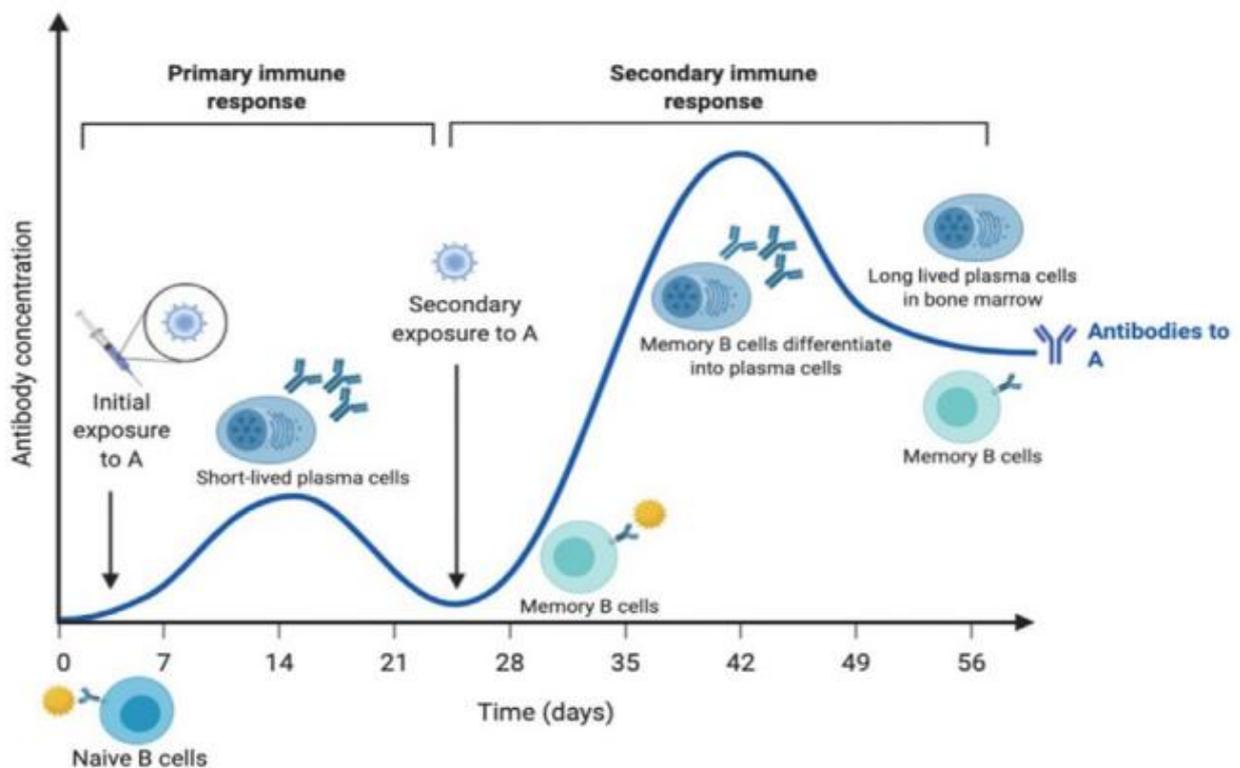


Figure 13 : Graphique illustrant la réponse immunitaire primaire et secondaire selon Mahalingam et al., 2021

Les lymphocytes T naïfs ont une durée de vie assez faible (de l'ordre de quelques jours). L'animal a donc besoin des lymphocytes T mémoires pour assurer une immunisation durable. Il existe deux types de lymphocytes T mémoires (Siegrist, 2013) :

- ❖ Les lymphocytes T mémoires effecteurs (Tem) sont des lymphocytes circulant dans la circulation sanguine et les tissus (sauf les organes lymphoïdes) afin de surveiller l'absence d'une infection par l'agent pathogène. Ils possèdent un pouvoir cytotoxique important, qu'ils utilisent en cas d'identification d'un agent pathogène (Siegrist, 2013).

- ❖ Les lymphocytes T mémoires centraux (T_{cm}) sont des lymphocytes circulant entre les nœuds lymphatiques, qui ne possèdent pas de pouvoir cytotoxique mais sont capables de proliférer et d'activer un grand nombre de cellules effectrices lorsque les cellules dendritiques leur présentent un antigène exogène au sein du nœud lymphatique (Siegrist, 2013).

Cette première partie nous a permis d'étudier l'ensemble des mécanismes immunitaires à l'origine de la mise en place d'une réponse immunitaire efficace et durable. La seconde partie se concentrera sur l'histoire associée à la création des vaccins, les différents types de vaccins conventionnels développés, aux types de mécanismes immunitaires effecteurs qu'ils induisent afin de mettre en place une réponse immunitaire et à leurs avantages et leurs limites.

2. Généralités sur les vaccins conventionnels

2.1. Historique de la vaccination

2.1.1. La variolisation : Première étape vers la vaccination

Les premiers écrits mentionnant l'utilisation de procédés analogues à la vaccination datent de l'Antiquité : Mithridates VI du Pont pensait qu'en ingérant de faibles doses de poison, il pourrait s'immuniser contre l'empoisonnement (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; Macnalty, 1966). Ce postulat aurait permis de poser les bases d'une réflexion centrée sur la mise en place d'une résistance acquise par le biais d'une exposition répétée à un poison, et ferait de Mithridates VI le précurseur de la vaccination. Cependant, ce récit ne repose sur aucune réalité historique (Valle *et al.*, 2012).

La variolisation est une méthode d'induction de l'immunité contre la variole. Elle consiste à mettre en contact des individus sains avec des matières virulentes (pus, croûtes) provenant de patients ayant contracté une forme bénigne de variole (Cliff & Smallman-Raynor, 2013). Ce procédé est à l'origine de divers travaux qui donneront plus tard naissance à la vaccination.

Les premières références à l'utilisation de la variolisation datent de la fin du VI^e siècle après JC (Cliff & Smallman-Raynor, 2013), mais les premiers protocoles datent du Xe siècle après JC et proviennent de Chine. Les médecins chinois préconisaient alors aux patients d'apposer des croûtes fraîches de patients variolés sur leur peau pendant une durée d'un mois, conditions limitant la présence du virus sous sa forme virulente. Une autre méthode consistait à prescrire des inhalations (Fenner *et al.*, 1988).

La variolisation semble s'être développée de manière simultanée et indépendante en Inde, puis est introduite en Afrique du Nord et notamment en Egypte par les Mamelouks durant le XIII^e siècle, et atteint l'Europe lors du XVIII^e siècle (Fenner *et al.*, 1988).

C'est sous l'impulsion de plusieurs acteurs que la variolisation est introduite en Europe et prend son essor au début du XVIII^e siècle : le premier acteur est la Royal Society of London, qui rapporte les protocoles d'inhalation utilisés par les guérisseurs chinois. En 1714 et 1716, Emanuele Timoni et Jacob Pylarini, deux médecins respectivement italien et grec, rapportent à la Royal Society of London des protocoles d'inoculation cutanée de la variole provenant de Turquie (Fenner *et al.*, 1988).

Une autre actrice est aussi régulièrement créditée comme ayant eu un impact déterminant dans l'importation de la variolisation, il s'agit de Lady Mary Wortley Montagu, femme de l'ambassadeur anglais de Constantinople, qui introduit cette méthode au sein de la Cour britannique. La variolisation est par la suite reconnue comme pratique médicale dans les années 1720 en Angleterre (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; Fenner *et al.*, 1988).

L'introduction de la variolisation en Amérique du Nord est due au Révérend Cotton Mather, qui apprend l'existence de cette pratique auprès de ses esclaves (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; Fenner *et al.*, 1988). En effet, en 1721, Boston subit une épidémie de variole, que les scientifiques cherchent à maîtriser. Mather convainc un autre médecin, le Dr Zabdiel Boylston, d'utiliser la variolisation dans ce but. Les résultats obtenus sont satisfaisants et participent à l'expansion de cette méthode dans tous les Etats-Unis : 6 décès sont constatés sur 244 personnes ayant reçu le traitement (soit un taux de mortalité de 2.5%) contre 844 décès sur 5980 non traités (soit un taux de mortalité de 14.1%) (Fenner *et al.*, 1988).

2.1.2. Découverte de la vaccination

La seconde moitié du XVIIIe siècle est le théâtre d'une épidémie de variole qui sévit dans toute l'Europe (Fenner *et al.*, 1988). La variolisation est alors grandement utilisée pour prévenir les infections, mais elle laisse entrevoir de nombreux défauts, dont le plus important est la mort de certains patients inoculés avec le virus de la variole. Une autre solution plus sûre doit être envisagée.

Deux hommes, Benjamin Jesty, un fermier du Dorset et Edward Jenner, un médecin du Gloucestershire, constatent tous les deux que les éleveurs et producteurs de lait ayant contracté la vaccine (due à un Poxvirus similaire à celui responsable de la variole) ne développaient pas la variole (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; Fenner *et al.*, 1988; S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

En 1774, Jesty souhaite vérifier ce constat et il décide donc d'exposer sa femme et ses fils au contenu d'une pustule de vache infectée par la vaccine, afin de les immuniser contre la variole (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

Jenner, de son côté, réalise des essais cliniques et tente le 14 mai 1796, les premiers essais de vaccination : il inocule le contenu d'une pustule prélevé sur la main d'un éleveur ayant contracté la variole bovine à un premier patient, James Phipps. Six semaines plus tard, Jenner tente d'injecter le virus de la variole à Phipps. Ce dernier ne développe pas la maladie, la vaccination était née (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; Fenner *et al.*, 1988; S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

Par la suite, les travaux de Jenner sont traduits dans de nombreuses langues et se répandent d'abord en Europe, puis dans le monde entier (Fenner *et al.*, 1988).

2.1.3. Evolution de la vaccination

Au cours du XIXe siècle, la science fait de nombreux progrès dans le domaine de la microbiologie, rendus possibles grâce à la commercialisation du microscope en 1840. En effet, on découvrira à cette période une cinquantaine d'agents pathogènes à l'origine de maladies mortelles humaines telles que le charbon, le choléra, la tuberculose, etc... (S. A. Plotkin & Plotkin, 2011)

De nombreuses théories voient le jour et l'hypothèse que les maladies infectieuses ne sont pas transmises par les miasmes, mais par des agents pathogènes émerge. La vaccination empirique de Jenner trouve alors des explications scientifiques et continue de progresser.

Vers la seconde moitié du XIXe siècle, trois chercheurs vont permettre, grâce à leurs recherches de faire évoluer la vaccination : Louis Pasteur, Ferdinand Cohn et Robert Koch.

Louis Pasteur était un chimiste français cherchant à développer dans un premier temps des vaccins atténués vétérinaires. Ses travaux ont permis le développement de vaccins contre le choléra aviaire en 1879, contre l'anthrax en 1881 et contre le rouget du porc en 1883, bien que ce dernier se révéla peu efficace (Cliff & Smallman-Raynor, 2013). Mais c'est surtout pour ses travaux sur le vaccin contre la rage qu'il est reconnu. En 1885, Pasteur travaille sur l'atténuation du virus rabique isolé de la moelle épinière d'un lapin, afin d'en faire un vaccin sûr d'utilisation. C'est la première fois qu'un laboratoire décrit des méthodes d'atténuation d'un virus pour la production d'un vaccin (S. Plotkin, 2014). Il décide de tester son vaccin, en juillet 1885, d'abord sur les chiens, puis sur un jeune garçon de 9 ans, ayant été mordu par un chien enragé, avec succès (Cliff & Smallman-Raynor, 2013). Pasteur venait alors d'inventer le principe d'atténuation d'un vaccin. Cependant, son hypothèse permettant d'expliquer le phénomène était erronée : il pensait que l'atténuation était due à la dégradation d'un élément nécessaire à la croissance de l'agent pathogène (Karch & Burkhard, 2016).

Pendant la même période, et grâce à la théorie de l'atténuation de Pasteur, de nombreux vaccins sont produits et permettent d'améliorer la technique initiale. L'inactivation de la bactérie responsable du choléra par la chaleur en est un exemple, issue des travaux de Wilhelm Kolle, assistant de Robert Koch. Un vaccin avec virus inactivé est également produit par un bactériologiste britannique, Almroth M. Wright, contre la fièvre typhoïde. Ce vaccin permettra de protéger les soldats lors de la seconde guerre du Boer (1899-1902) (Cliff & Smallman-Raynor, 2013).

C'est également à la fin du XVIIIe siècle qu'un groupe de scientifiques, composé d'Emil Von Behring, Shibasaburo Kitasato, Emile Roux, Paul Ehrlich et Almroth Wright, découvre la notion d'anticorps sériques. C'est notamment à Ehrlich qu'on doit la notion de complémentarité antigène-anticorps (S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

Le XVIIIe siècle, siècle de la microbiologie, aura permis l'apparition de nombreux vaccins inactivés et à anatoxines. Le XXe siècle sera celui de la virologie. L'apparition du microscope électronique dans les années 1930, couplée à l'apparition des méthodes de culture cellulaires au milieu du XXe siècle, permettra une avancée considérable dans l'amélioration de la vaccination. Le XXe siècle est considéré comme l'âge d'or de la vaccination : en effet, chaque année plusieurs nouveaux vaccins et de versions améliorées de vaccins existants sont commercialisés (Cliff & Smallman-Raynor, 2013; S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

En 1950 apparaît le vaccin vivant atténué contre la poliomyélite, et en 1960 trois vaccins atténués ciblant des maladies infantiles (rougeole, rubéole et oreillons) (Cliff & Smallman-Raynor, 2013). Les années 1980 voient l'apparition de nouvelles technologies dont la conjugaison avec des polysaccharides de la capsule de bactérie, améliorant l'immunogénicité et le génie génétique. Les vaccins conjugués aux polysaccharides capsulaires permettent de lutter contre la méningite à *Meningococcus* et contre les pneumocoques (S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

Le génie génétique, quant à lui, ouvre la porte à l'utilisation d'agents pathogènes modifiés tels que des bactéries, des levures, des cellules d'insectes et des cellules animales modifiées, afin de produire des antigènes permettant de produire de nouveaux types de vaccins (S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

Toutes ces technologies développées au cours des siècles ont permis l'amélioration de l'espérance de vie et ont limité la transmission d'épidémies et d'épizooties dans le monde entier.

2.2. Familles de vaccins

Le classement des vaccins en plusieurs familles repose sur le développement des techniques historiques de production de vaccins. On peut classer les vaccins selon leur date d'apparition :

- ❖ Les vaccins de première génération sont les premiers apparus historiquement et sont constitués des vaccins inactivés et vivants atténués, utilisant l'agent pathogène entier atténué ou l'agent pathogène inactivé par des procédés thermiques ou chimiques (notamment en utilisant le formaldéhyde) (Aida *et al.*, 2021; College of Physicians of Philadelphia, 2022).
- ❖ Les vaccins de seconde génération sont apparus par la suite et représentent les vaccins à sous-unité, les vaccins à antigènes recombinants ou conjugués et les vaccins à peptides synthétiques (Aida *et al.*, 2021).
- ❖ Les vaccins de troisième génération sont les vaccins les plus récents, qui ont profité des progrès réalisés en génétique et en biologie moléculaire pour se développer. Ils sont représentés par les vaccins à acides nucléiques, à vecteur recombinants et chimériques (Aida *et al.*, 2021).

Il existe par ailleurs, des vaccins permettant de différencier les individus infectés des individus vaccinés : ce sont les vaccins DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), également appelés vaccins marqueurs (Aida *et al.*, 2021; Francis, 2018).

2.2.1. Vaccins de première génération :

2.2.1.1. Vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués de première génération sont composés d'agents infectieux (virus, bactéries ou protozoaires) qui ont conservé la capacité à se répliquer dans les cellules du patient mais dont la virulence et la pathogénicité ont été diminués selon différentes méthodes (Ada, 2005; College of Physicians of Philadelphia, 2022; Francis, 2018) :

- ❖ La **première méthode** est la méthode mise au point par Jenner durant ses travaux sur la variole. Cette méthode est nommée « vaccination hétérologue » et consiste à inoculer un agent pathogène spécifique d'un mammifère à un autre mammifère d'espèce différente, pour lequel l'agent n'est que peu ou pas pathogène. La vaccination contre la variole chez l'Homme développée précédemment est un exemple de vaccination hétérologue (Yamazaki-Nakashimada *et al.*, 2020).

- ❖ La **deuxième méthode** consiste à infecter en série des cellules en culture ou d'embryons d'animaux différents de l'espèce à vacciner avec le micro-organisme responsable d'une infection (pour les virus) ou à inoculer en série des milieux gélosés (pour les bactéries). Au fur et à mesure des différents passages, le micro-organisme perd la capacité de se répliquer dans les cellules de l'espèce à vacciner et perd donc en virulence, tout en conservant son immunogénicité (Ada, 2005; College of Physicians of Philadelphia, 2022). Cet effet est la conséquence de deux facteurs : l'existence de mutations spontanées du micro-organisme et la faible pression de sélection dans le milieu de culture. Ces deux facteurs combinés permettent à ces mutations rares, diminuant la pathogénicité et la virulence, d'être conservées (Hanley, 2011). Un exemple est l'injection chez l'Homme d'une souche bovine atténuée de *Mycobacterium* (*Mycobacterium bovis*) afin d'induire une immunité contre la souche *Mycobacterium tuberculosis*. La bactérie est atténuée par passage successifs sur un milieu gélosé à base d'extraits de pomme de terre et de bile. Cette méthode a été développée par deux français : un bactériologiste nommé Albert Calmette et un vétérinaire nommé Camille Guérin et la souche atténuée de la bactérie utilisée pour produire le vaccin contre la tuberculose a été dénommée BCG pour « Bacille de Calmette et Guérin » (Yamazaki-Nakashimada *et al.*, 2020).

- ❖ La **troisième méthode** consiste à utiliser une souche naturellement atténuée d'un virus : en effet, certains virus présentent une forme naturellement atténuée, qui permet d'induire une immunisation contre les formes plus virulentes du même virus. Un exemple est le vaccin vivant atténué contre le virus de maladie de Newcastle (NDV) chez les poules. En effet, le NDV peut être différencié en 3 sous-types, déterminés par leur niveau de virulence : les souches vélogènes (très virulentes, neurotropes), les souches mésogènes (modérément virulentes) et les souches lentogènes (non virulentes). Les souches lentogènes sont particulièrement intéressantes dans la production d'un vaccin vivant atténué et un vaccin a même été développé à partir d'une souche lentogène, la souche LaSota du NDV (Shahar *et al.*, 2018).

- ❖ La **quatrième méthode** consiste à sélectionner des souches de virus ne pouvant pas se multiplier à des températures supérieures à 37°C. Ce procédé permet d'induire une immunité, tout en minimisant la virulence du pathogène car le virus est, en principe, incapable de se répliquer à la température corporelle du patient (Ada, 2005). Un exemple est le vaccin vivant atténué contre le virus Influenza intranasal chez l'Homme. La souche sélectionnée pour la production de ce vaccin est une souche de virus Influenza adaptée à une croissance à basse température. En effet, la souche ne peut uniquement se répliquer à des températures inférieures à 25°C et sa croissance est complètement arrêtée à des températures supérieures à 37,8°C (Esposito *et al.*, 2012).

De nos jours, et en regard des progrès effectués en biologie moléculaire, le séquençage du matériel génomique des virus et bactéries permet d'identifier les gènes à l'origine de la virulence et de les désactiver, qui offre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de cette technologie vaccinale. Ce processus est nommé « mutation dirigée » (Ada, 2005).

Les vaccins vivants atténués sont des vaccins communément répandus et permettent d'induire à la fois une immunité humorale et cellulaire forte et durable (Ada, 2005). L'induction d'une puissante immunisation est permise par la capacité de l'agent vaccinal à se répliquer dans les cellules-hôtes, mimant ainsi une infection (Francis, 2018).

Les vaccins vivants atténués permettent de simuler une infection par un agent pathogène et donc la réponse immunitaire mise en place chez les patients ayant survécu à l'infection (Pulendran & Ahmed, 2011). Ces vaccins permettent la mise en place d'une mémoire immunitaire capable de persister plusieurs décennies chez l'Homme, par le biais de la reconnaissance de leurs nombreux PRR (molécules de surface, acides nucléiques viraux, etc...) (Moser & Leo, 2010; Siegrist, 2013). La reconnaissance de ces PRR permet d'activer de nombreux sous-types de cellules dendritiques, qui vont produire des cytokines permettant d'orienter le type de réponse effectrice (Pulendran & Ahmed, 2011). Ces vaccins induisent généralement une forte activité des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (par le biais d'antigènes endogènes présentés par le CMH-I), ainsi qu'une activation des lymphocytes B par des lymphocytes T CD4+ (par le biais d'antigènes exogènes portés par le CMH-II). Ils induisent ainsi la production d'IgG neutralisants protecteurs. Le dernier mécanisme induit par certains vaccins vivants atténués est une sécrétion d'IgA, à l'origine d'une immunité muqueuse (Siegrist, 2013).

2.2.1.2. Vaccins inactivés

Le processus contribuant à la production d'un vaccin inactivé consiste à cultiver des virus ou des bactéries respectivement dans un milieu de culture ou dans un bioréacteur. Quand la population bactérienne ou virale atteint une taille suffisante, on les inactive par différents procédés physico-chimiques (*Tableau II*). L'étape d'inactivation permet de dénaturer les protéines et les acides nucléiques, qui formeront les antigènes du vaccin inactivé (Jorge & Dellagostin, 2017).

Tableau II : Procédés d'inactivation du virus Influenza dans la conception d'un vaccin inactivé selon Sabbaghi et al., 2019

Méthode	Mécanismes	Avantages	Inconvénients	Effets sur l'immunité
Formaldéhyde : <ul style="list-style-type: none"> Agent alkylant Agent de réticulation 	<ul style="list-style-type: none"> Ajout de groupements mono-méthylol sur macromolécules Dégradation génome viral Réticulation des AN Réticulation des protéines Liaison protéines virales au génome Suppression répllication génome 	<ul style="list-style-type: none"> Réactifs disponibles sur le marché Facile à utiliser Peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> Toxique Augmentation de la rigidité des virions Liaison des protéines virales au génome Carbonylation des protéines virales Méthode chronophage 	<ul style="list-style-type: none"> Altération des épitopes antigéniques viraux Induction d'une diminution des niveaux de présentation croisée Activation d'une réponse Th2 indésirable Production d'IFN-I dépendante du TLR7/MyD88
β-propiolactone : <ul style="list-style-type: none"> Agent alkylant Agent alcyant Agent de réticulation 	<ul style="list-style-type: none"> Alkylation irréversible des bases azotées des AN Suppression de la répllication du génome Dégradation du génome viral Réticulation des protéines Réticulation des AN Liaison des protéines virales au génome 	<ul style="list-style-type: none"> Préservation de la structure antigénique 	<ul style="list-style-type: none"> Toxique Bis-alkylation des HA et NA à forte dose Méthode chronophage 	<ul style="list-style-type: none"> Réduction de la capacité de pénétration du virus dans le cytosol de la cellule-hôte à forte dose
Ultraviolets : <ul style="list-style-type: none"> Radiation 	<ul style="list-style-type: none"> Formation de photodimères dans les acides nucléiques Dégradation du génome viral Liaison des protéines virales au génome 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite des appareils simples à manipuler Source de radiation disponible 	<ul style="list-style-type: none"> Faible pouvoir de pénétration des rayons Modification de la structure de la capsid virale après une exposition prolongée Carbonylation des protéines virales 	<ul style="list-style-type: none"> Induction d'une immunité spécifique à la souche virale Activation d'une réponse Th2 indésirable
Rayonnement γ : <ul style="list-style-type: none"> Radiation 	<p>Effets directs de la congélation ou de la dessiccation :</p> <ol style="list-style-type: none"> Désintégration des liaisons covalentes (notamment sur AN) Destructions du génome viral : <ol style="list-style-type: none"> Cassure des brins d'AN Cassure des liaisons Dégradation des nucléotides <p>Effets indirects du milieu aqueux :</p> <ol style="list-style-type: none"> Dommmages oxydatifs infligés ax biomolécules (protéines notamment) 	<ul style="list-style-type: none"> Applicable sur des molécules à l'état congelé (limite modifications structurales des protéines virales) Maintien de la capacité de présentation croisée des molécules lyophilisées Réversion au phénotype virulent peu probable Ne nécessite pas de formation poussée du personnel 	<ul style="list-style-type: none"> Carbonylation des protéines virales dans milieu aqueux Possibilité de dégradation des protéines virales Génération d'une radiation secondaire lors de l'inactivation Nécessité de port d'EPI Radiation à faible dose : <ul style="list-style-type: none"> Augmente durée d'exposition aux rayons Risque dénaturation protéines ++ 	<ul style="list-style-type: none"> Préservation importante des épitopes antigéniques viraux Induction d'une meilleure immunité humorale et d'une meilleure présentation croisée Prise en charge efficace du virus par les CPA Evasion efficace des endosomes par le virus Reconnaissance des PAMP viraux par les PRR (TLR7, RIG1) Production d'IFN-I TLR7/MyD88 indépendante Amélioration de la présentation croisée et de la réponse Th1
Laser USP : <ul style="list-style-type: none"> Radiation 	<ul style="list-style-type: none"> Aggrégation sélective des protéines de la capsid virale et des protéines tégmentaires 	<ul style="list-style-type: none"> Formation d'une faible quantité de groupements carbonyles sur les protéines Absence de réponse Th2 indésirable Absence de dégradation de la structure antigénique Absence de réticulation Préservation des PAMP viraux Absence de toxicité 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité d'effectuer des recherches complémentaires sur cette méthode 	<ul style="list-style-type: none"> Préservation de la plupart des épitopes antigéniques viraux Induction d'une forte réponse humorale et CTL
LEEI : <ul style="list-style-type: none"> Radiation 	<ul style="list-style-type: none"> Dégradation du génome viral 	<ul style="list-style-type: none"> Préservation antigènes viraux Ne nécessite pas de radioprotection (baisse radiation II) Peu coûteux Radiation forte dose : <ul style="list-style-type: none"> Baisse temps d'exposition Peu de chaleur produite 	<ul style="list-style-type: none"> Faible pouvoir de pénétration des rayons 	<ul style="list-style-type: none"> Préservation de la structure antigénique virale Induction de réponses immunitaires efficaces

L'inactivation des vaccins repose sur plusieurs méthodes physico-chimiques :

- ❖ Les méthodes chimiques font intervenir deux principaux agents : le formaldéhyde et le β-propiolactone :

- Le **formaldéhyde** (*Tableau II*) est principalement utilisé sous forme de solution aqueuse saturée nommée « formaline ». Le formol agit selon deux mécanismes : c'est un agent alkylant permettant de former des liaisons entre les protéines et les acides nucléiques (agent de réticulation). Ces deux mécanismes contribuent à rigidifier les protéines de l'agent pathogène en les liant entre elles, à limiter la réplication virale en liant les protéines aux acides nucléiques de manière covalente, ainsi qu'en créant des liaisons au sein des chaînes d'ADN et d'ARN, et enfin à induire des dénaturations des bases azotées des acides nucléiques, contribuant à dégrader le génome de l'agent pathogène (Sabbaghi *et al.*, 2019). Cette méthode est utilisée dans la plupart des vaccins inactivés comme le vaccin contre la Leptospirose chez le chien développée à partir de différents sérogroupes (*L.Icterohaemorrhagiae*, *L.Grippotyphosa*, *L.Canicola*, *L.Australis*) (Adler, 2015). Cette méthode comporte néanmoins de nombreux inconvénients comme la toxicité du formaldéhyde ou l'altération des protéines, qui peut conduire à une altération des épitopes portés par les antigènes de l'agent pathogène et ainsi contribuer à une diminution de l'immunogénicité. Cette altération des protéines est due à la formation de radicaux libres consécutifs à un stress oxydatif, à l'origine de la création de groupements carbonyles sur les protéines, qui sont reconnus par le système immunitaire, contribuant à l'induction d'une réponse Th2 indésirée (Sabbaghi *et al.*, 2019).
 - Le **β -propiolactone** (*Tableau II*) est également utilisé fréquemment dans la production de vaccins inactivés. Le β -propiolactone (BPL) est un agent alkylant, réticulant et acylant. Les mécanismes d'inactivation sont similaires à ceux du formaldéhyde, mais différent par l'action ciblée principalement sur les acides nucléiques, contrairement au formaldéhyde, qui cible les protéines (Sabbaghi *et al.*, 2019). Un vaccin bivalent inactivé avec le BPL contre les sérotypes 4 et 16 du Blue Tongue Virus (BTV-4 et BTV-16) affectant les ovins a été développé en s'inspirant des vaccins déjà commercialisés contre le BTV-8 (Zhugunissov *et al.*, 2018). Les inconvénients sont similaires au formaldéhyde (toxicité), mais semble moins altérer la structure des épitopes (Sabbaghi *et al.*, 2019).
- ❖ Les méthodes physiques reposent sur l'utilisation d'UV, de rayonnements gamma, de lasers USP et de rayonnements LEEI :
- Les **rayonnements ultraviolets** (*Tableau II*) : Ce sont les UV-C qui sont majoritairement utilisés pour leurs propriétés inactivatrices. Ces UV entraînent la formation de dimères de thymines, perturbant grandement la transcription et la réplication de l'ADN de l'agent pathogène, ainsi que la formation de lésions dans la séquence nucléotidique, favorisant la dégradation du génome (Sabbaghi *et al.*, 2019). Un vaccin expérimental contre la grippe porcine (virus Influenza, souche A/SW/MN/02011/08 H1N2) a été développé, permettant d'induire des réponses humorales et cellulaires efficaces, mais incapable d'induire une protection croisée contre la souche hétérologue H1N1 CA/09 car la réponse cellulaire était insuffisante (Platt *et al.*, 2011). Les expositions longue durée aux UV sont à l'origine de stress oxydatif entraînant la formation de groupements carbonyles sur les protéines de l'agent pathogène et contribuant à la mise en place d'une réponse Th2 indésirable. Les UV sont en revanche capables d'induire une modification de la structure des protéines et des acides nucléiques de l'agent pathogène (Sabbaghi *et al.*, 2019).

- Les **rayonnements gamma** (*Tableau II*) : c'est une méthode d'inactivation communément utilisée reposant sur la capacité des rayons γ à déplacer les électrons d'une orbitale atomique à une autre, cassant les liaisons covalentes. Le génome des agents pathogènes constitue la structure la plus atteinte par les rayons γ en raison de leur grand poids moléculaire. En milieu gelé, les rayons γ entraînent une destruction des liaisons covalentes (action directe). En milieu aqueux, les rayons γ entraînent des effets indirects, caractérisés par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui vont entraîner un stress oxydatif à l'origine d'une carbonylation des protéines et d'une altération des épitopes (Sabbaghi *et al.*, 2019). Un vaccin expérimental contre la peste porcine africaine (PPA) est en développement et repose sur l'irradiation de la souche « Estonia 2014 » du virus avec des rayons γ , associé à des adjuvants sous forme d'émulsion lipidique. Malheureusement, le vaccin ne permet pas d'induire la mise en place d'une immunité protectrice contre l'infection, mais il permet de réduire le portage et l'excrétion du virus (Pikalo *et al.*, 2022). Cette méthode n'est pas toxique et permet une meilleure conservation des épitopes portés par les antigènes, permettant notamment la mise en place d'une réponse CTL efficace, mais présente tout de même l'inconvénient d'être dangereux pour la santé du manipulateur, qui doit porter des équipements de protection individuels, en raison de son fort pouvoir de pénétration (Sabbaghi *et al.*, 2019).
- Le **laser USP** ou « Ultrashort Pulse laser » (*Tableau II*) est un procédé s'appuyant sur un phénomène physique nommé « diffusion Raman », qui entraîne la dissociation de la capsid d'un virus. Cette méthode possède l'avantage de ne pas entraîner de stress oxydatif et donc de ne pas entraîner l'apparition de réponse Th2 indésirée. Un autre avantage est l'utilisation de rayonnement de longueur d'onde appartenant au domaine du visible, n'entraînant pas d'altération des macromolécules et donc des épitopes antigéniques. Enfin, cette technique n'est pas toxique et ne repose pas sur l'irradiation par des rayonnements ionisants, pouvant être cancérogènes. Des études chez les souris ont comparé les vaccins contre la souche H1N1 d'Influenza virus inactivés par le formol et inactivés par le laser USP et ont montré qu'une meilleure immunité protectrice était induite avec 10 fois moins de vaccin inactivé par laser USP mais également l'induction d'une bien meilleure réponse CTL (10 fois supérieure) avec ce vaccin (Sabbaghi *et al.*, 2019).
- L'irradiation avec des électrons de faible énergie (**LEEI** ou Low-energy electron irradiation) (*Tableau II*) : cette méthode repose sur l'utilisation de rayonnements avec des électrons à faible énergie (< 500 keV), permettant de limiter les rayonnements secondaires dangereux pour la santé du manipulateur. Le rayonnement est à forte dose, ce qui permet de limiter le temps d'exposition et la chaleur produite, ce qui contribue à diminuer les dénaturations de protéines de l'agent pathogène (et ainsi conserver les épitopes antigéniques). Le LEEI permet d'inactiver l'agent pathogène en dénaturant son génome (Sabbaghi *et al.*, 2019).

Ces vaccins permettent d'induire majoritairement une réponse immunitaire humorale en activant les lymphocytes B T-dépendants, avec une production d'IgG neutralisants (Ada, 2005). Cependant, contrairement aux vaccins vivants atténués, pour lesquels l'agent infectieux est capable de se répliquer et de mimer ainsi une infection, l'absence de réplication de l'agent infectieux dans les vaccins inactivés induit une charge en agent infectieux moins importante chez l'individu vacciné, induisant une réponse immunitaire de moindre importance. Ces vaccins doivent donc être administrés avec un volume plus important que les vaccins vivants atténués ou couplés à des adjuvants, afin d'obtenir une réponse immunitaire comparable. Les adjuvants jouent un rôle majeur dans l'amélioration de ces vaccins, car ils agissent comme des PAMP, reconnus par les PRR des différents sous-types de cellules dendritiques. Le choix de l'adjuvant est donc fondamental dans l'orientation de la réponse adaptative par les cellules de l'immunité innée car il permet l'activation des différents sous-types de cellules dendritiques, permettant alors de favoriser une réponse effectrice par rapport aux autres (Siegrist, 2013).

Historiquement, les débris cellulaires étaient injectés en même temps que les acides nucléiques et les protéines dénaturés, ce qui pouvait être à l'origine d'effets secondaires pour le patient. La technologie a été progressivement remplacée dans certains pays par les vaccins à sous-unités (Ada, 2005).

2.2.2. Vaccins de seconde génération

2.2.2.1. Vaccins à sous-unités

- ❖ Les vaccins à sous-unités sont des vaccins dérivant de la technologie des vaccins inactivés. Le principe de ce vaccin consiste à « désassembler » l'agent pathogène pour n'en conserver que des protéines ou des sous-unités pouvant être utilisées comme antigènes. Un exemple permettant d'illustrer cette méthode est l'utilisation du virus *Influenza* : Ce virus est constitué d'une enveloppe externe composée de protéines de surfaces, les hémagglutinines (HA) et les neuraminidases (NA) et d'une couche interne composée des protéines de matrice (M), protégeant l'ARNm viral (Figure 14) (Bouvier & Palese, 2008; Francis, 2018).

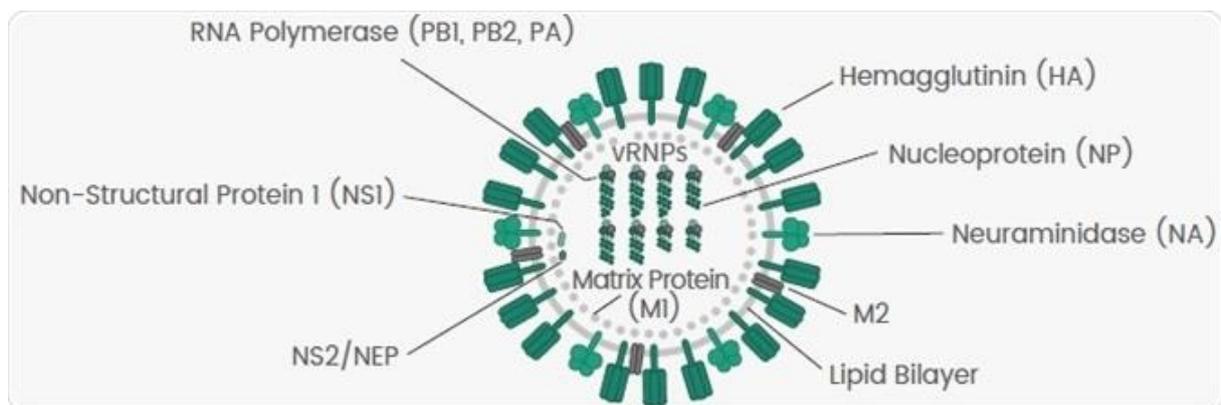


Figure 14 : Structure du virus *Influenza* selon SinoBiological Inc, 2022

Les premiers vaccins développés à partir de ce virus étaient les vaccins inactivés. Ils permettaient de lyser l'enveloppe virale et d'extérioriser le matériel génétique. Cependant, des effets secondaires étaient observés chez les patients car les antigènes étaient mélangés aux débris cellulaires. Des méthodes d'amélioration sont apparues par la suite, permettant de purifier l'enveloppe externe composée d'HA et de NA et de l'injecter directement au patient, purifiée de toute impureté, limitant ainsi le risque de développement d'effets indésirables. Ce vaccin à sous-unité améliorât l'innocuité du vaccin, mais sacrifiait le pouvoir immunogène. L'utilisation d'adjuvants permit d'améliorer ce défaut associé à cette technologie. Le premier vaccin vétérinaire viral testé et commercialisé avec ces améliorations est le vaccin contre la grippe équine, puis un vaccin contre la leucose féline a été développé par la suite (Francis, 2018).

- ❖ Des vaccins à sous-unités bactériennes ont également été développés. Ils sont en majorité composés de sous-unités des pili bactériens ou de toxines inactivées (vaccins à anatoxines). Les anatoxines vaccinales vont entraîner la production d'anticorps neutralisant l'effet pathogène de la toxine, sans empêcher l'infection bactérienne alors que les anticorps anti-pilus vont limiter la prolifération des bactéries en les empêchant de reconnaître leur cellule-hôte par le biais des pili. C'est notamment le cas des vaccins contre le tétanos d'une part (vaccin à anatoxine tétanique) et contre les diarrhées néonatales des porcs et des veaux d'autre part, qui sont composés des antigènes fimbriaires F4, F5, F6, F7 et F18 des *Escherichia coli* entéro-toxinogènes (ETEC) (Francis, 2018).
- ❖ Les vaccins polysaccharidiques sont une catégorie de vaccin à sous-unités, composés d'antigènes constitués d'une longue chaîne glucidique présente à la surface de la capsule des bactéries. Ces antigènes sont T-indépendants, incapables d'activer les lymphocytes T-helper et donc incapables d'induire la mise en place d'une mémoire immunitaire et d'une maturation de la réponse immunitaire humorale qui permet l'amélioration de l'avidité des anticorps, acquise par hypermutation somatique des gènes codant pour les anticorps dans les lymphocytes B. La solution trouvée pour contourner ce problème est de conjuguer la chaîne polysaccharidique à une protéine dite « carrier » (souvent une anatoxine), par le biais d'une liaison covalente, afin de rendre l'antigène T-dépendant et d'améliorer la réponse immunitaire. Ces vaccins portent le nom de vaccins conjugués (Jorge & Dellagostin, 2017).

Cette technologie a rapidement évolué avec les progrès effectués en génétique et l'utilisation d'organismes modifiés génétiquement afin de produire la sous-unité en grande quantité. C'est ainsi que son apparus de nombreux vaccins à sous-unités chez le chien et le porc notamment (*Tableau III*) (College of Physicians of Philadelphia, 2022; Francis, 2018).

Tableau III : Liste non exhaustive des vaccins à sous-unités naturelles et recombinantes à usage vétérinaire selon Aida et al., 2021

TABLE 1 | Subunit and recombinant protein vaccines.

Species	Vaccine	Manufacturer	Pathogen	Technology
Canine	CaniLeish® (LIESP/QA-21)	Virbac	Leishmania	Subunit (Cell-free, serum-free culture system)
	Leish-Tech®	CEVA Animal Health	Leishmania	Recombinant Protein
	Lentifend®	Laboratorios Leti	Leishmania	Chimeric protein
	Vanguard® crLyme	Zoetis	Borrelia burgdorferi	Chimeric Protein
Swine	Porcilis®APP	Merck Animal Health	A.pleuropneumoniae	Subunit
	Pleurostar APP	Novartis	A.pleuropneumoniae	Subunit
	Ingelvac CircoFLEX®	Boehringer Ingelheim	Porcine Circovirus Type 2	Subunit (BEVS)
	Circumvent® PCV-M G2	Merck Animal Health	Porcine Circovirus Type 2	Subunit (BEVS)
	Procilis® PCV	Merck Animal Health	Porcine Circovirus Type 2	Subunit (BEVS)
	CircoGard	Pharmgate Animal Health	Porcine Circovirus Type 2	Subunit (BEVS)
	Porcilis Pesti®	Merck	Classical Swine Fever	Subunit (BEVS)
	Bayovac CSF E2®	Bayer	Classical Swine Fever	Subunit (BEVS)

2.2.2.2. Vaccins à sous-unités recombinantes

Ces vaccins sont l'évolution des vaccins à sous-unités naturelles. Ils utilisent des micro-organismes modifiés afin de produire en grande quantité des protéines recombinantes (antigènes de surface, protéines sécrétées et toxines le plus souvent) qui serviront d'antigènes pour le vaccin. De nombreux vecteurs sont utilisés dans ce but :

- ❖ **Vecteur bactérien** : C'est le vecteur qui a été historiquement utilisé afin de produire des vaccins à sous-unités recombinantes. En effet, de nombreux travaux étudiant la biologie moléculaire ont utilisé *E. coli* comme modèle expérimental. Son utilisation par la suite comme vecteur d'expression se fit naturellement. *E. coli* présente l'avantage de se répliquer rapidement et de produire une quantité importante de protéines (Francis, 2018). Certaines études tempèrent cette capacité à produire des protéines en grande quantité et évoquent un rendement insuffisant (Jorge & Dellagostin, 2017). En revanche, certains points négatifs viennent limiter son utilisation : les bactéries étant procaryotes, elles utilisent des mécanismes d'adressage et de maturation (sites de glycosylation, ponts disulfure) des protéines différentes des cellules eucaryotes. La conséquence de ces modifications est la dégradation de ces protéines par le système immunitaire de l'individu vacciné, ce qui contribue à augmenter les risques d'effet indésirables et diminue la stabilité des protéines. De plus, les protéines recombinantes d'origine procaryote possèdent une conformation différente des protéines d'origine eucaryote et le défaut de glycosylation peut contribuer à diminuer l'efficacité du vaccin (Francis, 2018; Jorge & Dellagostin, 2017). Le premier vaccin à sous-unités recombinantes produites par *E. coli* commercialisé est le vaccin contre la leucose féline, composé de la protéine p45. Cette protéine correspond à la protéine gp70 du virus, dépourvue de partie glycosylée (Francis, 2018).

- ❖ **Levures** : L'utilisation de levures en tant que vecteur s'est répandu et, à l'instar des vecteurs bactériens, le choix s'est fait naturellement. *Saccharomyces cerevisiae* a notamment été utilisée dans un premier temps mais le choix se porte désormais sur *Pichia pastoris* car c'est un vecteur peu onéreux et avec un meilleur rendement (Francis, 2018; Jorge & Dellagostin, 2017). Les levures corrigent une grande partie des défauts des vecteurs bactériens : en effet, ce sont des organismes eucaryotes, ayant des mécanismes d'adressage et de maturation des protéines similaires aux cellules eucaryotes (Francis, 2018). De nombreux vaccins à sous-unités recombinantes produites par des levures ont été commercialisés chez l'Homme, comme le vaccin contre le virus de l'hépatite C, utilisant *Pichia pastoris* pour produire les protéines virales E1 et E2, ou le vaccin contre le Papillomavirus, utilisant *Saccharomyces cerevisiae* pour produire la protéine L1 du Papillomavirus de type 16 (Kumar & Kumar, 2019).
- ❖ **Cellules d'insectes** : L'utilisation de cellules d'insectes modifiées est assez récente. Le principe consiste à infecter des cellules ovariennes d'un insecte nommé *Spodoptera frugiperda* (un lépidoptère aussi appelé « Légionnaire d'automne », *Figure 15*), avec un Baculovirus génétiquement modifié (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* ou AcNPV, virus infectant communément les insectes arthropodes (McDougal & Guarino, 2000)). Ces virus possèdent un promoteur très puissant, qui leur permet de produire en très grande quantité une protéine polyédrique, qui constitue son enveloppe (on estime que la quantité de protéine produite peut atteindre jusqu'à 50% du volume total de la cellule infectée). En modifiant génétiquement le gène codant la protéine polyédrique, on peut produire une quantité importante de sous-unités utiles au vaccin (on estime que le rendement maximal est de 1 g de protéine par litre, actuellement, on peut produire de 600 mg à 1 g de protéines par litre). Deux vaccins utilisant ce mode d'expression ont été commercialisés : il s'agit de vaccins contre le Circovirus porcin de type 2 (CPV-2) et contre la peste porcine classique (Francis, 2018).



Figure 15 : *Spodoptera frugiperda* ou « Légionnaire d'automne » selon Wikipédia

- ❖ **Cellules de mammifères** : Les virus et bactéries infectant les animaux de compagnies et les animaux de production infectent les cellules de mammifères, il est donc naturel d'utiliser ces vecteurs afin de produire des sous-unités. Les mécanismes d'adressage et de maturation des protéines sont identiques et ne constituent plus un obstacle. En revanche, le faible rendement de production de protéines constitue l'inconvénient majeur de ces vecteurs. Les vaccins contre la diarrhée virale bovine (BVD), la fièvre porcine classique et l'encéphalite japonaise ont été développés avec ces vecteurs (Francis, 2018).

- ❖ **Cellules végétales** : L'utilisation de cellules végétales comme vecteurs d'expression de protéines animales est assez récente et peut être intéressante selon certaines études. Une modification conséquente du génome est en revanche nécessaire pour pouvoir transcrire et traduire des protéines animales dans ces cellules : en effet il est nécessaire de modifier des promoteurs, des séquences régulatrices et terminatrices. L'avantage présenté par ces vecteurs est la possibilité d'ajouter des séquences permettant de marquer les protéines d'intérêt produites par les cellules végétales. Un vaccin contre la maladie de Newcastle a été développé avec ce type de vecteur d'expression, et des études sont actuellement réalisées pour développer un vaccin contre la bronchite infectieuse aviaire, la maladie de Gumboro, les ETEC, la BVD et l'herpès virus bovin (Francis, 2018).

Ces vaccins permettent d'activer une réponse immunitaire similaire à celle observée avec les vaccins inactivés (Siegrist, 2013).

2.2.2.3. Vaccins peptidiques

Les antigènes comportent dans leur structure des courtes séquences d'acides aminés qui sont reconnus spécifiquement par les récepteurs de l'immunité adaptative (BCR, TCR, anticorps), appelés « épitopes » (Francis, 2018; Nevagi *et al.*, 2018). Ces épitopes, vont s'associer de manière spécifique aux paratopes portés par le BCR, le TCR ou les anticorps, par le biais d'une reconnaissance de type « clé-serrure ». Le choix de ces épitopes est une étape cruciale, permettant d'orienter le type de réponse immunitaire recherché : un épitope ciblant les lymphocytes B permet d'induire une immunité humorale contre les pathogènes extracellulaires, alors qu'un épitope ciblant les lymphocytes T CD8+ permettra de cibler les pathogènes intracellulaires par le biais d'une immunité cellulaire cytotoxique. Cependant, un épitope seul ne permet pas d'induire une réponse immunitaire adaptative, il va donc devoir être couplé à une protéine porteuse (Nevagi *et al.*, 2018).

Plusieurs étapes sont nécessaires afin de produire un vaccin peptidique :

- ❖ La **première étape** consiste à identifier l'épitope d'intérêt. Pour cela, de nombreuses méthodes sont possibles, mais font toutes appel à des ressources informatiques et des algorithmes :
 - Le « computational docking » permet de créer informatiquement deux structures sous forme de polygones (cristaux) correspondant à l'antigène et à l'anticorps et de stimuler l'appariage des deux structures par le biais d'algorithmes. Les polygones sont construits avec l'aide d'une base de données (Nevagi *et al.*, 2018).
 - Les méthodes combinatoires font appel à des bases de données d'épitopes aléatoires portés par des phages. On place un anticorps monoclonal d'intérêt en contact avec les différents peptides portés par les phages. L'affinité des épitopes des différents peptides est mesurée et permet d'identifier des séquences peptidiques utilisables pour le vaccin. Cette méthode est communément utilisée pour identifier les épitopes de lymphocytes B (Nevagi *et al.*, 2018).
 - D'autres méthodes permettent d'identifier les épitopes comme la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire, la cristallographie aux rayons X, etc... (Nevagi *et al.*, 2018)

- ❖ La **seconde étape** consiste à modifier la structure de l'épitope pour qu'il induise une réponse immunitaire concordante avec les propriétés de l'agent pathogène ciblé. Les épitopes se présentent selon deux catégories :
 - L'épitope linéaire est constitué d'une petite séquence d'acides aminés dont seule la structure primaire intervient dans la formation du complexe antigène-anticorps. Les épitopes des lymphocytes T CD8+, présentés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) I sont linéaires, par exemple (Nevagi *et al.*, 2018).
 - L'épitope conformationnel est défini par sa structure primaire en acides aminés mais aussi par sa structure secondaire (hélices α et feuilletts β -plissés), assurant le maintien d'une conformation propice à la reconnaissance antigène-anticorps (Nevagi *et al.*, 2018).

Il est possible de modifier ces épitopes afin qu'ils conviennent à la préparation des vaccins, avec la méthode du « stapling », qui consiste à bloquer l'épitope en conformation hélice α , en ajoutant un composé chimique qui fera office de lien entre deux chaînes distantes d'acides aminés présentes sur la même face de l'hélice. Une autre méthode consiste à ajouter à la séquence d'acides aminés, des acides aminés supplémentaires, capables d'induire une conformation secondaire recherchée (Nevagi *et al.*, 2018).

- ❖ La **troisième étape** consiste à améliorer l'immunogénicité par le biais d'adjuvant. En effet, la réaction immunitaire induite par les peptides seuls est négligeable en comparaison de celle induite par les vaccins inactivés par exemple (les peptides induisent 1% de l'immunité induite par les vaccins inactivés) (Francis, 2018). Il est donc fondamental de les coupler à des adjuvants. La forme sous laquelle le vaccin sera délivré va également avoir une importance cruciale dans la mise en place d'une réaction immunitaire. La protection des peptides dans des matrices lipidiques permet de stabiliser le vaccin *in vivo* (Nevagi *et al.*, 2018).

Les vaccins vétérinaires peptidiques sont des vaccins utilisant de nombreuses innovations technologiques et des vaccins peptidiques contre la rage, les leucoses bovines et félines, les rotaviroses et entéroviroses bovines, la parvovirose canine, le Virus Syncytial Respiratoire (VRS) et l'Herpès-virose équine, sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux pays, incluant les Etats-Unis, mais ne sont pas disponibles en France (Francis, 2018).

2.2.2.4. Vaccins VLP

Les vaccins VLP ou « Virus-Like Particle » sont des vaccins utilisant la structure externe d'un virus, incluant ses protéines structurales possédant une séquence hautement répétée, sans incorporer de génome au sein de cette structure. La particule permet alors d'induire une réponse immunitaire, sans pouvoir se répliquer. En effet, les protéines structurales du virus permettent d'induire une forte réponse humorale mais également cytotoxique grâce au mécanisme de présentation croisée. Contrairement aux vaccins à sous-unités et les vaccins peptidiques, qui sont peu immunogènes, les vaccins VLP sont plus immunogènes, en raison de la présence de motifs protéiques répétés à leur surface ainsi que de nombreux épitopes conformationnels plus proches structurellement de ceux des virus natifs. En conséquence, des doses plus faibles du vaccin VLP sont nécessaires afin d'induire le même niveau de réponse immunitaire qu'avec les vaccins à sous-unités (F. Liu *et al.*, 2012; Mohsen *et al.*, 2017; Nooraei *et al.*, 2021).

Le tout premier vaccin VLP est le vaccin contre le virus de l'hépatite B chez l'Homme ou contre le Papillomavirus, mis au point dans les années 1980, dont les particules furent produites par des levures du genre *Saccharomyces cerevisiae*. En médecine vétérinaire, les VLP les plus utilisés dérivent de virus possédant une structure simple (Parvovirus porcin, Circovirus porcin), des virus avec enveloppe lipidique (virus de la maladie de Newcastle, virus de l'Influenza aviaire, virus de la fièvre de la vallée du Rift) et des virus avec plusieurs couches protéiques (virus de la fièvre catarrhale ovine, virus de la peste équine). C'est cette différence structurelle qui définit leur classification en VLP enveloppés et non-enveloppés (Figure 16) (F. Liu *et al.*, 2012).

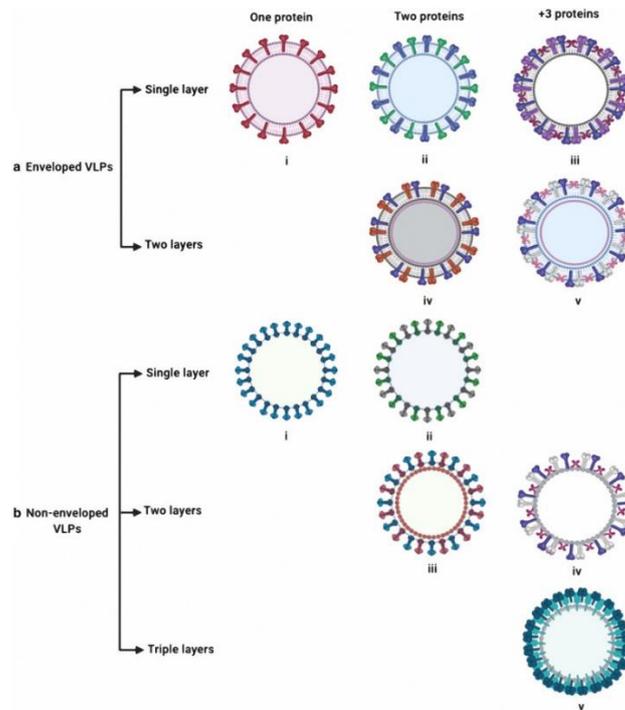


Figure 16 : Classification des vaccins VLP selon Nooraei *et al.*, 2021

La production des vaccins VLP repose sur plusieurs étapes (Figure 17) :

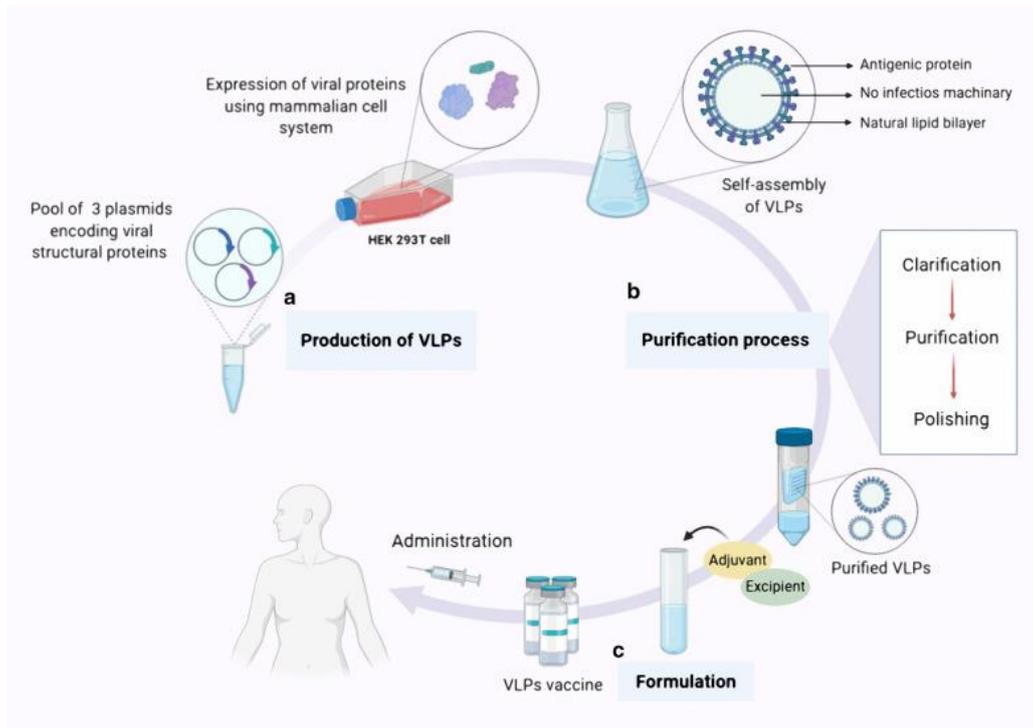


Figure 17 : Etapes de la production des vaccins VLP selon Nooraei et al., 2021

- ❖ La **production des protéines des particules VLP** peut être réalisée grâce à de nombreux vecteurs (Figure 17a) : les **bactéries**, vecteurs les plus utilisés pour produire des VLP simples, non enveloppés, et contenant une à deux couches protéiques, les **levures**, également fréquemment utilisées comme vecteur d'expression des protéines virales, le **Baculovirus** et les cellules d'insectes, vecteurs les plus utilisés dans la production des VLP enveloppés, et les **cellules de mammifères**, utilisées pour produire des VLP complexes composées de multiples couches protéiques. C'est également au cours de cette étape que les protéines virales produites vont s'auto-assembler dans le milieu de culture pour former les VLP (Nooraei et al., 2021).
- ❖ Une fois assemblés, les VLP doivent être **purifiés** afin d'éliminer les cellules nécessaires à la production, les débris cellulaires, les protéines ayant une mauvaise conformation et toutes les autres molécules pouvant agir comme contaminants et interférer avec l'efficacité du vaccin (Figure 17b). Cette purification se fait par des méthodes de chromatographie (Nooraei et al., 2021).
- ❖ La dernière étape est l'étape de **formulation** du vaccin VLP (Figure 17c). Au cours de cette étape, les VLP purifiés sont placés dans différents tampons permettant de les stabiliser et de les protéger contre les phénomènes de dégradation enzymatique. C'est également au cours de cette étape que seront ajoutés les éventuels adjuvants permettant d'améliorer l'immunogénicité du vaccin (Nooraei et al., 2021).

Un exemple de vaccin utilisant la technologie des VLP est le vaccin pour le Circovirus Porcin 2 (PCV2). Une protéine de capsid est produite dans des cellules d'insectes et forme lors de l'étape d'autoassemblage un VLP. Le vaccin permet d'obtenir des réponses immunitaires très efficaces lors de stratégie de vaccination dite « prime-boost », qui consiste à réaliser une primo-vaccination à l'aide d'un type de vaccin particulier, puis d'effectuer l'injection de rappel avec un autre type de vaccin comportant le même antigène (Entrican & Francis, 2022).

2.2.3. Vaccins de troisième génération

2.2.3.1. Vaccins à vecteurs recombinants

- ❖ Les **vaccins à vecteur viral recombinant** utilisent les virus comme une matrice enfermant un gène d'intérêt à injecter. Ils ont été modifiés génétiquement afin de transporter un gène codant un antigène d'un agent pathogène. Pour cela, un plasmide contenant le génome entier du virus à modifier, ainsi que la séquence ADN d'intérêt, permet de transfecter une lignée cellulaire eucaryote compétente. La machinerie cellulaire va permettre la production de virions enveloppant le plasmide avec la séquence d'intérêt (Aida *et al.*, 2021). Ces vaccins ont une innocuité semblable à celle des vaccins à sous-unités et permettent d'induire une immunité cellulaire (notamment en activant les lymphocytes T CD8+), ainsi qu'une immunité humorale (Aida *et al.*, 2021; Bull *et al.*, 2019).

Malgré la possibilité d'une « réversion » du virus à son stade initial (c'est-à-dire une perte du gène d'intérêt au cours de sa multiplication, diminuant ainsi son efficacité (Bull *et al.*, 2019)), de nombreuses familles de virus ont été étudiées comme étant des vecteurs candidats potentiels. Les premiers virus étudiés sont des virus de la famille des Poxviridae (notamment les Canarypox et les Fowlpox). Les Adénovirus ont par la suite été étudiés comme vecteurs pour des vaccins contre des agents infectieux, mais également comme vecteurs pour des antigènes tumoraux (Aida *et al.*, 2021).

De nombreux vaccins à vecteurs viraux sont disponibles sur le marché (*Tableau IV*), comme le vaccin contre la leucose féline chez les chats, basé sur l'utilisation d'un Canarypoxvirus encodant plusieurs gènes d'intérêt codant pour les protéines *env*, *gag* et une version tronquée de la protéine *pol* provenant de la souche A/Glasgow-1 du FeLV (Grosenbaugh *et al.*, 2017).

Tableau IV : Liste non exhaustive des vaccins à usage vétérinaire à vecteurs viraux recombinants et chimériques selon Aida et al., 2021

TABLE 3 | Recombinant viral vector vaccines.

Species	Vaccine	Manufacturer	Pathogen	Technology (viral-vector)
Canine	Recombitek® CDV	Boehringer Ingelheim	Canine Distemper Virus	Viral-Vector (canarypox)
Feline	PureVAX® Recombinant FeLV	Boehringer Ingelheim	Feline Leukemia Virus	Viral-Vector (canarypox)
	PureVAX® Feline Rabies	Boehringer Ingelheim	Rabies	Viral-Vector (canarypox)
Equine	ProteqFlu	Boehringer Ingelheim	Equine Influenza	Viral-Vector (canarypox)
	ALVAC®-WNV	Pfizer	West Nile Virus	Viral-Vector (canarypox)
Swine	Fostera™PCV	Zoetis	Porcine Circovirus Type 2	Chimeric Viral-vector (PCV-1)
	Suvaxyn® CSF Marker	Zoetis	Classical Swine Fever virus	Chimeric Viral-vector (BVDV)
	IPED+	Merck Animal Health	Porcine Endemic Diarrhea virus	RNA Replicon (VEEV)
	Sequivity®	Merck Animal Health	Swine influenza A virus	RNA Replicon (VEEV)
Bovine	Act.A24 FMD	GenVec	Foot and Mouth Disease	Viral-vector (adenovirus)
Avian	Trovac®-AIV H5	Boehringer Ingelheim	Avian Influenza	Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune® AI	CEVA Biomune	Avian Influenza	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Vectormune® ND	CEVA Biomune	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Vectormune® FP LT	CEVA Biomune	Infectious Laryngotracheitis virus	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune® FP MG	CEVA Biomune	Mycoplasma Gallisepticum	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune® FP-N	CEVA Biomune	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Innovax®-ND	Merck Animal Health	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Innovax®-ND-IBD	Merck Animal Health	Newcastle disease and Infectious bursal disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Innovax®-ND-ILT	Merck Animal Health	Newcastle disease and infectious laryngotracheitis	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
Wildlife	ORNAB®	Artemis Technologies, Inc.,	Rabies	Viral-vector (human adenovirus type 5)
	Raboral V-RG®	Boehringer Ingelheim	Rabies	Viral-vector (vaccinia virus)
Rabbits	Novibac® Myxo-RHD	Merck Animal Health	Rabbit Hemorrhagic Disease	Chimeric Viral-vector (myxoma virus)
	Novibac® Myxo-RHD Plus	Merck Animal Health	Rabbit Hemorrhagic Disease	Chimeric Viral-vector (myxoma virus)

- ❖ Les **vaccins à vecteur bactériens recombinants** sont des vaccins utilisant des bactéries modifiées génétiquement afin de perdre leur virulence et de produire de manière intensive des antigènes vaccinaux (Unnikrishnan *et al.*, 2012). Un exemple de vecteur recombinant bactérien s'appuie sur la mutation du gène *aroA* des *Salmonella enterica*, qui code pour des composés aromatiques impliqués dans la reproduction bactérienne. Cette mutation bloque la capacité de reproduction de la bactérie, diminuant sa virulence, tout en conservant la capacité d'invasion de l'intestin grêle suffisamment longue pour induire une production antigénique et ainsi une réponse immunitaire protectrice. De nombreuses autres mutations ont été découvertes chez de nombreuses bactéries, laissant une multitude de choix possibles lors de la conception d'un vaccin à vecteur bactérien recombinant (da Silva *et al.*, 2015). Un vaccin à vecteur bactérien recombinant a été développé par Huvepharma aux Etats-Unis et au Canada contre l'entérite nécrotique chez les poules, causée par *Clostridium perfringens* de type A repose sur l'utilisation de *Salmonella typhimurium* génétiquement atténué et contenant un plasmide encodant les gènes codant pour les toxines alpha et netB de *Clostridium*. L'administration de ce vaccin dans l'eau de boisson permet la mise en place d'une immunité muqueuse protectrice et a même permis de diminuer l'utilisation d'antibiotiques dans des élevages de poules au Canada (Entrican & Francis, 2022; Les Producteurs de poulet du Canada, 2022).

2.2.3.2. Vaccins chimériques

Il existe deux types de vaccins chimériques :

- ❖ Les vaccins viraux chimériques reprennent le même principe que les vaccins viraux recombinants, mais l'améliore (*Figure 18*). En effet, le plasmide transfectant les cellules eucaryotes contient le génome viral complet mais non plus un mais plusieurs séquences ADN codant des antigènes de plusieurs agents pathogènes. Les virus produits sont alors purifiés et mis en solution pour l'inoculation (*Aida et al., 2021*). Le vaccin Innovax®-ND-IBD (*Tableau IV*) est un vaccin chimérique à vecteur viral développé à partir d'un herpès virus du dindon de sérotype 3 responsable de la maladie de Marek, modifié génétiquement afin d'inclure des gènes codant pour des protéines provenant de la souche lentogène F du virus de la maladie de Newcastle, mais aussi codant pour des protéines de capsid VP2 du virus responsable de la maladie de la bursite infectieuse, également appelée maladie de Gumboro. Ce vaccin trivalent permet d'induire la mise en place d'une immunité protectrice contre les trois agents pathogènes (*Dey et al., 2017*).
- ❖ Les vaccins protéiques chimériques reprennent le principe des vaccins à sous-unités recombinantes (*Figure 18*). Le plasmide transfectant les cellules eucaryotes contient plusieurs gènes d'intérêt, qui donneront une protéine chimérique, composés de plusieurs antigènes d'intérêt (*Aida et al., 2021*). Le vaccin Vanguard®crLyme chez le chien est un vaccin protéique chimérique contre la maladie de Lyme produit à partir d'un plasmide encodant la protéine OspA (Outer surface protein) et un chiméritope (protéine chimérique encodant différents épitopes linéaires) nommé OspC, qui comprend 14 variantes des épitopes H5 et L5 (7 variantes pour chaque épitope). La production d'anticorps dirigés contre OspC est grandement dépendante du type d'épitope H5 et L5 présent sur la protéine. Cette stratégie de vaccin chimérique permet d'induire la production d'anticorps anti-OspC chez un grand nombre de chien car ce vaccin encode de nombreux variants des principaux épitopes de la protéine originelle et permet donc de protéger efficacement les chiens contre *Borrelia burgdorferi* (*Izac et al., 2020; Marconi et al., 2020*).

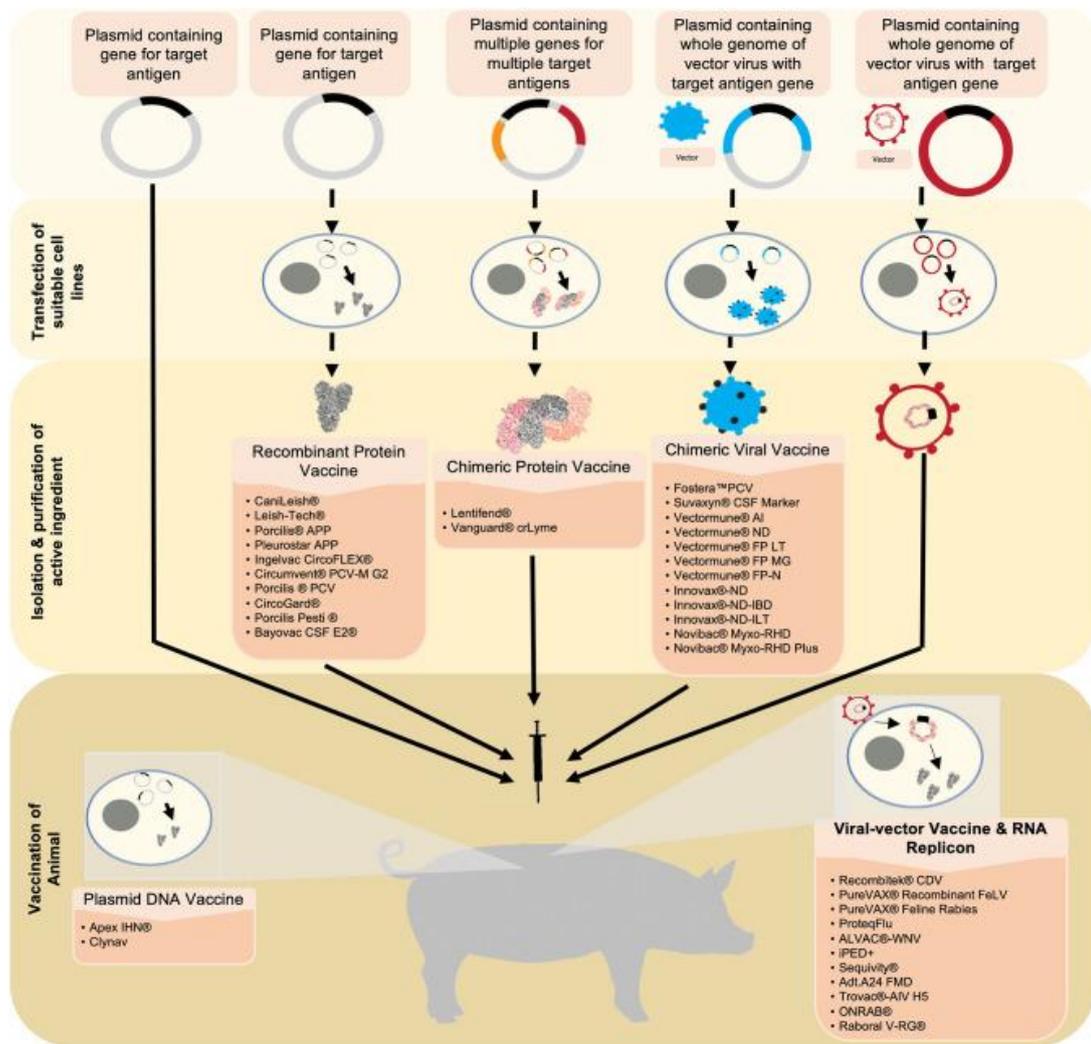


Figure 18 : Schéma du principe des vaccins recombinants, chimériques et à ADN selon Aida et al., 2021

2.2.4. Vaccins DIVA

Les vaccins DIVA (Differentiation of Infected and Vaccinated Animals) ne sont pas une catégorie de vaccins à proprement parler mais englobent tous les vaccins permettant de différencier les animaux vaccinés des animaux réellement infectés par l'agent pathogène. Ils jouent un rôle important dans le contrôle de la transmission des maladies animales, en permettant aux vétérinaires de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés grâce à leur profil sérologique (Aida et al., 2021; Capua et al., 2004).

Il existe plusieurs méthodes de production des vaccins DIVA :

- ❖ La plupart des vaccins DIVA dérivent de l'utilisation de la délétion d'un gène viral codant pour un antigène particulier, permettant alors de reconnaître les animaux vaccinés par l'absence de production d'anticorps dirigés contre l'antigène délété (Aida et al., 2021; Henderson, 2005).
- ❖ Une autre méthode consiste à ajouter à la séquence génome viral un antigène exogène, permettant de différencier les animaux vaccinés par la présence d'anticorps dirigés contre cet antigène étranger (Henderson, 2005).

- ❖ La dernière méthode est notamment utile aux vaccins à ADN et chimériques et permet d'insérer la séquence d'un gène codant un antigène exogène dans le plasmide qui permettra de produire les protéines chimériques ou les antigènes vaccinaux (Henderson, 2005).

La différenciation des animaux infectés et vaccinés peut se faire par le biais de tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Aida *et al.*, 2021).

De nombreux vaccins DIVA se développent (*Tableau V*), et ont notamment été expérimentés pour le contrôle de la fièvre aphteuse, de la Peste Porcine Classique (PPC), de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR) et de la maladie d'Aujeszky (Aida *et al.*, 2021).

Tableau V : Liste non exhaustive des vaccins DIVA à usage vétérinaire selon Aida et al., 2021

TABLE 4 | DIVA vaccines.

Species	Vaccine	Manufacturer	Pathogen
Canine	Leish-Tech [®]	CEVA Animal Health	Leishmania
	Lentifend [®]	Laboratorios Leti	Leishmania
Feline	PureVAX [®] Recombinant FeLV	Boehringer Ingelheim	Feline Leukemia Virus
Swine	Porcilis [®] Begonia	Merck Animal Health	Suid Herpesvirus 1
	Auskipra [®] GN	Hipra	Suid Herpesvirus 1
	Suvaxyn [®] CSF Marker	Zoetis	Classical Swine Fever Virus
Bovine	Adt.A24 FMD	GenVec	Foot and Mouth Disease
	Bovilis [®] IBR Marker Live	Intervet	Bovine Herpesvirus-1
	Hiprabovis [®] IBR Marker Live	Hipra	Bovine Herpesvirus-1
	Bayovac IBR Marker Vivum	Bayer	Bovine Herpesvirus-1
	Bayovac IBR Marker Inactivum	Bayer	Bovine Herpesvirus-1
	Risposal [®] IBR-Marker Inactivated	Zoetis	Bovine Herpesvirus-1
Risposal [®] IBR-Marker Live	Zoetis	Bovine Herpesvirus-1	

La vaccination a remarquablement progressé depuis ses débuts, datant du Xe siècle en Chine. Les vaccins ont connu une amélioration corrélée aux progrès technologiques, allant de la simple utilisation de l'agent pathogène atténué par Jenner jusqu'à la manipulation génétique de son génome au XXIe siècle. Malgré tous ces progrès il est encore impossible de produire des vaccins pour certains agents pathogènes (ex : Le VIH en médecine humaine), et une meilleure connaissance des mécanismes immunitaires est fondamentale pour créer de nouveaux types de vaccins (S. A. Plotkin & Plotkin, 2011).

2.3. Adjuvants vaccinaux

Les adjuvants sont des molécules ou systèmes de délivrance permettant d'augmenter l'immunogénicité de l'antigène. Ils rentrent dans la composition de certains vaccins (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).

2.3.1. Mode d'action des adjuvants

Historiquement, les vaccins vivants atténués furent les premiers vaccins mis au point, ils présentaient une immunogénicité importante mais une réversion de l'agent pathogène à leur état virulent était un point à améliorer. C'est pour palier à ce problème que les vaccins inactivés furent introduits. Ces vaccins étaient d'utilisation plus sûre, mais perdaient une part importante d'immunogénicité. Des méthodes ont alors été étudiées afin de booster l'immunité, c'est ainsi que sont nés les adjuvants (Singh & O'Hagan, 2003).

Il existe plusieurs modes d'actions des adjuvants (Figure 19), dont une grande partie des mécanismes précis restent inconnus, en raison de la complexité de la réaction immunitaire (Singh & O'Hagan, 2003) :

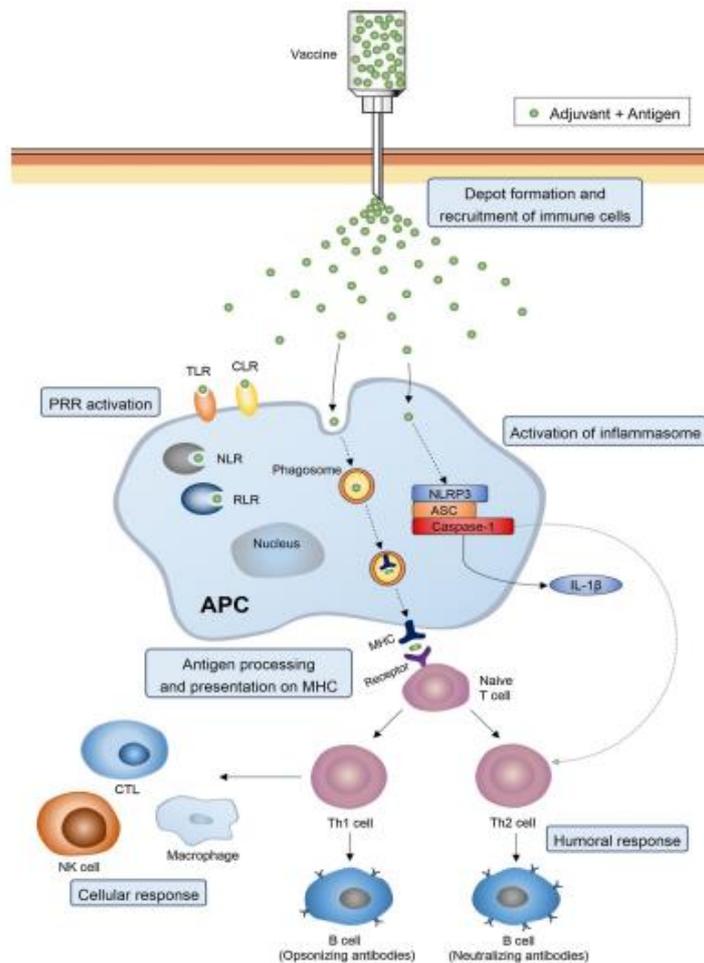


Figure 19 : Schéma récapitulatif des modes d'action des adjuvants selon Bastola et al., 2017

- ❖ **Amélioration de l'immunogénicité** des antigènes vaccinaux : certains adjuvants sont des PAMP, qui associés aux antigènes vaccinaux sont capables de se fixer sur des PRR de cellules activant l'immunité adaptative (cellules dendritiques) et ainsi de créer une mémoire immunitaire. Ce sont des adjuvants notamment utiles pour les vaccins à sous-unités, qui sont des vaccins très purifiés et qui sont souvent incapables d'activer seuls les PRR des cellules de l'immunité innée. Le PRR le plus étudié pour le développement d'un adjuvant est le TLR7. D'autres récepteurs ont par la suite été étudiés, comme le TLR4, capable de reconnaître le LPS d'*Escherichia coli*. L'activation des cellules dendritiques permet d'améliorer les propriétés des cellules dendritiques ainsi que les mécanismes aboutissant à leur état mature :

- Les adjuvants ciblant ces cellules agissent en améliorant leur capacité à capter les antigènes et à les présenter à leur surface. Dupuis *et al.* ont montré par exemple qu'en injectant à des souris l'antigène gD2 d'un Herpèsvirus associé à la fluorescéine et associé à l'adjuvant MF59, les cellules dendritiques de la souris internalisaient ce complexe et l'exprimaient à leur surface (Dupuis *et al.*, 1999; S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).
- Les adjuvants ciblant la maturation des cellules dendritiques peuvent améliorer l'activation des lymphocytes T naïfs présents dans les nœuds lymphatiques. C'est notamment le cas des adjuvants basés sur les PAMP (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).
- Les adjuvants particuliers comme les microsphères PGLA et les ISCOM sont des systèmes permettant d'améliorer la délivrance de l'antigène exogène aux cellules dendritiques en les protégeant, ainsi que la présentation de l'antigène par les CMH-1 des cellules dendritiques, aboutissant à une réponse CD8+ cytotoxique (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).
- Les adjuvants composés de sels d'aluminium sont captés par les macrophages et sont contenus dans des inclusions cytoplasmiques. Ces macrophages subissent alors des modifications phénotypiques et expriment des récepteurs de cellules précurseurs des cellules dendritiques. Ils induisent une mémoire immunitaire par le biais de leur CMH-II (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008; Singh & O'Hagan, 2003).

L'activation des cellules dendritiques contribue à la **production de nombreuses chimiokines et cytokines**, qui vont moduler le type de réponse immunitaire en agissant directement sur les lymphocytes T helper. En choisissant le type d'adjuvant, il est possible ainsi favoriser une réponse de type Th1, notamment utile pour induire une réponse immunitaire cytotoxique particulièrement importante lors d'infection par des micro-organismes intracellulaires, ou une réponse Th2, permettant de réguler la réponse immunitaire humorale efficace notamment contre les micro-organismes extra-cellulaires (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).

- ❖ **Formation de dépôt** : certains adjuvants sont capables de former des dépôts au site d'injection, sur lesquels les antigènes vaccinaux sont piégés, ou s'adsorbent. Ce procédé permet d'augmenter la demi-vie de l'antigène et de créer une réaction immunitaire retardée par libération progressive de l'antigène (Bastola *et al.*, 2017; S. A. Plotkin & Orenstein, 2008).
- ❖ **Activation de l'inflammasome** : les sels d'aluminium sont capables d'activer des protéines de la famille des NLR, dont les protéines NOD font partie. Ces protéines entraînent une cascade de réactions dont la production d'IL-1 β par les caspases-1 ainsi que la production d'IL-18 et IL-33 en sont la finalité. Ce sont des cytokines pro-inflammatoires (Bastola *et al.*, 2017).
- ❖ **Amélioration de la présentation croisée** : il s'agit du rôle fondamental des adjuvants, permettant d'améliorer la réponse immunitaire induite par le vaccin. Les cellules dendritiques sont capables de présenter l'antigène selon les voies classiques de présentation du CMH-I et II, mais également selon les voies de présentation croisée. Cela permet l'induction d'une réponse immunitaire humorale en plus d'une réponse cellulaire. Ainsi, des sels d'aluminium modifiés comme le AlO(OH) pourraient induire une déstabilisation des lysosomes dans lesquels sont contenus les antigènes vaccinaux, qui restent dans le compartiment cytosolique (Ho *et al.*, 2018).

2.3.2. Types d'adjuvants

Lors de la conception d'un vaccin, le choix d'un adjuvant va être primordial afin d'induire une immunisation suffisante pour protéger un animal. Le choix d'un adjuvant se fait selon le type d'immunité qu'on souhaite induire. Il existe par ailleurs une multitude d'adjuvants :

- ❖ **Sels d'aluminium** : Ces adjuvants constituent les premiers adjuvants mis au point et ont été largement utilisés par le passé en raison de leur fort pouvoir immunogène (hauts titres en IgG) et de leur sécurité d'utilisation. L'un des premiers sels d'aluminium est l'alun de potassium ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$). Son principal mode d'action est la formation d'un dépôt adsorbant l'antigène, et le libérant progressivement. Il a été utilisé pour de nombreux vaccins comme les vaccins contre la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR), la Diarrhée Virale Bovine (BVD), le Para-Influenza de type 3 (PI3) et *Mannheimia haemolytica* (Burakova *et al.*, 2018). Ces adjuvants ont une efficacité limitée contre les pathogènes intracellulaires mais sont des candidats idéaux pour les vaccins contre les bactéries car ils permettent l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse Th2 et une importante réponse immunitaire humorale (Burakova *et al.*, 2018; Lindblad, 2004).

- ❖ **Adjuvants immunostimulateurs** :
 - Les adjuvants basés sur les PAMP réagissent avec le TLR4 des CPA et induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires. Le Monophosphoryle lipide A est un PAMP dérivé du LPS de *Salmonella minnesota*, connu pour induire la production d'IL-2 et d'IFN- γ , à l'origine de l'activation des lymphocytes Th1, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire. Par la suite, des adjuvants basés sur la structure du monophosphoryle lipide A ont été mis au point et sont testés par des essais cliniques (S. A. Plotkin & Orenstein, 2008; Singh & O'Hagan, 2003).
 - L'ADN bactérien est également utilisé comme adjuvant immunostimulateur. En effet, le profil de méthylation va entraîner une réponse immunitaire au sein des cellules eucaryotes. L'ADN bactérien est composé d'îlots CpG non méthylés en grande quantité. Or, les cellules eucaryotes possèdent des îlots CpG méthylés et en faible quantité. Ce profil de méthylation particulier permet aux cellules eucaryotes de reconnaître un ADN pathogène d'un ADN provenant du « soi ». L'ADN pathogène est reconnu par le TLR9 et induit une réponse Th1, dont l'effet est maximisé quand cet adjuvant est couplé aux vaccins conjugués (Singh & O'Hagan, 2003).
 - Les saponines constituent le dernier groupe d'adjuvants immunostimulateurs. Elles sont purifiées de l'écorce d'un arbre chilien, nommé le *Quillaja saponaria* (Quil A). C'est la saponine QS21 qui est extrait et purifié de cet arbre et qui permet d'induire la production de cytokines IL-2 et IFN- γ , à l'origine d'une réponse de type Th1 et de la production d'IgG2. Cependant, les saponines sont capables de s'insérer entre les lipides membranaires, créant des pores dans les cellules (Singh & O'Hagan, 2003). La combinaison de saponines au cholestérol et à des phospholipides permet de former des adjuvants particuliers nommés Immune-Stimulating Complexes (ISCOM), limitant ainsi les effets toxiques des saponines (Burakova *et al.*, 2018).

- ❖ Adjuvants **particulaires** : Ces adjuvants sont constitués d'une enveloppe entourant et protégeant l'antigène vaccinal et ils possèdent une taille similaire aux agents pathogènes les plus courants que le système immunitaire à l'habitude de combattre. Ces adjuvants particuliers peuvent également être conjugués à des adjuvants immunostimulateurs afin d'améliorer la réaction immunitaire. Il existe plusieurs adjuvants particuliers (Bastola *et al.*, 2017; Burakova *et al.*, 2018; S. A. Plotkin & Orenstein, 2008; Singh & O'Hagan, 2003) :
 - Émulsions lipidiques (Figure 20) : L'adjuvant complet de Freund est une émulsion lipidique, associée à des mycobactéries tuées et contenant l'antigène. Cet adjuvant permettait de stimuler le système immunitaire mais les mycobactéries pouvaient être à l'origine d'une réaction inflammatoire exacerbée, néfaste pour l'individu vacciné. C'est pour cette raison que fut mis au point l'adjuvant incomplet de Freund (IFA), qui ne contient que l'émulsion lipidique et l'antigène. L'IFA a été utilisé dans de nombreux vaccins vétérinaires tels que les vaccins pour la fièvre aphteuse, la rage, la grippe équine, le choléra porcin, la maladie de Newcastle et l'hépatite de Rubarth. L'IFA a ensuite laissé sa place à de nombreuses émulsions d'origines différentes (Singh & O'Hagan, 2003).

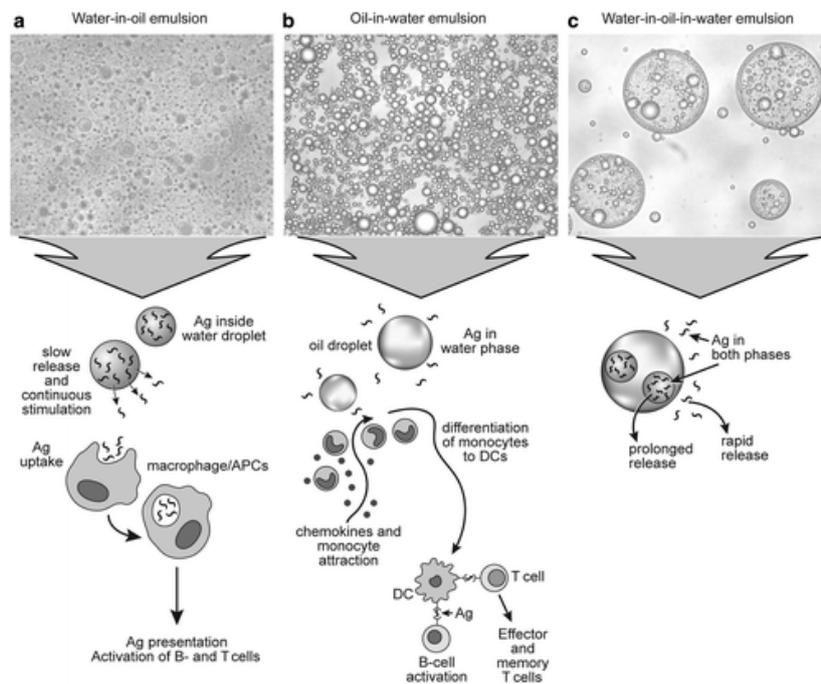


Figure 20 : Mécanismes d'action des différents types d'émulsions lipidiques selon Burakova *et al.*, 2018

- **Liposomes** : Ces adjuvants sont constitués d'une membrane phospholipidique et constituent plutôt des systèmes de délivrance de l'antigène que des immunostimulateurs. Ils sont souvent combinés aux adjuvants immunostimulateurs (c'est l'exemple de la saponine QS21 entourée d'un liposome et formant un ISCOM) (Burakova *et al.*, 2018; Singh & O'Hagan, 2003). Des membranes virales ont également été utilisées comme liposomes et ont été renommées « virosomes » (Figure 21). Ces virosomes sont des membranes du virus Influenza, majoritairement constituées de phosphatidylcholine, entre lesquels s'intercalent les hémagglutinines virales, et dans lesquels sont inclus les antigènes vaccinaux. Ce système permet une endocytose du complexe par reconnaissance des récepteurs viraux et fusion des membranes. Le système immunitaire reconnaît alors une infection par un agent pathogène intracellulaire et met en place une réponse CTL. Il existe également des systèmes similaires, faisant intervenir des membranes d'*Archaeobacteriae*, nommés « archaeosomes », qui semblent être plus efficaces que les liposomes (Conlan *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2000; Singh & O'Hagan, 2003). Plus récemment, ce sont les vésicules constituées de lipides cationiques qui ont été mis au point comme systèmes de délivrance des antigènes (Guy *et al.*, 2001; Singh & O'Hagan, 2003).

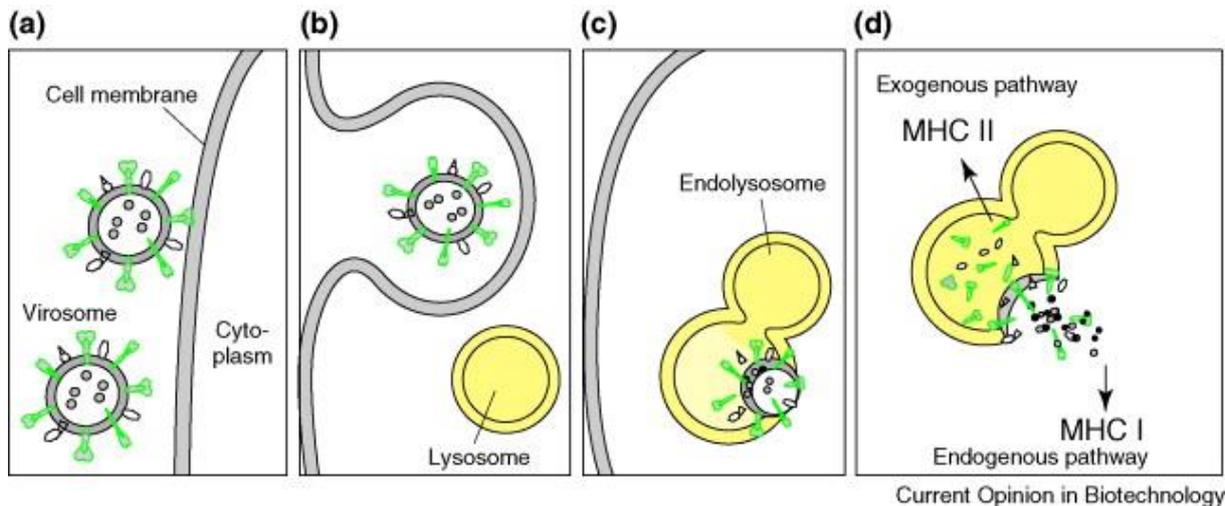


Figure 21 : Mode d'action des virosomes selon Felnerova *et al.*, 2004

- **Polymères** : Les polymères ou protéines capables de s'assembler pour former une matrice protectrice sont des adjuvants permettant d'améliorer la délivrance de l'antigène aux CPA. Des polyesters biocompatibles tels que le polyactide-co-glycolide ont été les premiers adjuvants polymériques mis au point. Il a été démontré que ces adjuvants étaient capables d'être endocytés et d'induire une réponse des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Le polyactide-co-glycolide est également utilisé comme adjuvant améliorant l'immunité muqueuse pour les vaccins à administration orale et nasale. Des polymères similaires constitués de lipides cationiques ont plus récemment été testés et ont montré leur intérêt dans l'endocytose des plasmides des vaccins à ADN (Singh & O'Hagan, 2003).

Un adjuvant parfait serait, en théorie, capable d'agir et d'améliorer toutes les étapes de la réponse immunitaire. Cependant, dans la pratique, retrouver toutes ces propriétés dans un seul adjuvant relève de l'utopie. C'est la raison pour laquelle on recourt généralement à la combinaison de plusieurs adjuvants afin d'améliorer le vaccin de manière optimale. Des effets synergiques entre les différents adjuvants sont également recherchés (Burakova *et al.*, 2018).

L'émergence de nouvelles maladies, la résurgence d'anciennes maladies ainsi que le développement de résistances aux antibiotiques constituent des problématiques nécessitant une recherche constante de nouveaux adjuvants toujours plus efficaces afin d'assurer une protection durable et optimale de nos animaux (Singh & O'Hagan, 2003).

2.4. Avantages et limites des vaccins conventionnels

Les différents types de vaccins présente de nombreuses caractéristiques, leur conférant des modes d'action différents et à l'origine d'avantages et d'inconvénients (*Tableau VI*) :

Tableau VI : Tableau récapitulatif des avantages et limites de chaque type de vaccin selon Ellis et al., 2022

Categories of Canine Vaccines Based on Physical Type of Immunizing Antigen

TYPE	ALTERNATIVE NAMES	DESCRIPTION	EXAMPLES*
Attenuated	<ul style="list-style-type: none"> • Live • Modified live • Live attenuated 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunogenic with long duration of immunity; induces both cellular and humoral immunity • More likely to prevent both infection and disease • Certain vaccines may result in a transient period of viral shedding of the attenuated/modified virus • Reversion to virulence theoretically possible but unlikely in appropriately tested and licensed vaccines • Requires careful storage (usually refrigeration) and handling (administer promptly after reconstitution) 	<ul style="list-style-type: none"> • Most canine distemper virus and parainfluenza virus vaccines • All canine parvovirus and adenovirus-2 vaccines
Inactivated	<ul style="list-style-type: none"> • Killed 	<ul style="list-style-type: none"> • Stable products that cannot induce disease in the animals • Less immunogenic and with shorter duration of immunity than attenuated products • Generally require an adjuvant to induce sufficient immunity; may require more frequent administration • May be more associated with adverse reactions • May not protect against infection (instead protect against disease) 	<ul style="list-style-type: none"> • Canine rabies and influenza vaccines • Whole cell bacterin vaccines <ul style="list-style-type: none"> • Some canine Lyme disease vaccines • Some canine leptospirosis vaccines • Parenteral <i>Bordetella bronchiseptica</i> vaccine
Recombinant	<ul style="list-style-type: none"> • Subunit • Polysaccharide • Conjugate • Chimeric • Viral-vectored 	<ul style="list-style-type: none"> • Uses a gene of the pathogen inserted into a virus or bacterial plasmid, or a single protein, alone or in combination with other antigens • Significant variability in this category in terms of immunogenicity and frequency of booster doses 	<ul style="list-style-type: none"> • Canarypox virus-vectored canine distemper vaccine • Some canine Lyme disease vaccines <ul style="list-style-type: none"> • Plasmid-expressed or engineered antigens
Toxoid		<ul style="list-style-type: none"> • Creates immunity to the toxin produced by the organism rather than the organism itself • Generally the shortest duration of immunity of vaccine types 	<ul style="list-style-type: none"> • Western diamondback rattlesnake (<i>Crotalus atrox</i>) toxoid vaccine

- ❖ Vaccins **vivants atténués** : Ce sont des vaccins utilisant l'agent pathogène vivant, mais donc la virulence est diminuée. De ce fait, ce sont les vaccins mimant le plus fidèlement une infection par une souche naturelle de pathogène (Francis, 2018; Jorge & Dellagostin, 2017).
 - Avantages : Ils induisent une forte immunité, en stimulant l'immunité humorale et cellulaire (Francis, 2018; Jorge & Dellagostin, 2017). Ils sont ainsi capables de protéger efficacement les animaux contre les maladies et contre la transmission de l'agent pathogène (Ellis et al., 2022).

- Limites : Certains agents pathogènes atténués sont capables de revenir au phénotype virulent, conduisant au développement de la maladie associée chez l'animal vacciné. Ils nécessitent également un stockage au réfrigérateur afin de conserver leur stabilité et doivent être administrés rapidement après leur reconstitution (Ellis *et al.*, 2022; Jorge & Dellagostin, 2017).
- ❖ Vaccins **inactivés** : Ce sont des agents pathogènes inactivés (tués) par des méthodes physico-chimiques.
 - Avantages : L'inactivation des agents pathogènes annule la probabilité qu'un pathogène revienne à son phénotype virulent et en fait donc un vaccin sûr d'utilisation (Ellis *et al.*, 2022; Jorge & Dellagostin, 2017). Ce sont également des vaccins très stables (Ellis *et al.*, 2022).
 - Limites : L'inactivation empêche la réplication du pathogène, diminuant ainsi fortement son immunogénicité et nécessitant le plus souvent l'administration conjointe d'un adjuvant ainsi que l'administration de plusieurs doses afin d'obtenir une réponse immunitaire suffisante (Ellis *et al.*, 2022; Francis, 2018; Jorge & Dellagostin, 2017).
- ❖ Vaccins **sous-unités** et **recombinants inertes** : Ce sont des vaccins sous-unitaires, polysaccharidiques, conjugués, chimériques protéiques et VLP, produits en insérant le gène d'un pathogène dans un vecteur :
 - Avantages : Les vaccins sous-unités sont constitués de sous-unités purifiées (souvent d'origine protéique) ou de particules virales sans aucun génome à l'intérieur, possédant une excellente innocuité (Ellis *et al.*, 2022; Jorge & Dellagostin, 2017; F. Liu *et al.*, 2012). La production des vaccins recombinants inertes à grande échelle et à faible coût est possible et se fait dans des vecteurs spécialement fabriqués dans ce but (Jorge & Dellagostin, 2017). Les vaccins VLP permettent même de stimuler les réponses humorales et cellulaires (F. Liu *et al.*, 2012).
 - Limites : Ces vaccins induisent une immunogénicité souvent faible et les vaccins polysaccharidiques n'induisent même aucune mémoire immunitaire sans ajout d'une protéine porteuse (Siegrist, 2013). Excepté les vaccins VLP, ils induisent principalement une immunité humorale et nécessitent l'administration d'un adjuvant afin d'améliorer la réponse immunitaire (Jorge & Dellagostin, 2017). Concernant les vaccins VLP, seuls quelques épitopes B et T possédant une séquence très conservée peuvent être utilisés dans la formulation d'un vaccin, limitant les choix possibles (F. Liu *et al.*, 2012).
- ❖ Vaccins **recombinants vectoriels** : Ce sont les vaccins à vecteur viral et bactérien et les vaccins viraux chimériques, produits à partir de bactéries et virus atténués, différents de l'agent pathogène d'origine et encodant un plasmide ou un gène d'intérêt codant pour un ou plusieurs antigènes de l'agent pathogène contre lequel on souhaite vacciner :
 - Avantages : Les vaccins à vecteurs viraux et bactériens produisent une forte immunité humorale et cellulaire, à l'origine d'une immunisation longue, avec une bonne innocuité et possèdent des systèmes de réplication *in vivo*. Les vaccins chimériques permettent notamment d'induire une immunité protectrice contre plusieurs agents pathogènes en même temps, en incluant plusieurs antigènes différents dans le vecteur viral ou bactérien (Jorge & Dellagostin, 2017). Les vaccins recombinants vectoriels permettent également de s'affranchir du risque de réversion au phénotype pathogène (Bull *et al.*, 2019).

- Limites : Les vaccins à vecteur recombinant peuvent perdre le gène d'intérêt ou le plasmide contenant le gène d'intérêt au cours de l'étape de production du vaccin, ce qui diminue fortement l'efficacité vaccinale. De plus, une réaction immunitaire dirigée contre le vecteur est possible et entraîne la dégradation de ce dernier, limitant l'efficacité du vaccin (Bull *et al.*, 2019).

3. Objectifs de la vaccination dans le contrôle des maladies infectieuses

3.1. Vaccins préventifs et thérapeutiques

La vaccination préventive consiste à injecter un antigène d'un agent pathogène chez un individu sain, afin d'induire une réaction immunitaire qui sera durable et qui protégera l'animal contre cet agent pathogène. C'est le type de vaccination historique, qui consiste à injecter le vaccin à un individu sain. Elle est centrée sur la mise en place d'une mémoire immunitaire (Sela & Hilleman, 2004).

Durant les années 1950, des recherches effectuées sur les cancers ont montré que les cellules tumorales exprimaient des antigènes que les cellules saines n'exprimaient pas. Ces antigènes sont dénommés Tumor-Associated Antigen (TAA). La plupart des tumeurs sont capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte par le biais de plusieurs facteurs : la diminution de l'expression des gènes codant les TAA, l'inhibition de la mise en place de la réaction immunitaire par la sécrétion de molécules inhibitrices et bien d'autres mécanismes rendant le système immunitaire inefficace. Une idée est alors émise et pose les bases des recherches à venir sur la vaccination thérapeutique (classée dans les techniques d'immunothérapie) : pourrait-on utiliser des adjuvants vaccinaux permettant d'induire une réponse spécifique contre ces TAA ? (Hearnden & Lavelle, 2013)

La vaccination thérapeutique fait partie des techniques d'immunothérapie, qui consistent à éliminer une affection d'un patient (de nombreuses recherches ont été effectuées sur le cancer notamment) en stimulant son système immunitaire et en renforçant la réponse immunitaire contre l'agent causal de cette affection (Guo *et al.*, 2013). Le principe d'action de ces vaccins est non pas d'induire la production d'anticorps neutralisants notamment et de lymphocytes mémoires, comme dans le cas de la vaccination prophylactique, mais de stimuler la réponse immunitaire cellulaire, afin de diriger les cellules immunitaires effectrices contre l'agent causal (Garbuglia *et al.*, 2020). Des vaccins thérapeutiques sont développés contre des maladies infectieuses, mais surtout contre des maladies non infectieuses, comme les cancers, les maladies auto-immunes (Chez l'Homme : asthme, diabète de type I, arthrite rhumatoïde, rejets de greffons, etc...), les maladies dégénératives (Chez l'Homme : maladie d'Alzheimer, dégénérescence maculaire liée à l'âge) et même contre les addictions (tabagisme, cocaïnomanie) ! (Novicki, 2013)

Les vaccins thérapeutiques offrent des perspectives innovantes pour l'avenir, notamment dans la prise en charge des maladies cancéreuses, et quelques spécialités sont même apparues en médecine humaine (ex : Oncophage® : vaccin contre le cancer rénal) et en médecine vétérinaire (Oncept, vaccin contre le mélanome oral canin). Cependant, les études restent encore prudentes sur leur efficacité et des recherches complémentaires doivent être réalisées afin de pouvoir concevoir des vaccins thérapeutiques induisant une destruction complète de l'agent causant une affection (Novicki, 2013; Sela & Hilleman, 2004).

3.2. Protection des populations animales

3.2.1. Protection individuelle

La vaccination est un point clé de la prophylaxie vétérinaire : en effet, elle permet de protéger les individus contre l'infection par un agent pathogène en réduisant les effets cliniques liés à l'infection pouvant se traduire parfois par la mort de l'animal, en prévenant complètement l'infection et/ou en limitant les lésions liées aux infections secondaires et les comorbidités. Elle se base sur la mise en place d'une réponse immunitaire, qui peut être définie comme **active** ou **passive** (Ridremont, 2022) :

- ❖ L'immunisation active se définit par la mise en place d'une réponse immunitaire ciblée contre un agent pathogène donné et qui permet de protéger l'individu de manière directe contre les signes cliniques liés à l'infection et contre les lésions secondaires de la maladie. Un exemple d'immunité active est la vaccination contre le FeLV chez le chat, qui permet d'empêcher l'infection contre le virus, mais empêche également l'apparition de tumeurs lymphoïdes induites par le virus (Ridremont, 2022).
- ❖ L'immunisation passive quant-à-elle peut être séparée en deux catégories :
 - Chez certains individus incapables d'induire une réponse immunitaire ou dans le cas de certaines maladies faisant intervenir des toxines, l'administration directe d'anticorps peut être la seule option disponible en urgence permettant le rétablissement de l'animal. C'est le cas par exemple lors d'administration d'un sérum contenant des anticorps ciblés contre les toxines de *Clostridium* ou dirigés contre certains types d'*E. coli* lors de maladies néonatales chez les veaux nouveau-nés, qui ne possèdent pas de système immunitaire mature. On ne parle alors pas de vaccination, mais de « sérothérapie » (Ridremont, 2022).
 - Le transfert d'immunité passif des mères aux jeunes par le colostrum. Un exemple est la vaccination des vaches ou de truies gestantes contre les rotavirus ou certains *E. coli* entéro-toxémiques (ETEC) responsables d'affections gastro-intestinales néonatales permet le transfert passif d'anticorps anti-rotavirus ou anti-ETEC chez leur descendance par le colostrum, leur conférant une protection contre ces affections néonatales. Cependant, ces anticorps peuvent être à l'origine d'interférences lors d'injections vaccinales ultérieures en se fixant sur les antigènes vaccinaux, inhibant ainsi leur reconnaissance par le système immunitaire inné (Hedegaard & Heegaard, 2016; Ridremont, 2022).

La protection individuelle permet également d'améliorer les performances zootechniques. L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (anciennement OIE) estime que les maladies infectieuses sont responsables de 20% des pertes totales de la production animale mondiale. En effet, les animaux de rente sont les principaux affectés et les infections entraînent une diminution de la croissance des animaux (diminution de la quantité et de la qualité de viande produite) et sur leur production de matières premières (lait, œufs, etc...). Le développement de vaccins permettant de protéger les individus contribue également à améliorer les performances zootechniques et économiques (Ridremont, 2022).

3.2.2. Protection collective

La vaccination a pour but premier de protéger un individu, mais elle a également un impact au sein d'une population. Elle permet la mise en place d'une immunité de groupe à l'origine d'une diminution de la propagation des agents infectieux au sein de cette population. En effet, les animaux vaccinés sont immunisés contre l'agent pathogène et ne sont plus sensibles ou deviennent moins sensibles à la maladie. La vaccination permet également de diminuer l'excrétion de cet agent pathogène. Plus la proportion d'animaux résistants augmente au sein de la population, plus l'agent pathogène rencontre des difficultés à infecter un animal, ce qui ralentit sa progression. On définit un seuil appelé « seuil d'immunité de groupe », au-dessus duquel l'agent pathogène ne peut plus se transmettre et la progression de la maladie est enrayée. C'est ce seuil qu'on cherche à atteindre lors de campagnes de vaccination. Il est cependant important de maintenir le niveau d'immunité de la population au-dessus de ce seuil afin de maintenir cette immunité de groupe et ainsi limiter le risque de réémergence de l'agent pathogène (Ashby & Best, 2021).

La Figure 22 permet de mettre en évidence l'importance de l'immunité de groupe sur la transmission d'un agent pathogène au sein d'une population. La Figure 22A montre qu'en l'absence d'une immunité de groupe, tous les individus sensibles sont susceptibles d'être infectés par l'agent pathogène et de se transmettre cet agent pathogène. La Figure 22B illustre une proportion d'individus immunisés inférieure au seuil d'immunité de groupe. Dans ce cas de figure, le nombre insuffisant d'individus immunisés permet à l'agent pathogène de continuer à circuler dans la population et à se transmettre à une grande proportion d'individus sensibles. La Figure 22C montre une proportion d'individus immunisés supérieure au seuil d'immunité de groupe. Dans ce cas de figure, l'agent pathogène ne peut infecter qu'une faible proportion d'individus sensibles, ce qui réduit drastiquement la propagation de l'agent pathogène au sein de la population (Ashby & Best, 2021).

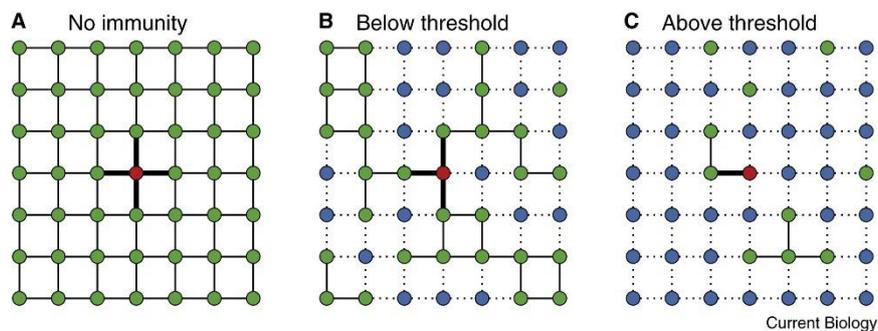


Figure 22 : Effet de la mise en place d'une immunité de groupe sur la transmission d'un agent pathogène dans une population selon Ashby & Best, 2021. Les points verts correspondent aux individus sensibles, les points bleus correspondent aux individus immunisés, le point rouge central correspond à l'individu infecté et introduisant l'agent pathogène dans la population et la transmission d'un individu infecté à un individu sensible se symbolise par des traits pleins.

Il est également important de noter que l'immunité de groupe peut être perdue dans une population, car l'immunité d'un individu peut diminuer au cours du temps, diminuant ainsi le taux d'immunité de la population. Les flux au sein d'une population sont également responsables d'une diminution de ce taux d'immunité total en raison des naissances, qui introduisent de nouveaux individus sensibles, et des décès qui induisent la perte d'individus immunisés. Il est donc important d'effectuer régulièrement des injections de rappel, mais également de vacciner les jeunes animaux sensibles afin de maintenir ce taux d'immunité supérieur au seuil d'immunité de groupe et ainsi de contrôler la maladie et sa propagation (Ashby & Best, 2021).

3.3. Niveaux de protection des vaccins et échecs vaccinaux

3.3.1. Niveaux de protection des vaccins

Les vaccins possèdent des actions ciblant les différentes étapes du cycle d'infection d'un agent pathogène. On définit ainsi trois types de vaccins, ayant des effets différents sur chaque étape :

- ❖ Les vaccins **anti-mortalité** sont des vaccins permettant de réduire la virulence d'un agent pathogène et ainsi de diminuer la mortalité d'un agent pathogène, sans réduire le risque de transmission de l'agent pathogène (Barnett & Civitello, 2020; Gandon *et al.*, 2001; Miller & Metcalf, 2019; Read *et al.*, 2015). Ces vaccins se caractérisent par l'induction d'une réponse immunitaire innée qui permet l'élimination rapide d'un agent pathogène, ce qui empêche l'infection de l'individu vacciné, qui ne développera pas de réponse immunitaire adaptative (Pollard & Bijker, 2021). Ces vaccins possèdent un inconvénient majeur : en effet, un animal infecté par un agent pathogène mourant de son infection n'excrète plus d'agent pathogène. Or, les vaccins anti-mortalité permettent à l'individu de survivre à son infection tout en continuant de transmettre l'agent pathogène aux autres animaux. Les vaccins anti-mortalité augmentent donc la période infectieuse des animaux vaccinés. Cet effet des vaccins anti-mortalité peut poser un problème dans une optique de conservation de populations de la faune sauvage et leur utilisation doit être raisonnée. Cependant, le recourt à ces vaccins est indispensable dans le cas d'animaux domestiques ou de rente, avec parfois des conséquences désastreuses : une campagne de vaccination avec un vaccin anti-mortalité contre la maladie de Marek chez les volailles a été à l'origine de la sélection de virus hautement virulent, dont la conséquence fut une augmentation de la mortalité, rendant ce vaccin inefficace. De plus, ce type de vaccin ne permet pas la mise en place d'une immunité collective, mais il permet de protéger les individus contre les formes graves d'une maladie, limitant la mortalité (Barnett & Civitello, 2020; Gandon *et al.*, 2001; Miller & Metcalf, 2019; Read *et al.*, 2015).
- ❖ Les vaccins **anti-infection** sont des vaccins ne permettant pas aux agents pathogènes de s'établir durablement au sein de leur hôte. Les vaccins **anti-transmission** permettent à l'agent pathogène d'infecter l'individu mais limitent la transmission de cet agent au sein de la population. L'association de ces deux vaccins permet l'installation d'une immunité collective par le biais d'une diminution de la période infectieuse et de la transmission (Barnett & Civitello, 2020). Le vaccin BCG contre la tuberculose chez l'Homme est un vaccin combinant ces deux effets et permet d'induire la mise en place d'une réponse effectrice médiée par les lymphocytes T permettant de limiter le passage de la bactérie dans la circulation sanguine, limitant l'infection par cette dernière et limitant ainsi sa transmission. Ce vaccin permet également d'induire la mise en place d'une mémoire immunitaire, permettant de prévenir les infections futures par la bactérie (Pollard & Bijker, 2021).

Un vaccin idéal agirait serait donc un vaccin anti-mortalité, anti-infection et anti-transmission, car il agirait sur toutes les étapes de l'infection par un agent pathogène et limiterait la mortalité, l'infectiosité et la transmission de la maladie (Pollard & Bijker, 2021).

3.3.2. *Echecs vaccinaux*

La vaccination ne permet pas la protection complète des animaux contre une maladie donnée (Barnett & Civitello, 2020; Gandon *et al.*, 2001; Read *et al.*, 2015; Schat & Baranowski, 2007). En effet, plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer les échecs vaccinaux observés lors des campagnes de vaccination et on distingue deux causes majeures d'échecs : les causes liées au vaccin et les causes liées à l'individu vacciné (Wiedermann *et al.*, 2016).

Parmi les échecs liés au vaccin, on retrouve :

- ❖ Des altérations des propriétés vaccinales (atténuation incomplète d'un vaccin vivant, interruption de la chaîne du froid altérant la conservation du vaccin, différence antigénique entre la souche vaccinale et la souche pathogène circulante).
- ❖ Des erreurs de manipulation (administration par la mauvaise voie).
- ❖ Un défaut logistique (difficultés d'approvisionnement et de conservation des vaccins dans les pays chauds et les pays en développement) (Wiedermann *et al.*, 2016).

Concernant les échecs vaccinaux liés à l'individu vacciné, on retrouve :

- ❖ L'absence d'induction d'une réponse immunitaire protectrice, pouvant s'expliquer par deux phénomènes :
 - **L'immunité binaire** : la vaccination ne permet pas d'induire une réponse immunitaire chez tous les individus d'une population. L'immunité binaire classerait ces individus en deux catégories selon un modèle de réponse « tout-ou-rien » : les individus répondeurs et les individus non-répondeurs à la vaccination. La variabilité individuelle (immunodéficience, génétique, interférence de l'immunité maternelle, etc...) ainsi que les caractéristiques du vaccin (immunogénicité, adjuvants, administration, etc...) pourraient expliquer en partie ce phénomène d'immunité binaire (Barnett & Civitello, 2020; Heining *et al.*, 2012).
 - **L'immunité partielle** : chez les individus répondeurs à la vaccination, l'immunité induite ne permettrait pas une protection totale de l'individu sur un modèle « tout-ou-rien », comme supposé par le concept d'immunité binaire, mais pourrait plutôt induire un gradient d'intensité de réaction immunitaire, qui peut varier entre 0 et 1, 1 étant l'induction d'une réaction immunitaire à 100% d'intensité. Un des mécanismes permettant d'expliquer l'immunité partielle est la capacité des agents pathogènes (notamment les virus) à développer des mécanismes d'échappement à l'immunité. La vaccination permet de diminuer la gravité de la maladie en boostant la résistance des individus vaccinés contre l'agent pathogène, mais constitue une pression de sélection importante. En effet, elle exerce une pression de sélection permettant de sélectionner positivement les agents pathogènes présentant des mutations les rendant capables d'échapper au système immunitaire et de diminuer la propagation des agents pathogènes incapables d'y échapper. La vaccination pourrait alors protéger les individus vaccinés contre les agents pathogènes incapables d'échapper au système immunitaire mais les rend plus sensibles aux agents pathogènes mutés (Barnett & Civitello, 2020). La mise en place d'une immunité partielle entraîne alors plusieurs conséquences sur l'efficacité : elle permettrait de diminuer la mortalité liée à l'infection par l'agent pathogène sans diminuer sa propagation au sein de la population, ce qui empêche le contrôle de la maladie (Barnett & Civitello, 2020; Miller & Metcalf, 2019).

- ❖ L'existence d'une **immunité décroissante** : il a longtemps été admis que les vaccins étaient un outil prophylactique idéal et qu'ils induisaient chez les individus vaccinés une immunité protectrice et efficace à 100%. De nombreuses modélisations ont été réalisées avec cette donnée et ont montré que la mise en place de la vaccination permettait l'éradication de la maladie, ce qui est très rarement le cas *in vivo*. D'autres modélisations ont été réalisées en supposant que l'immunité décroissait avec le temps et qu'il était important de booster le système immunitaire grâce aux vaccinations de rappel et les résultats obtenus correspondaient mieux à la réalité. Par la suite, ces modélisations se sont affinées et grâce au développement des outils informatiques, permettent de se rapprocher de la réalité (Heffernan & Keeling, 2009). L'immunité décroissante illustre ce mécanisme de diminution de l'immunité chez les individus vaccinés. Des modélisations ont par ailleurs démontré que l'immunité induite par la vaccination décroissait plus rapidement que l'immunité induite par l'infection naturelle par l'agent pathogène, ce qui rendait les individus vaccinés plus sensibles à l'infection par l'agent pathogène que les individus non vaccinés lors d'épizooties évoluant de manière cyclique. En effet, les individus ayant été infectés par l'agent pathogène et y ayant survécu présentent une immunité durable, qui permet de les protéger longtemps contre l'agent pathogène, tandis que les individus vaccinés possèdent une immunité qui diminue rapidement, les rendant à nouveau très rapidement sensibles à l'agent pathogène. Il est donc important d'effectuer fréquemment des injections de rappel afin de booster la réponse immunitaire (Barnett & Civitello, 2020; Heffernan & Keeling, 2009).

Un exemple permettant d'illustrer ce phénomène est la vaccination des grues du Canada et des grues blanches contre la maladie de l'encéphalite équine de l'Est (EEE). Un vaccin inactivé avec du formaldéhyde a été formulé contre le virus de l'EEE afin de protéger les grues. Au cours d'une étude, les taux d'anticorps neutralisants ont été mesurés après primo-vaccination et se sont avérés très bas et diminuant rapidement (sous 30 jours). Les conclusions de cette étude montrent l'importance de la réalisation d'injections de rappel vaccinal tous les 30 jours afin de booster la réponse immunitaire (Barnett & Civitello, 2020; Clark *et al.*, 1987). La modélisation, couplée aux essais cliniques permettant de mesurer l'efficacité de la vaccination sur la qualité et la durabilité de la production d'anticorps neutralisants, sont deux outils intéressants dans la conception des vaccins et des protocoles vaccinaux assurant une protection optimale des populations (Barnett & Civitello, 2020).

- ❖ La **maturité du système immunitaire** : chez les individus âgés, on constate un phénomène d'immunosénescence caractérisée par la diminution de la diversité et nombre de lymphocytes B et T naïfs. Ces modifications du système immunitaire rendent les individus âgés plus sensibles aux maladies infectieuses et la vaccination de cette population est moins efficace en raison d'une diminution de l'immunogénicité des vaccins (Wiedermann *et al.*, 2016). Les jeunes individus possèdent un système immunitaire immature, qui rend la vaccination moins efficace (Pollard & Bijker, 2021).
- ❖ **L'interférence avec des anticorps maternels** : les nouveau-nés ont un système immunitaire immature et dépendent des anticorps transmis par le colostrum de leur mère pour assurer leur protection contre les agents pathogènes. Ces anticorps sont capables de se fixer sur les antigènes vaccinaux et de les rendre indisponibles pour les cellules de l'immunité innée (Niewiesk, 2014).

Tous ces facteurs contribuent à la mise en place d'une immunité incomplète et à un échec vaccinal. Par exemple, le virus Influenza est un virus à ARN capable de muter rapidement et de présenter des antigènes différents de ceux produits pour la vaccination. Ces mutations peuvent également être à l'origine d'une augmentation de la virulence de la souche, qui sera sélectionnée positivement avec la vaccination. En effet, le vaccin exerce une pression de sélection négative sur les souches contre lesquelles il a été formulé, ce qui limite leur propagation au sein d'une population et permet de sélectionner positivement les souches résistantes au vaccin (potentiellement plus virulentes), qui vont alors se propager. La valeur sélective d'un agent pathogène est la notion principale permettant d'expliquer cette augmentation de la virulence dans les populations d'agents pathogènes (Gandon *et al.*, 2001; Read *et al.*, 2015; Schat & Baranowski, 2007). Les agents pathogènes sont capables d'échapper au système immunitaire et à compliquer la mise en place d'une réponse immunitaire consécutive à la vaccination. Il est donc fondamental de développer de nouvelles technologies vaccinales permettant d'apporter de nouvelles solutions dans le contrôle des maladies infectieuses, et les vaccins à acides nucléiques constituent des alternatives intéressantes dans cette optique (Pollard & Bijker, 2021).

En résumé, les vaccins permettent d'induire la mise en place d'une réponse immunitaire effectrice permettant de lutter contre un agent pathogène infectant, et d'une mémoire immunitaire permettant l'induction d'une réponse immunitaire plus importante lors d'une seconde rencontre avec l'agent infectieux. Cela passe par des mécanismes immunitaires complexes, impliquant des cellules de l'immunité innée (DC), qui vont capter l'antigène, puis vont orienter la réponse effectrice en le présentant aux lymphocytes effecteurs, responsables de la mise en place d'une réponse humorale ou cellulaire.

Il existe plusieurs types de vaccins conventionnels, basés sur des vaccins à agents infectieux vivants (vaccins vivants atténués, recombinants) ou des vaccins inertes (vaccins inactivés, à sous-unités recombinantes, VLP, chimériques). Les vaccins vivants présentent l'avantage d'induire une réponse immunitaire forte et durable, mais peuvent être associés à des phénomènes de réversion au phénotype pathogène, alors que les vaccins inactivés sont plus sûrs d'utilisation car ils n'impliquent pas l'utilisation d'un agent infectieux vivant mais sont en conséquence moins immunogènes.

Les vaccins à acides nucléiques font partie des vaccins inertes. Ils constituent une alternative intéressante à certains vaccins conventionnels, notamment grâce à leur rapidité de production, et ont été développés pour constituer une arme supplémentaire dans l'arsenal disponible pour lutter contre les agents pathogènes infectieux et certaines maladies non-infectieuses. La seconde partie de cette thèse se consacrera à l'étude des vaccins à ADN, notamment sur l'histoire de leur développement, leur mode de fonctionnement et leurs améliorations, puis sur les vaccins à ADN commercialisés en médecine vétérinaire et enfin sur les perspectives de ces vaccins et leurs axes d'amélioration.

Partie II : Etat des lieux des vaccins à ADN en médecine vétérinaire

1. Historique des vaccins à ADN

Les vaccins conventionnels ont constitué une révolution dans la manière de se protéger contre les maladies infectieuses et ont permis la lutte contre de nombreux agents pathogènes. Cependant, il existe encore beaucoup de maladies, infectieuses et non-infectieuses (ex : SIDA et cancer), contre lesquelles il n'y a pas encore de vaccin efficace. C'est dans cette optique que de nouvelles technologies vaccinales sont développées, comme les vaccins à ADN (M. A. Liu, 2003).

Durant les années 1960, une équipe de chercheurs menée par Ito décrit pour la première fois la capacité de l'ADN nu à transférer les cellules eucaryotes lorsque ces deux éléments sont placés dans le même milieu (Dhama *et al.*, 2008; Ito, 1960). Cette propriété de l'ADN va être à l'origine des travaux de l'équipe de Wolff en 1990, qui vont poser les bases des recherches à venir sur la vaccination. En effet, Wolff et son équipe réussissent à introduire un plasmide bactérien recombinant, contenant une séquence marqueur (β -galactosidase, luciférase), dans des cellules musculaires de souris. Ils ont constaté que les cellules musculaires des souris avaient exprimé les séquences marqueurs (Dhama *et al.*, 2008; Wolff *et al.*, 1990).

Ces deux études ont permis de mettre en évidence deux propriétés essentielles à la confection des vaccins à ADN : d'une part l'ADN est capable de transférer les cellules eucaryotes, et d'autre part, les séquences d'ADN transférées sont capables d'être exprimées par les cellules eucaryotes (Dhama *et al.*, 2008). Cependant, une propriété fondamentale n'avait pas encore été démontrée : les vaccins à ADN sont-ils capables d'induire une immunisation ? En 1993, les travaux de Ulmer et de son équipe ont permis de répondre à cette question. En effet, ces chercheurs ont injecté un plasmide contenant la séquence d'une nucléoprotéine du virus Influenza A à des souris et ont montré qu'une réponse immunitaire protectrice s'était développée chez les souris vaccinées, prouvant ainsi qu'il était possible d'induire une immunisation avec les vaccins à ADN (Dory & Jestin, 2021; Ulmer *et al.*, 1993).

Les vaccins à ADN possèdent néanmoins un défaut important : la vaccination d'animaux plus grands que les souris donnait des résultats très contrastés. Des études ont alors été réalisées afin de combler ce défaut d'immunogénicité, en utilisant des adjuvants génétiques, séquences d'ADN contenant des molécules immunomodulatrices, insérées dans le plasmide à ADN permettant d'améliorer la qualité de la réponse immunitaire lorsqu'elles sont exprimées (Dory & Jestin, 2021).

En compilant toutes ces données, les chercheurs ont essayé de confectionner des plasmides recombinants incluant des gènes capables d'induire une immunisation, et les travaux de Liu et Oshop ont permis de mettre en évidence qu'une immunisation *in vivo* efficace était possible avec les vaccins à ADN (Dhama *et al.*, 2008; M. A. Liu, 2003; Oshop *et al.*, 2002). Des vaccins à ADN ont été mis au point et des essais cliniques ont été réalisés, à la suite desquels a suivi la commercialisation de certains de ces vaccins (Dhama *et al.*, 2008). A ce jour, quatre vaccins vétérinaires ont été commercialisés (*Tableau VII*) : le vaccin contre le virus du West-Nile chez les équidés, le vaccin contre le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse du saumon, le vaccin contre le mélanome oral du chien et le vaccin contre la maladie pancréatique du saumon (Dory & Jestin, 2021).

Tableau VII : Vaccins à ADN à usage vétérinaire commercialisés selon Dory & Jestin, 2021

Nom du vaccin (laboratoire)	Pathogène ciblé & Espèce vaccinée	Composition / Dose / Nombre d'inoculations	Efficacité vaccinale	Remarques
<i>West Nile Innovator</i> [®] (Fort Dodge Animal Health / Pfizer)	Virus de la fièvre du Nil Chevaux	Protéines d'enveloppe E et protéine pré-membrane PrM 1 mg / inoculation	Induction d'anticorps neutralisants Neutralisation de la virémie (D'après Davis et al. 2001)	Autorisé aux Etats-Unis en 2005 1 ^{er} vaccin ADN autorisé au monde. Remplacé depuis par un autre type de vaccin
<i>Apex-IHN</i> [®] (Novartis Animal Health Inc.)	Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse Saumon	Glycoprotéine G de surface 10 µg / inoculation	Augmentation de la survie (83-98 % vs 10-15 % pour les témoins) Blocage de la transmission virale (D'après Long et al. 2017)	Autorisé au Canada en 2005
<i>OnceptTM – Canine Melanoma vaccine</i> (Boehringer Ingelheim Vetmedica)	Mélanome oral aux stades II et III Chien	Tyrosinase humaine 500-1000 µg / inoculation ; 4 inoculations à 2 semaines d'écart puis tous les 6 mois	Prolongation de l'espérance de vie (D'après Bergman et al. 2006)	Autorisé aux Etats-Unis et utilisé depuis 2007 Traitement en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie
<i>Clynav</i> [®] (Elanco Europe)	Maladie pancréatique Saumon	Polyprotéine du virus 6-9,4 µg / inoculation	Atténuation des séquelles pancréatiques et de la perte de poids (D'après https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/clynav)	1 ^{er} vaccin à ADN autorisé dans l'Union Européenne en 2017

De nombreuses recherches sont en cours et visent à produire des vaccins à ADN de plus en plus performants et permettant d'une part de protéger les individus et les populations et d'autre part, de créer des vaccins thérapeutiques, permettant la lutte contre certaines maladies comme les cancers (Dory & Jestin, 2021).

2. Caractéristiques des vaccins à ADN

2.1. Constitution des vaccins à ADN

2.1.1. Le plasmide à ADN

La technologie des vaccins à ADN repose sur l'injection à un animal d'un plasmide bactérien génétiquement modifié, contenant un gène d'intérêt appartenant au génome d'un agent pathogène, afin d'induire la mise en place d'une immunité active contre cet agent pathogène. Ce plasmide doit être modifié afin de pouvoir être exprimé dans les cellules eucaryotes de l'animal vacciné (Dhama *et al.*, 2008; Ghaffarifar, 2018; Gurunathan *et al.*, 2000; M. A. Liu, 2003; Myhr, 2017; Tregoning & Kinnear, 2014).

Pour cela, le plasmide doit être composé de plusieurs séquences clés assurant sa sélection et lui conférant différentes propriétés (Figure 23) :

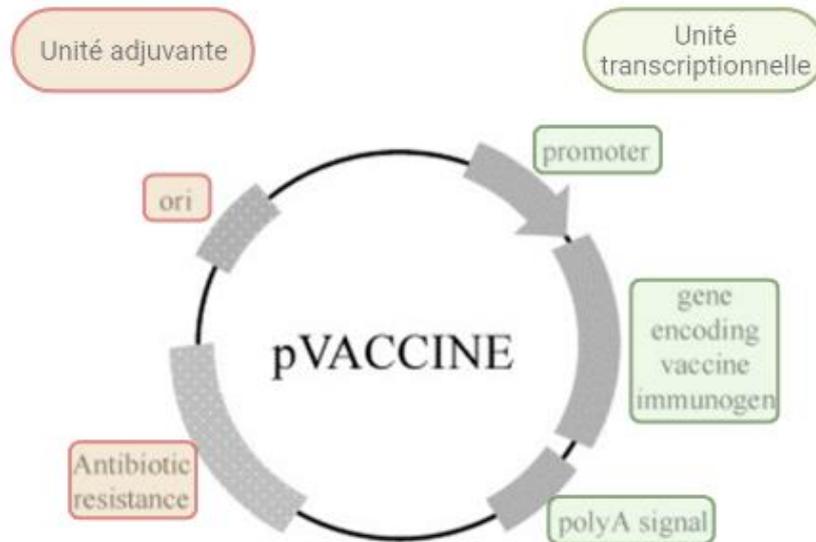


Figure 23 : Schéma d'un plasmide à ADN selon Dunham, 2002

- ❖ Une **unité transcriptionnelle**, permettant l'expression d'un plasmide d'origine procaryote dans des cellules eucaryotes, composée de plusieurs séquences :
 - Le gène d'intérêt, codant pour une séquence immunogène, provenant d'un agent pathogène contre lequel on souhaite induire une immunisation active (Dunham, 2002; Gurunathan *et al.*, 2000).
 - Un promoteur eucaryote fort en amont du gène d'intérêt, principalement d'origine virale. Les séquences promotrices du cytomégalovirus (CMV) et du virus du sarcome de Rous (RSV) sont souvent utilisées en raison de leur haut niveau d'expression au sein d'une grande variété de cellules eucaryotes (Dunham, 2002; Gurunathan *et al.*, 2000).
 - Une séquence polyadénylée en aval du gène d'intérêt, afin de stabiliser les séquences d'ARNm transcrites, en codant une queue polyA, permettant de limiter le clivage de la séquence d'intérêt par des RNAses. Les séquences de l'hormone de croissance bovine et du virus simien 40 sont souvent utilisées à cet effet (Dunham, 2002; Gurunathan *et al.*, 2000).
- ❖ Une **unité adjuvante**, permettant la production et la sélection du plasmide, et conférant des propriétés immunologiques indirectes par le biais de motifs CpG (Cytidine-Phosphate-Guanosine), constitués de deux nucléotides non méthylés. Ces motifs sont 20 fois plus fréquents chez les organismes procaryotes que chez les cellules eucaryotes des mammifères et la reconnaissance de ces motifs active directement les lymphocytes B qui prolifèrent et produisent des anticorps. De tels motifs sont des PAMP et sont reconnus par les cellules présentatrices d'antigènes, qui vont les présenter aux lymphocytes T (Gurunathan *et al.*, 2000). Les séquences permettant la production et la sélection des plasmides sont les suivantes :
 - Une origine de réplication (séquence ori), permettant la réplication en grande quantité du plasmide au sein d'une bactérie. La séquence ori la plus utilisée est celle d'*E.coli* :Co1EI des plasmides PUC (Plasmid University of California) car elle permet d'obtenir un grand nombre de copies du plasmide, tout en permettant de conserver un fort rendement de purification (Gurunathan *et al.*, 2000).

- Un gène de résistance aux antibiotiques permet la sélection des bactéries possédant le plasmide contenant la séquence d'intérêt (Gurunathan *et al.*, 2000). En effet, la culture des bactéries sur milieu avec un antibiotique permet aux bactéries possédant le gène de résistance à cet antibiotique de se développer sur ce milieu, tout en éliminant les bactéries ne possédant pas le plasmide. Le gène de résistance le plus utilisé est le gène de résistance à l'ampicilline (Gurunathan *et al.*, 2000).

2.1.2. Production du plasmide à ADN

Les nombreuses recherches effectuées sur l'utilisation de l'ADN en tant qu'outil thérapeutique et de manière plus large sur la thérapie génique, ont permis le développement de nouvelles méthodes biotechnologiques afin d'améliorer la synthèse d'acides nucléiques par les bactéries. En effet, les bactéries porteuses de plasmides présentent un métabolisme plus lent et donc une croissance moins rapide que les bactéries non porteuses de plasmide car la présence d'une structure plasmidique entraîne un détournement de certaines voies métaboliques, au détriment de la croissance bactérienne. La solution apportée consiste à détourner le métabolisme du carbone de la bactérie, afin de l'utiliser dans la production de nucléotides et d'acides aminés et également de réduire la production de sous-produits tels que l'acétate, qui n'influence pas la réplication de l'ADN mais ralentit la croissance cellulaire et contribue ainsi à diminuer indirectement la production d'acides nucléiques et d'acides aminés par les cellules (Passarinha, 2021).

Pour cela, les bactéries ont été modifiées génétiquement afin d'inactiver leur système d'utilisation du glucose (phosphoenolpyruvate carbohydate phosphotransferase system ou PTS system) et de le remplacer par la galactose permease (GalP) et la glucokinase (Gik), deux enzymes permettant d'augmenter la concentration en glucose dans la bactérie en réduisant son transport (Meza *et al.*, 2012; Pablos *et al.*, 2012; Passarinha, 2021). Cela a pour conséquence d'augmenter la disponibilité du phosphoénopyruvate (PEP) pour la synthèse d'ADN plasmidique (Passarinha, 2021; Soto *et al.*, 2011).

D'autres méthodes d'optimisation consistent à modifier les paramètres physico-chimiques du milieu de culture afin d'adapter la production de plasmide :

- ❖ Diminuer le taux de croissance permet d'obtenir un meilleur rendement et des plasmides de meilleure qualité car cela permet de diminuer la production d'acétate, l'instabilité des plasmides et de contrôler la réplication de l'ADN plasmidique (Passarinha, 2021).
- ❖ Des conditions optimales de température, de pH et d'oxygène dissous permettent d'augmenter la production de plasmides surenroulés, plus stables (Passarinha, 2021).
- ❖ L'utilisation d'un milieu minimum (milieu de culture composé uniquement de constituants essentiels à la croissance, sans ajout d'autres substances), permet d'obtenir un nombre plus important de copies du plasmide (Passarinha, 2021).

La production du plasmide se déroule selon les étapes suivantes (Figure 24) :

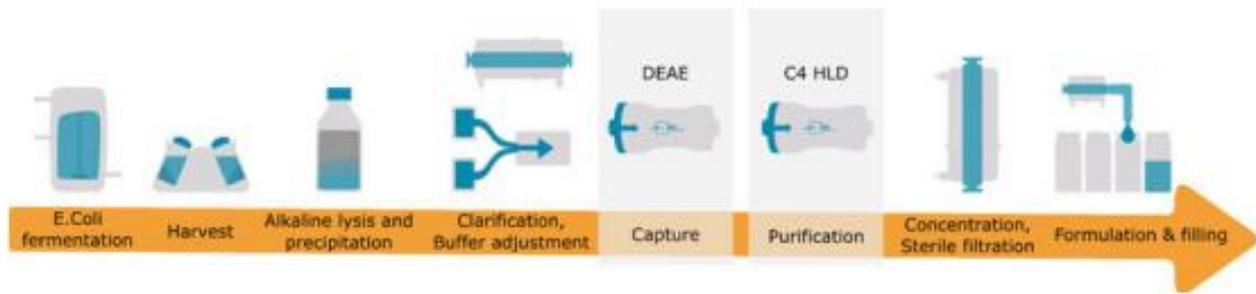


Figure 24 : Schéma de la production de plasmide à ADN selon Passarinha, 2021

- ❖ **Préparation et transformation des cellules compétentes** (cellules capables d'incorporer de l'ADN nu provenant du milieu extérieur) : Durant cette étape, les bactéries sont cultivées dans un premier temps sur un milieu solide, puis mises en suspension dans un milieu de culture liquide. Le but de cette étape est d'obtenir une population bactérienne suffisante pour les étapes suivantes. Les bactéries sont ensuite centrifugées et placées dans un milieu contenant du glycérol (cryoprotecteur), puis le milieu est cryogénisé dans de l'azote liquide. Le plasmide à répliquer est alors ajouté dans le milieu de culture, puis le tout est placé dans une cuvette à électroporation. C'est au cours de cette étape que les bactéries deviennent compétentes. En effet, l'électroporation consiste à créer des pores dans les bactéries grâce à l'application d'un champ électrique, facilitant ainsi le passage de l'ADN plasmidique dans les bactéries. Ce processus est nommé « transformation ». Les bactéries transformées sont finalement cultivées sur milieu contenant un antibiotique pour lequel elles sont résistantes (généralement l'ampicilline), afin d'éliminer les bactéries non transformées (Passarinha, 2021).
- ❖ **Biosynthèse du plasmide à ADN** : Cette étape est l'étape principale, elle consiste à placer les bactéries transformées dans un milieu contenant les constituants nécessaires à leur développement et favorable à la réplication de l'ADN. Les bactéries sont cultivées dans un milieu minimum et sont récupérées environ 14h après la phase d'accélération, soit à la fin de la phase exponentielle (phase où la quantité d'ADN est maximale) (Passarinha, 2021).
- ❖ **Lyse alcaline, quantification et purification** : Cette étape consiste à lyser les bactéries obtenues à l'étape précédente à l'aide d'un tampon de lyse. L'échantillon est laissé 5 minutes à température ambiante afin de laisser précipiter les débris cellulaires et les protéines. La centrifugation permet enfin d'obtenir un échantillon contenant l'ADN plasmidique, qui sera quantifié et purifié par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'échantillon purifié sera ensuite concentré afin de produire le plasmide en quantité importante (Passarinha, 2021).
- ❖ **Analyse qualitative de l'ADN plasmidique** : La qualité du plasmide obtenu ainsi que la proportion en isoformes du plasmide est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose (Passarinha, 2021).

2.1.3. Caractéristiques principales des vaccins à ADN

Les vaccins à ADN possèdent de nombreuses caractéristiques ayant suscité l'intérêt de nombreux chercheurs dans l'optique de leur utilisation comme nouveaux outils prophylactiques et thérapeutiques. Ces caractéristiques constituent autant d'atouts permettant d'améliorer les technologies vaccinales que d'obstacles à leur utilisation à grande échelle. Ces caractéristiques sont les suivantes et sont récapitulées dans le *Tableau VIII* :

Tableau VIII : Principales caractéristiques des vaccins à ADN selon Dunham, 2002

Caractéristiques	Description
Versatilité	Possibilité de produire des vaccins contre plusieurs organismes pour lesquels il n'existe pas de vaccin conventionnel Possibilité de créer des vaccins "designers" utilisés comme vaccins DIVA ou pour éliminer les antigènes pouvant compromettre la réponse immunitaire de l'hôte Peuvent être utilisés pour détecter des antigènes immunoprotecteurs
Administration	Injection par voie intramusculaire ou intradermique. Administration par des systèmes d'injection sans aiguille Administration encore souvent sub-optimale
Propriétés adjuvantes intrinsèques	ADN bactérien non méthylé contenant des séquences immunostimulatrices (motifs CpG)
Induction d'une variété de réponses immunitaires	Possibilité d'induire une réponse humorale, cellulaire et/ou muqueuse Induction d'une réponse lymphocyte T mémoire Immunité peut être modulée pour favoriser la mise en place d'une réponse humorale ou cellulaire
Coût	Potentiellement peu coûteux à produire et à administrer Pas de nécessité de mise en place d'une chaîne du froid pour le stockage et la distribution du vaccin
Innocuité	Pas de réversion au phénotype virulent possible Absence de réactions au site d'injection Pas de preuve d'insertion du plasmide vaccinal dans le génome de l'hôte vacciné disponible Ne nécessite pas d'agent pathogène dangereux pour sa production

- ❖ **Versatilité** : Les vaccins à ADN sont des vaccins simples à produire et peu onéreux. Ils peuvent être utilisés pour induire une immunisation active contre de nombreux agents pathogènes pour lesquels des vaccins conventionnels sont impossible à produire, pour identifier de nouveaux antigènes capables d'induire une protection immunitaire ou même pour produire des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. De plus, ces vaccins sont entièrement modifiables (Dunham, 2002; M. A. Liu, 2003; Robinson & Torres, 1997).
- ❖ **Propriétés immunologiques intrinsèques** : Le plasmide à ADN est d'origine bactérienne et possède un profil de méthylation différent des organismes eucaryotes (motifs CpG), qui sont reconnus par le système immunitaires des animaux vaccinés (Dunham, 2002; Gurunathan *et al.*, 2000; Robinson & Torres, 1997). Les vaccins à ADN sont également capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire, humorale et même muqueuse (Beláková *et al.*, 2007; Dunham, 2002; Ghaffarifar, 2018; Gurunathan *et al.*, 2000; M. A. Liu, 2003; Robinson & Torres, 1997). La grande versatilité des plasmides à ADN et leur modification permet même de favoriser une réponse immunitaire par rapport à une autre (Dunham, 2002).

❖ **Innocuité** : L'utilisation des vaccins à ADN a soulevé de nombreuses inquiétudes concernant leur sécurité d'emploi :

- La possibilité de l'intégration du plasmide à ADN au génome de l'animal vacciné, qui pourrait désactiver un gène onco-suppresseur ou à l'inverse activer un proto-oncogène, ce qui conférerait aux vaccins à ADN un pouvoir mutagène (Beláková *et al.*, 2007; Myhr, 2017). Les études actuelles ne montrent aucune preuve d'intégration du plasmide au sein du génome de l'animal vacciné, cependant les techniques d'étude génomique ne sont à ce jour pas assez sensibles et spécifiques pour donner une réponse claire à cette question (Beláková *et al.*, 2007).
- Le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques inclus dans le plasmide vaccinal, et par extension la possibilité de favoriser l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques. En effet, le plasmide injecté peut être retrouvé à distance du point d'injection par le biais de cellules vectrices (lymphocytes et macrophages), qui peuvent ainsi diffuser le gène de résistance aux antibiotiques dans l'organismes. Cependant, les études n'ont pas mis en évidence la présence d'un tel phénomène à ce jour et des techniques d'amélioration telles que l'utilisation d'ADN mini-cercle permettent de limiter ce phénomène ainsi que l'intégration du plasmide dans le génome de l'animal (Beláková *et al.*, 2007).
- L'induction de maladies auto-immunes ciblant soit l'ADN plasmidique par le biais d'anticorps anti-ADN, ou ciblant les cellules animales ayant reçu le plasmide vaccinal par le biais d'une réaction d'hypersensibilité de type I (Marshall *et al.*, 2018). Des études ont montré que l'injection du vaccin à ADN est capable d'induire la production d'anticorps anti-ADN mais en quantité insuffisante pour entraîner une maladie auto-immune. En revanche, la présence de motifs CpG sur le plasmide bactérien est capable d'induire des signes cliniques importants chez des sujets expérimentaux, lorsqu'ils sont injectés conjointement avec des auto-antigènes comme la protéine basique de la myéline (des encéphalomyélites ont été observées) ou des antigènes dérivés de *Chlamydia* (myocardites). Cependant, ces effets secondaires ne sont pas retrouvés chez les animaux vaccinés et en pleine santé lors des essais cliniques (Beláková *et al.*, 2007).
- La synthèse et la libération de cytokines capables de perturber l'homéostasie du système immunitaire de l'animal vacciné. D'un point de vue théorique, l'utilisation de gènes codant pour des cytokines pourrait être à l'origine d'une altération de l'homéostasie de l'hôte en augmentant la sensibilité de son système immunitaire aux infections, le rendant plus vulnérable aux agents pathogènes. Il a été démontré que la libération des cytokines était localisée et ne permettait pas d'obtenir une perturbation de l'homéostasie à l'échelle de l'organisme. En outre, les niveaux sériques de cytokines restent inchangés (Beláková *et al.*, 2007).

- L'induction d'une tolérance au lieu d'une immunité active. La tolérance se définit comme l'incapacité d'un individu à développer une réaction immunitaire quand il est mis en contact avec un antigène. Ce phénomène n'est pas une spécificité des vaccins à ADN mais peut être également à l'origine d'échecs vaccinaux pour tous les types de vaccins. L'âge de l'individu et son niveau d'immunocompétence sont deux facteurs importants dans la mise en place d'un phénomène de tolérance (Chatenoud, 2007). En effet, les individus jeunes (avec un système immunitaire encore incomplet), ainsi que les individus âgés (avec un système immunitaire moins performant), sont capables de développer une tolérance aux vaccins à ADN et induisent une réponse immunitaire insuffisante. Le système immunitaire des jeunes individus n'acquiert sa capacité à reconnaître des molécules immunostimulatrices exogènes que quelques semaines après la naissance, or, les vaccins à ADN permettent la production d'un antigène produit par la machinerie cellulaire propre à l'individu et peut être reconnu par le système immunitaire immature comme faisant partie du soi, diminuant ainsi la capacité à développer une immunisation contre cet antigène (Mor & Eliza, 2001). Ce phénomène est problématique chez les jeunes sujets car le phénomène de tolérance peut durer longtemps, favorisant ainsi le risque d'échec vaccinal. Il est donc important d'adapter les protocoles vaccinaux chez ces deux populations afin de vacciner les nouveau-nés lorsque leur système immunitaire est suffisamment mature et de combiner les vaccins à ADN avec des adjuvants et des molécules co-stimulatrices pour stimuler la réponse immunitaire chez les individus âgés (Beláková *et al.*, 2007).

Les vaccins à ADN présentent *a priori* une innocuité les rendant sûrs d'utilisation, cependant, il existe encore certaines zones d'ombres, nécessitant la mise en place d'un système de régulation par les autorités compétentes. L'agence européenne des médicaments (EMA) a mis en place des *guidelines* en 2001, constamment mises à jour, destinées aux laboratoires producteurs et aux professionnels utilisateurs de ces vaccins afin de limiter l'impact environnemental et sur la santé humaine et animale. La Food and Drug Administration a également mis en place ses propres *guidelines* destinées au marché américain en 2007 (Myhr, 2017; Research, 2019).

2.1.4. Technologies d'amélioration des vaccins à ADN

Les vaccins à acides nucléiques induisent une immunité suffisante chez des animaux de petite taille (notamment les souris utilisées en expérimentation), mais insuffisante quand ils sont administrés chez l'Homme ou chez des animaux de taille plus conséquente. Il est donc essentiel de les combiner avec des adjuvants afin d'augmenter la réponse immunitaire et ainsi d'assurer une immunisation efficace contre les agents pathogènes (Dunham, 2002; Ghaffarifar, 2018). Il existe plusieurs technologies d'amélioration des vaccins à ADN : l'optimisation du plasmide, l'amélioration des adjuvants via l'utilisation d'adjuvants conventionnels (similaires aux adjuvants utilisés pour les vaccins conventionnels) ou d'adjuvants génétiques (se basant sur la modification du plasmide afin de produire des molécules co-stimulatrices) et l'amélioration de l'adressage du vaccin à ADN.

2.1.4.1. Optimisation du plasmide à ADN

2.1.4.1.1. Optimisation des codons

Un codon est un ensemble de 3 ribonucléotides reconnus par l'ARNt lors de la traduction ayant lieu dans les ribosomes. Le biais d'usage des codons définit l'utilisation préférentielle d'un type de codon plutôt qu'un autre afin de produire le même acide aminé. Ce biais varie grandement entre espèces, familles et groupes au sein du même règne (Parvathy *et al.*, 2022). L'usage des codons est en effet très variable entre les agents pathogènes et les mammifères et l'optimisation des codons correspond à l'utilisation préférentielle de ces codons adaptée aux organismes eucaryotes afin d'améliorer l'expression du gène inclus dans le plasmide. Ce processus est aujourd'hui réalisé par des algorithmes. Des études montrent que l'optimisation des codons permet d'induire une meilleure réponse des lymphocytes T CD8+, cependant, les résultats de cette optimisation sont aléatoires : pour certains vaccins la réponse immunitaire est améliorée et aucune efficacité n'est constatée pour d'autres vaccins. Une explication avancée est que l'utilisation préférentielle d'un codon synonyme pourrait modifier la conformation et la fonction de la protéine finale. Il a également été démontré que la séquence originelle de l'agent pathogène permet d'induire une meilleure réponse immunitaire par le biais d'une meilleure reconnaissance par les PRR (L. Li & Petrovsky, 2016).

2.1.4.1.2. Optimisation du promoteur

L'expression du plasmide à ADN est régulée par un promoteur faisant intervenir l'ADN polymérase II (ADN Pol II). Ces promoteurs ne sont pas des promoteurs forts, à l'inverse des promoteurs viraux présents chez le cytomégalovirus (CMV) ou chez le Virus Simien 40 (SV40). Le remplacement du promoteur Pol II par un promoteur viral comme celui du CMV permet d'obtenir une meilleure expression du gène, augmentant ainsi la quantité d'antigène traduit, et donc augmentant la réponse immunitaire (L. Li & Petrovsky, 2016; S. Wang *et al.*, 2006). Cependant, ces promoteurs viraux sont sensibles à certaines cytokines produites fréquemment lors d'inflammation chez les animaux (TNF α et IFN- γ), diminuant ainsi leur capacité à induire l'expression des gènes plasmidiques. Des promoteurs forts comme le promoteur du CMH-II permettent de contourner cet obstacle avec une expression moindre que le promoteur viral du CMV, qui reste le promoteur de référence. Des recherches sur des alternatives à ce promoteur permettraient d'améliorer l'efficacité des vaccins à ADN (L. Li & Petrovsky, 2016).

2.1.4.1.3. Optimisation du squelette du plasmide

Les plasmides à ADN utilisés sont d'origine bactérienne et contiennent donc de nombreuses séquences qui sont susceptibles d'induire des réactions auto-immunes et également de diminuer l'expression de l'antigène vaccinal. En effet, des études sur le plasmide pcDNA3.1 (plasmide encodant un gène de résistance à l'ampicilline) ont montré que le remplacement du gène de résistance à l'ampicilline par un gène de résistance à la kanamycine entraînait des réactions auto-immunes chez les souris (vitiligo) (L. Li & Petrovsky, 2016; Zhou *et al.*, 2011). Il existe également de nombreuses séquences redondantes dans le génome bactérien et retirer ces séquences permet de limiter la taille du plasmide et ainsi de pouvoir insérer des séquences d'ADN plus grandes dans le plasmide (L. Li & Petrovsky, 2016).

Une technologie a été mise au point afin de supprimer totalement les éléments bactériens du plasmide : il s'agit de l'ADN mini-cercle. Le mécanisme de production de l'ADN mini-cercle est illustré par la Figure 25 :

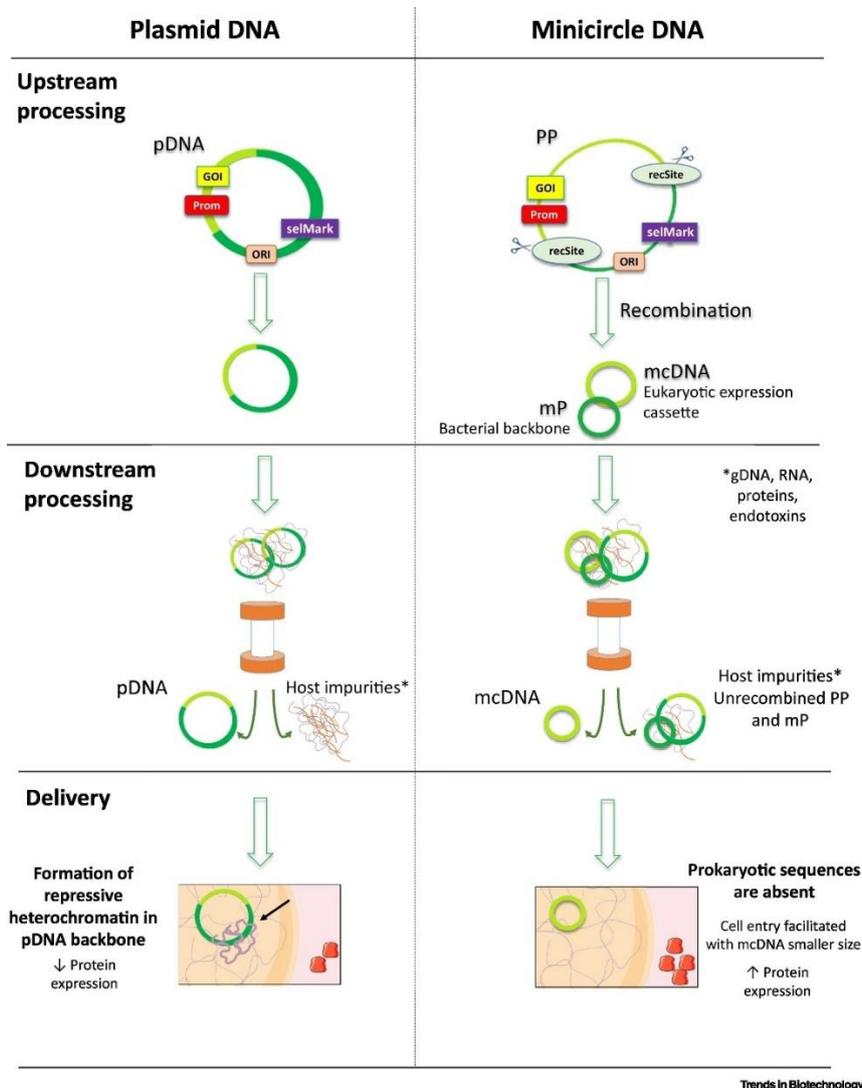


Figure 25 : Comparaison entre la production de plasmide ADN et d'un plasmide à ADN mini-cercle selon Almeida et al., 2020

Le plasmide parent (PP) est une structure similaire aux plasmides vaccinaux mais contenant des sites de recombinaisons (att, loxP, MRS ou attP/attB) qui peuvent être reconnues par des recombinases. Les recombinaisons résultent en la production d'ADN mini-cercle (mcDNA), vecteur d'expression eucaryote, ainsi que de nombreuses autres recombinaisons non utilisées (mP) (Almeida et al., 2020).

L'ADNmc possède de nombreux avantages : il permet d'induire une meilleure réponse T CD8+, d'entrer plus facilement dans les cellules eucaryotes et ainsi d'augmenter l'expression de l'antigène vaccinal et il est dépourvu de séquences immunogènes capable d'induire des effets secondaires indésirables. Pour toutes ces raisons, l'ADNmc forme un meilleur vecteur que le vecteur plasmidique bactérien natif pour les vaccins à ADN (Almeida et al., 2020; L. Li & Petrovsky, 2016).

Une autre technologie mise au point repose sur la synthèse d'un vecteur d'ADN linéaire ne contenant que des séquences essentielles à l'expression du gène d'intérêt et à la stabilisation de l'ARNm en résultant. Cette technologie est dénommée MIDGE pour Minimalistic, Immunological Defined Gene Expression. Un plasmide bactérien, comme le plasmide pMOK-Luc codant la luciférase d'une luciole (de nombreux autres plasmides peuvent être utilisés), qui comprend une séquence de transcription, un gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplication, peut être utilisé pour former ce vecteur MIDGE. Deux séquences essentielles vont permettre la synthèse de ce vecteur : il s'agit des sites de restriction BamHI et EcoRI entourant la séquence transcriptionnelle. Après utilisation des enzymes de restriction BamHI et EcoRI, le squelette plasmidique ne contenant pas le gène d'intérêt est éliminé et il ne reste plus que la séquence transcriptionnelle, sous forme d'ADN linéaire. La structure obtenue est stabilisée par l'addition de deux séquences en tête d'épingle aux extrémités 5' et 3' de la séquence transcriptionnelle, grâce à l'ADN polymérase T7. Le vecteur MIDGE ainsi obtenu est purifié par chromatographie par échange d'anions (Figure 26). L'utilisation d'un vecteur MIDGE permet de limiter la séquence aux gènes essentiels à la transcription de l'antigène, d'origine eucaryote et sans motifs CpG, favorisant ainsi l'expression du vecteur, limitant l'utilisation d'antibiotiques pour la sélection et permettant de réduire la taille du plasmide (Schakowski *et al.*, 2007).

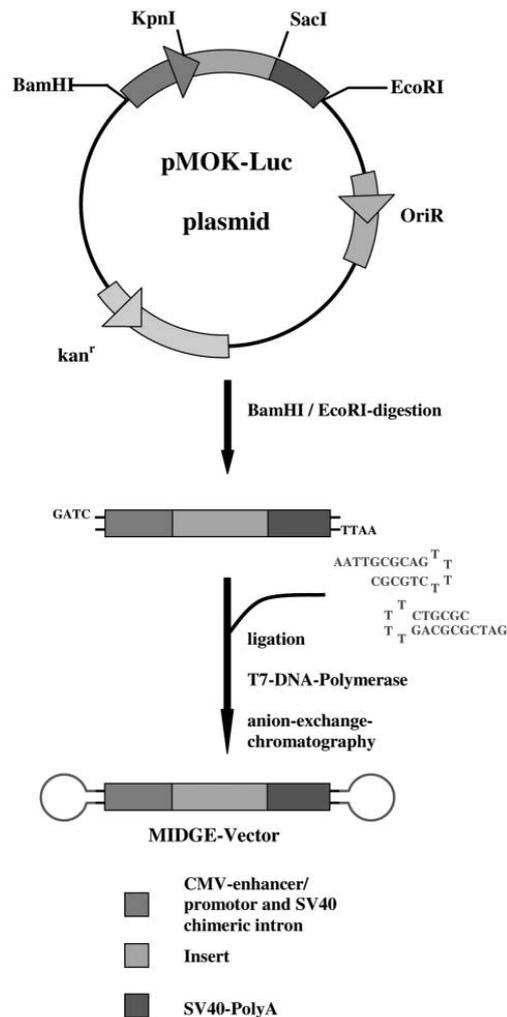


Figure 26 : Schéma de synthèse du vecteur MIDGE selon Schakowski *et al.*, 2007

2.1.4.2. Adjuvants conventionnels

Les adjuvants conventionnels sont nombreux, mais ce sont les sels d'aluminium qui sont principalement utilisés comme adjuvants pour les vaccins à ADN. Les sels d'aluminium sont des adjuvants permettant d'induire une meilleure réponse humorale. Les principaux sels d'aluminium utilisés sont l'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$) et le phosphate d'aluminium (AlPO_4) et présentent une bonne innocuité chez l'Homme selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Leur mécanisme d'action est cependant différent quand ils sont combinés avec les vaccins à ADN : en effet, les sels d'aluminium nécessitent d'être absorbés sur les protéines des vaccins conventionnels afin d'améliorer la réponse immunitaire, alors que l'absorption sur le plasmide à ADN diminue leur efficacité. Il est donc nécessaire d'éviter l'absorption des sels d'aluminium en privilégiant les sels d'aluminium ayant une charge électrique négative (l'ADN ayant une charge électrique globale négative, les sels d'aluminium avec une charge positive s'adsorbent sur le plasmide) (Ghaffarifar, 2018; J. Lee *et al.*, 2018).

2.1.4.3. Adjuvants génétiques

Les adjuvants génétiques sont des séquences d'ADN contenant des molécules immunomodulatrices, insérées dans un plasmide. L'expression de ces molécules permet d'améliorer la qualité de la réponse immunitaire et ainsi d'induire une immunité protectrice (Scheerlinck, 2001).

2.1.4.3.1. Immunomodulation par des gènes codant des cytokines

L'utilisation des cytokines en tant qu'adjuvant conventionnel a été limitée par deux principaux obstacles : leur coût de production élevé et la nécessité de répéter les injections pour obtenir une réponse immunitaire suffisante. L'utilisation et l'incorporation de gènes codant des cytokines à des plasmides bactériens permet de contourner ces deux obstacles. De nombreuses cytokines ont été testées au cours des années et certaines ont été retenues :

- ❖ Le **GM-CSF** (« Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages », facteur de croissance des granulocytes et des monocytes) est l'un des adjuvants génétiques les plus étudiés (Dunham, 2002; Scheerlinck, 2001; Tregoning & Kinnear, 2014). De nombreuses études ont montré que cette cytokine était capable d'améliorer la réponse humorale. Elle n'a que peu d'influence sur les réponses Th mais est capable d'améliorer la réponse CTL (lymphocytes cytotoxiques) (Scheerlinck, 2001). Cependant, la date d'injection du plasmide contenant le gène codant le GM-CSF peut influencer le type de réponse Th : l'injection du plasmide contenant l'adjuvant génétique 3 jours avant le plasmide à ADN permet d'obtenir une réponse Th2, alors que l'injection de ce plasmide 3 jours après le plasmide à ADN permet d'obtenir une réponse Th1 (Kusakabe *et al.*, 2000; Scheerlinck, 2001). Le mécanisme d'action du GM-CSF est partiellement connu mais on pense que l'accumulation de GM-CSF après expression de l'ADN du plasmide contenant l'adjuvant génétique attire les cellules dendritiques au point d'injection et permet d'améliorer la présentation de l'antigène traduit après expression du plasmide à ADN vaccinal (Haig *et al.*, 1995; Scheerlinck, 2001). Cet adjuvant est entré en phase d'essai clinique et les premiers résultats montrent une innocuité acceptable mais une immunogénicité modérée (Tregoning & Kinnear, 2014).

- ❖ Les **cytokines induisant une réponse Th1** tels que les IFN- γ et les IL-2, IL-23, IL-15 et IL-18 n'amplifient étonnamment pas la réponse Th1 mais sont capables d'améliorer la réponse CTL lorsqu'elles sont injectées avec les vaccins à ADN (Scheerlinck, 2001). L'IL-12 est l'une des cytokines induisant une réponse Th1 les plus importantes : son utilisation dans des essais cliniques en l'incorporant son gène dans le plasmide vaccinal, afin d'améliorer un vaccin à ADN contre *Toxoplasma gondii* peu immunogène a permis d'augmenter les taux de survie des individus vaccinés (L. Li & Petrovsky, 2016; Zhao *et al.*, 2013).
- ❖ Les **cytokines induisant une réponse Th2** telles que les IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, sont quant à elles capables de favoriser les réactions immunitaires humorales permettant de produire une grande quantité d'anticorps totaux et notamment des IgG1 quand le plasmide contenant l'adjuvant génétique est co-injecté avec le vaccin à ADN (Scheerlinck, 2001).

Les plasmides codant des cytokines sont des adjuvants génétiques prometteurs pour les vaccins ADN. En effet, ils permettent d'améliorer la réaction immunitaire de façon modérée car l'expression du gène codant les cytokines est continue, ce qui permet de contourner le problème de faible demi-vie des cytokines lorsqu'elles sont injectées seules. De plus, l'expression du gène codant les cytokines se fait localement au point d'injection et permet d'éviter un emballement de la réaction immunitaire (L. Li & Petrovsky, 2016).

2.1.4.3.2. Immunomodulation par des plasmides encodant des molécules « signal de danger »

Les gènes codant des molécules « signal de dangers » inclus dans le plasmide permettent d'améliorer l'immunogénicité du vaccin à ADN en améliorant notamment la présentation de l'antigène aux cellules appropriées. Par exemple, en ajoutant à la séquence plasmidique codant l'antigène le gène codant la protéine ubiquitine, le complexe antigène-ubiquitine sera préférentiellement adressé aux protéasomes, ce qui aura pour effet d'accélérer la dégradation intracytoplasmique de l'antigène, améliorant ainsi la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8⁺ (Beláková *et al.*, 2007).

Les études effectuées ces dernières années ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation immunitaire. Certaines molécules intervenant dans ces voies de signalisation ont été identifiées et testées comme adjuvants génétiques. C'est le cas des molécules TRIF (« TIR-domain-containing-adaptor-inducing interferon- β », molécule produite en réponse à l'activation des TLR) et HMGB1 (« High Mobility Group Box », protéine nucléaire capable de se fixer à l'ADN), qui ont été utilisées comme adjuvants génétiques et ont permis une amélioration de la réponse immunitaire (L. Li & Petrovsky, 2016).

2.1.4.3.3. ARN interférents

Le phénomène d'interférence est un mécanisme post-transcriptionnel perturbant la transcription de certains gènes. En reconnaissant certaines structures d'ARN appelées « short hairpin RNA » (shARN) ou « petits ARN en épingle à cheveux », l'ARN interférent dégrade ces shARN, diminue leur traduction par les ribosomes, ainsi que la transcription du gène (Haiyong, 2018; L. Li & Petrovsky, 2016). Ce phénomène biologique a par la suite été détourné afin d'inactiver des gènes lors d'études. L'introduction d'un gène codant un shARN dans le plasmide vaccinal permet d'augmenter l'immunogénicité en inactivant des gènes régulant négativement la réponse immunitaire : par exemple, l'inactivation du gène codant la caspase 12, un médiateur impliqué dans l'initiation de l'apoptose, est induite par l'injection du vaccin à ADN, permettant ainsi l'expression du plasmide en plus grande quantité et favorisant la mise en place d'une réponse humorale et cellulaire (L. Li & Petrovsky, 2016).

L'utilisation de ces ARN interférents pour inactiver les gènes inhibant l'expression du plasmide vaccinal présente des résultats prometteurs, notamment pour les vaccins à ADN contre les cancers, cependant, aucune donnée n'est encore disponible concernant son innocuité (L. Li & Petrovsky, 2016).

2.1.4.4. Amélioration de l'adressage du vaccin à ADN

Les cellules transfectées principalement par les vaccins à ADN sont des cellules musculaires. Cela constitue un problème car les cellules musculaires ne présentent pas l'antigène convenablement en raison d'un manque de co-stimulation. Il a fallu améliorer l'adressage du plasmide aux cellules présentatrices d'antigène, notamment aux cellules dendritiques, afin d'améliorer les vaccins à ADN. Il existe deux approches (L. Li & Petrovsky, 2016) :

- ❖ **Adressage cellulaire** : Le principe est de transfecter directement les cellules dendritiques avec le plasmide vaccinal *ex vivo* puis d'injecter les cellules transfectées à l'animal. Des essais ont été réalisés sur les souris ayant reçu des cellules dendritiques transfectées par des plasmides contenant des gènes codant pour le récepteur aux chimiokines CCR7 et ont montré que ces cellules dendritiques migraient vers les nœuds lymphatiques (Chen *et al.*, 2013; L. Li & Petrovsky, 2016). Étant donné le coût important des vaccins à ADN utilisant les cellules dendritiques, ces vaccins sont surtout destinés à devenir des vaccins thérapeutiques contre les cancers (L. Li & Petrovsky, 2016).

D'autres cellules peuvent également être ciblées : en ajoutant au plasmide des gènes codant des protéines impliquées dans l'adressage ou des polymères, comme la queue lipophile d'une protéine de liaison à l'albumine, le plasmide à ADN était directement adressé aux cellules dendritiques (L. Li & Petrovsky, 2016).

- ❖ **Adressage sub-cellulaire** : Une autre méthode d'adressage permettant d'améliorer la prise en charge ainsi que la présentation de l'antigène consiste à cibler directement les organites des cellules. En effet, en ajoutant au plasmide à ADN la protéine E1A provenant d'un Adénovirus, la structure était directement adressée au réticulum endoplasmique des cellules de l'animal. Un résultat similaire est observé avec l'utilisation de LAMP (Lysosomal-Associated Membrane Protein), qui permet l'adressage du plasmide aux lysosomes. L'association E1A-LAMP permet même l'adressage simultané du plasmide au réticulum endoplasmique ainsi qu'aux lysosomes (Freitas *et al.*, 2014; L. Li & Petrovsky, 2016).

2.2. Mécanismes d'action des vaccins à ADN

2.2.1. Internalisation et prise en charge du plasmide à ADN

Une fois injecté, le plasmide à ADN va être pris en charge de différentes façons : une grande partie d'ADN injecté se retrouve dans la circulation sanguine et est dénaturée. Les molécules d'ADN restantes sont prises en charge par les myocytes (si l'injection est intramusculaire), les kératinocytes (si l'injection est sous-cutanée) ou directement par les cellules dendritiques résidant dans les tissus. La prise en charge du plasmide par les cellules dendritiques permet la présentation directe de l'antigène vaccinal alors que la prise en charge par les cellules somatiques (kératinocytes et myocytes) nécessite des étapes intermédiaires aboutissant à la présentation de l'antigène couplé au CMH-I, aux cellules dendritiques, qui vont-elles-mêmes présenter l'antigène aux cellules immunitaires (Beláková *et al.*, 2007; L. Li & Petrovsky, 2016) .

Les mécanismes précis concernant l'internalisation du plasmide à ADN ne sont pas parfaitement connus mais des hypothèses ont été avancées et mettent en avant l'endocytose, selon trois modalités : endocytose médiée par les vésicules de clathrine, endocytose médiée par les cavéoles, micropinocytose (J. Lee *et al.*, 2018; Tregoning & Kinnear, 2014).

Une fois internalisé, le plasmide à ADN transite jusqu'au noyau de la cellule sous forme d'ADN nu ou intégré dans une vésicule associée au cytosquelette. Durant son trajet dans le cytoplasme, l'ADN peut être dégradé par des DNases, rendant ainsi le vaccin moins efficace. L'ADN rejoint alors le noyau, qui constitue une barrière difficile à franchir, (il est estimé que moins de 0.1% de l'ADN entrant dans le cytosol de la cellule passe dans le noyau et est transcrit (Capecchi, 1980)) cependant, deux éléments sont susceptibles de favoriser l'entrée du plasmide dans le noyau : il s'agit de la mitose ou de la présence de pores nucléaires, qui désorganisent la membrane nucléaire et favorisent le passage des molécules (Tregoning & Kinnear, 2014).

C'est au cours de l'étape de passage au noyau de la cellule que les modifications apportées à la structure du plasmide vont jouer un rôle important : en effet, l'ADN surenroulé, par sa petite taille peut transiter plus facilement à travers les pores nucléaires. Le couplage d'ADN à des protéines nucléaires (comme les facteurs de transcription) permet également de faciliter l'entrée du plasmide dans le noyau (Tregoning & Kinnear, 2014).

Le plasmide, désormais à l'intérieur du noyau, nécessite d'être transcrit, puis traduit. C'est à cette étape que le choix du promoteur, ainsi que le choix d'usage des codons vont être cruciaux et permettre d'améliorer l'expression du plasmide à ADN et ainsi l'efficacité du vaccin (Tregoning & Kinnear, 2014).

2.2.2. Induction de l'immunité innée

L'induction de l'immunité innée se fait selon plusieurs modalités. Une fois le plasmide à ADN internalisé, de nombreuses voies de transduction interviennent (Figure 27) :

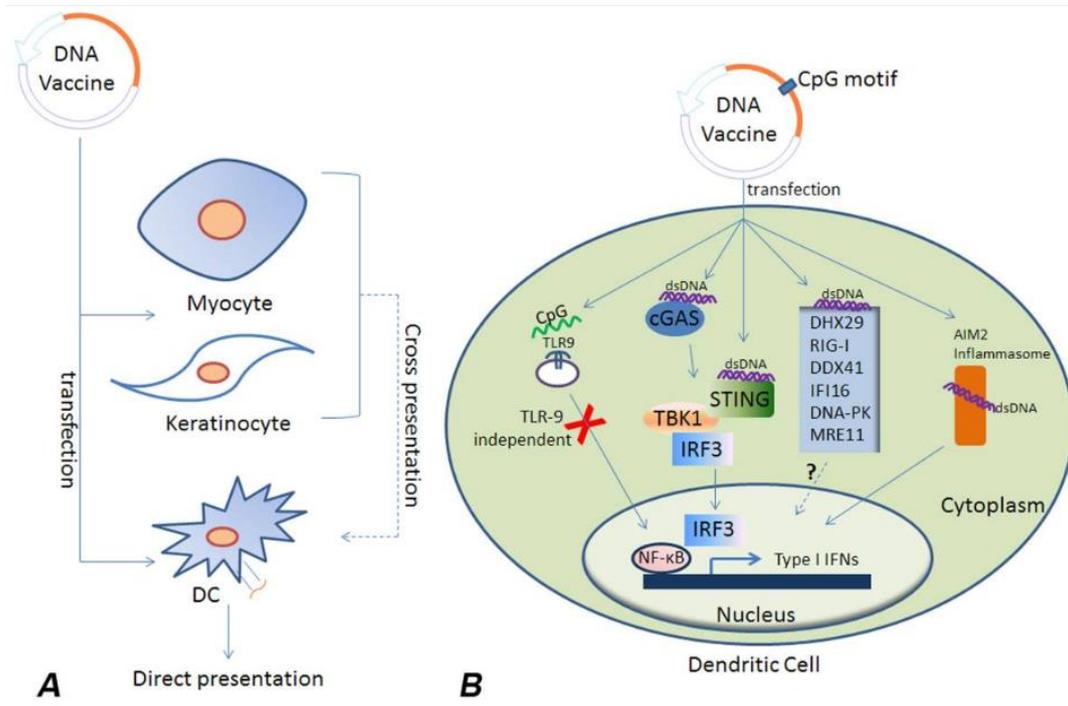


Figure 27 : Induction de l'immunité innée par les vaccins à ADN selon L. Li & Petrovsky, 2016

- ❖ La présence de motifs CpG non méthylés sur le plasmide à ADN est reconnue par des PRR, les TLR-9, qui entraînent l'activation d'une cascade dépendante de la protéine MyD88 (Myeloid Différenciation primary response 88), qui induit l'activation du facteur de transcription NF-κB, qui régule l'expression du gène codant des interférons de type I. Les motifs CpG jouent un rôle important dans l'induction d'une immunité innée médiée par les vaccins à ADN, cependant, ils ne sont pas indispensables car d'autres voies de transduction existent (L. Li & Petrovsky, 2016; Tregoning & Kinnear, 2014).
- ❖ Après reconnaissance d'ADN double brin, la cGAS (cyclic-GMP-AMP synthase) active STING, une protéine stimulatrice des gènes codant des interférons, qui va activer des kinases (IKK et TBK1), à l'origine de la phosphorylation d'IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3), qui migre dans le noyau et module l'expression des interférons de type I (L. Li & Petrovsky, 2016; Tregoning & Kinnear, 2014).
- ❖ DHX29, RIG-I, des hélicases, sont capables de détecter de l'ADN dans le cytosol et contribueraient d'une manière inconnue à l'action des vaccins à ADN. DDX41, IFI16, DNA-PK et MRE11 joueraient le même rôle de détecteurs que DHX29 et RIG-I et sont étudiées afin d'améliorer les vaccins à ADN (L. Li & Petrovsky, 2016).
- ❖ Une autre voie importante faisant appel à AIM2, un important détecteur à ADN intracytosolique, induit l'activation de l'inflammasome et l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires quand il reconnaît de l'ADN double brin (L. Li & Petrovsky, 2016).

Toutes ces voies de transduction aboutissent à la production d'interférons de type I ou de cytokines, à l'origine d'une stimulation des cellules immunitaires impliquées dans la mise en place de l'immunité adaptative.

2.2.3. Induction de l'immunité adaptative

Le type d'immunité adaptative induit est étroitement corrélé au type de cellule transfectée par le plasmide à ADN (kératinocyte, myocyte ou cellule dendritique). Il existe de nombreux facteurs permettant d'influencer le type de cellule transfectée comme l'utilisation d'adjuvants permettant d'améliorer l'adressage du plasmide ou la méthode d'administration du vaccin (Tregoning & Kinnear, 2014).

En effet, si les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques sont directement transfectées, le plasmide à ADN est internalisé, transcrit puis traduit en antigène, qui va être présenté avec les molécules du CMH-I, induisant alors une **réponse cytotoxique** par le biais des lymphocytes T CD8+ (Tregoning & Kinnear, 2014).

Dans le cas d'une transfection des cellules somatiques (kératinocytes et myocytes), il existe trois possibilités (Figure 28 et Figure 29) :

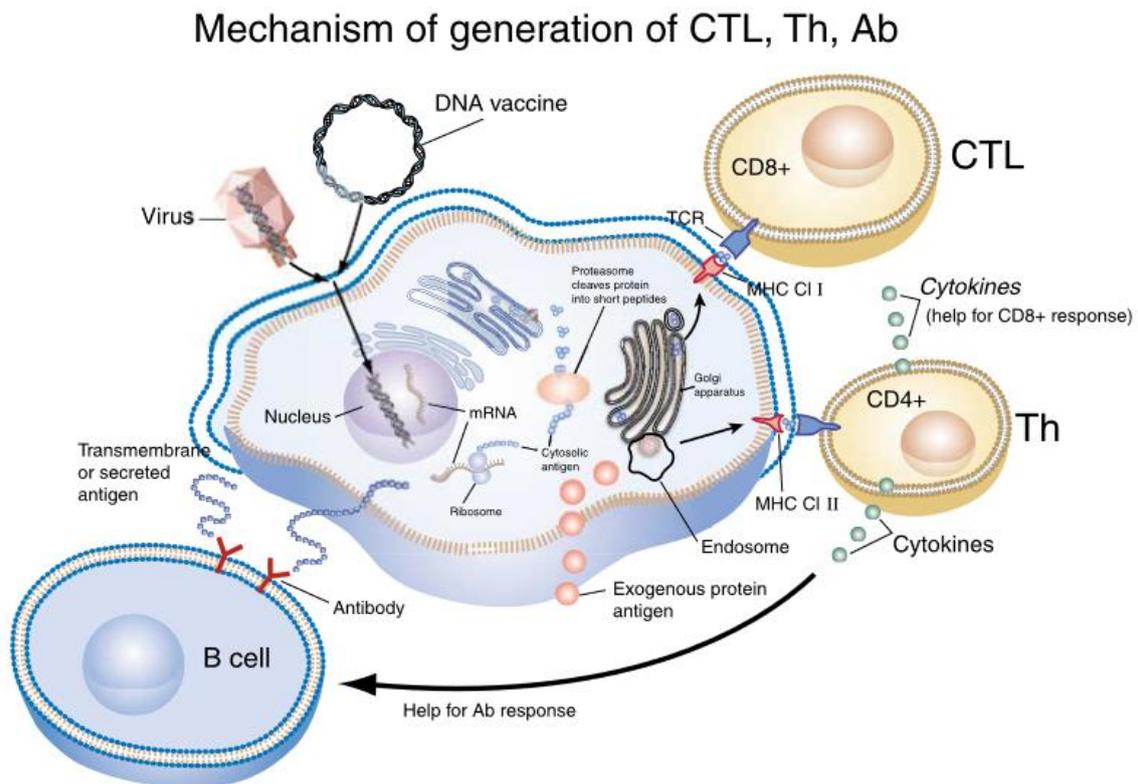


Figure 28 : Mécanisme d'induction des différentes réponses immunitaires adaptatives par les vaccins à ADN selon M. A. Liu, 2003

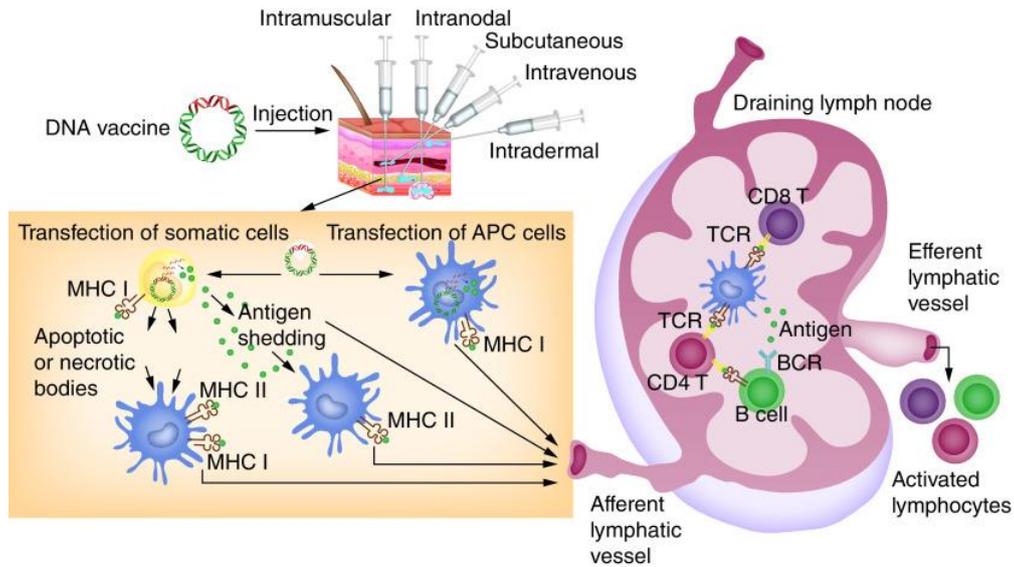


Figure 29 : Mécanismes d'induction de la réponse immunitaire adaptative selon Shafaati et al., 2021

- ❖ L'induction d'une **réponse cytotoxique CD8+** par la présentation de l'antigène avec le complexe CMH-I de la cellule somatique. L'activité cytotoxique entraîne la mort de la cellule somatique, ce qui peut diminuer l'expression du plasmide et donc l'immunogénicité du vaccin (Tregoning & Kinnear, 2014). Cependant, ces cellules ne possèdent pas de molécules de costimulation nécessaires à la mise en place d'une activité cytotoxique, ce qui rend ce mécanisme moins probable (M. A. Liu, 2003).
- ❖ L'internalisation du plasmide, son expression et la traduction de l'ARNm en antigène, qui sera sécrété et reconnu par les CPA ou les lymphocytes B. Les CPA présentent à leur tour l'antigène avec les molécules du CMH-II. Le complexe est reconnu par les lymphocytes T CD4+, induisant une **réponse Th**. La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B est à l'origine de la **production d'anticorps** (M. A. Liu, 2003; Tregoning & Kinnear, 2014).
- ❖ La mort de la cellule somatique transfectée permet la libération de l'antigène, qui est internalisé dans les CPA puis est présenté sur le CMH-I en suivant le mécanisme de présentation croisée. Ce phénomène de présentation croisée se traduit par la présentation indirecte de l'antigène par une CPA après intervention d'une cellule somatique en tant qu'intermédiaire (Tregoning & Kinnear, 2014).

Des études réalisées *in vivo* montrent que ce mécanisme de présentation de l'antigène par les cellules somatiques est plus important que la présentation directe par les CPA (Tregoning & Kinnear, 2014).

2.3. Méthodes d'administration

L'ADN est une molécule possédant une charge globale négative, tout comme les bicouches phospholipidiques constituant les membranes cellulaires, ce qui constitue un obstacle conséquent au passage transmembranaire du plasmide vaccinal. Le passage à travers la membrane plasmique est permis par le biais de moyens détournés (endocytose médiée par les puits de clathrine, par les cavéoles ou par pinocytose), cependant, ces mécanismes sont moins efficaces pour internaliser l'ADN. L'utilisation de systèmes d'administration est nécessaire afin d'améliorer le passage transmembranaire du plasmide de manière passive ou en modifiant la structure du vaccin afin d'améliorer son internalisation par les différents mécanismes d'endocytose (J. Lee *et al.*, 2018).

Il existe plusieurs voies d'administration du vaccin à ADN (Figure 30) :

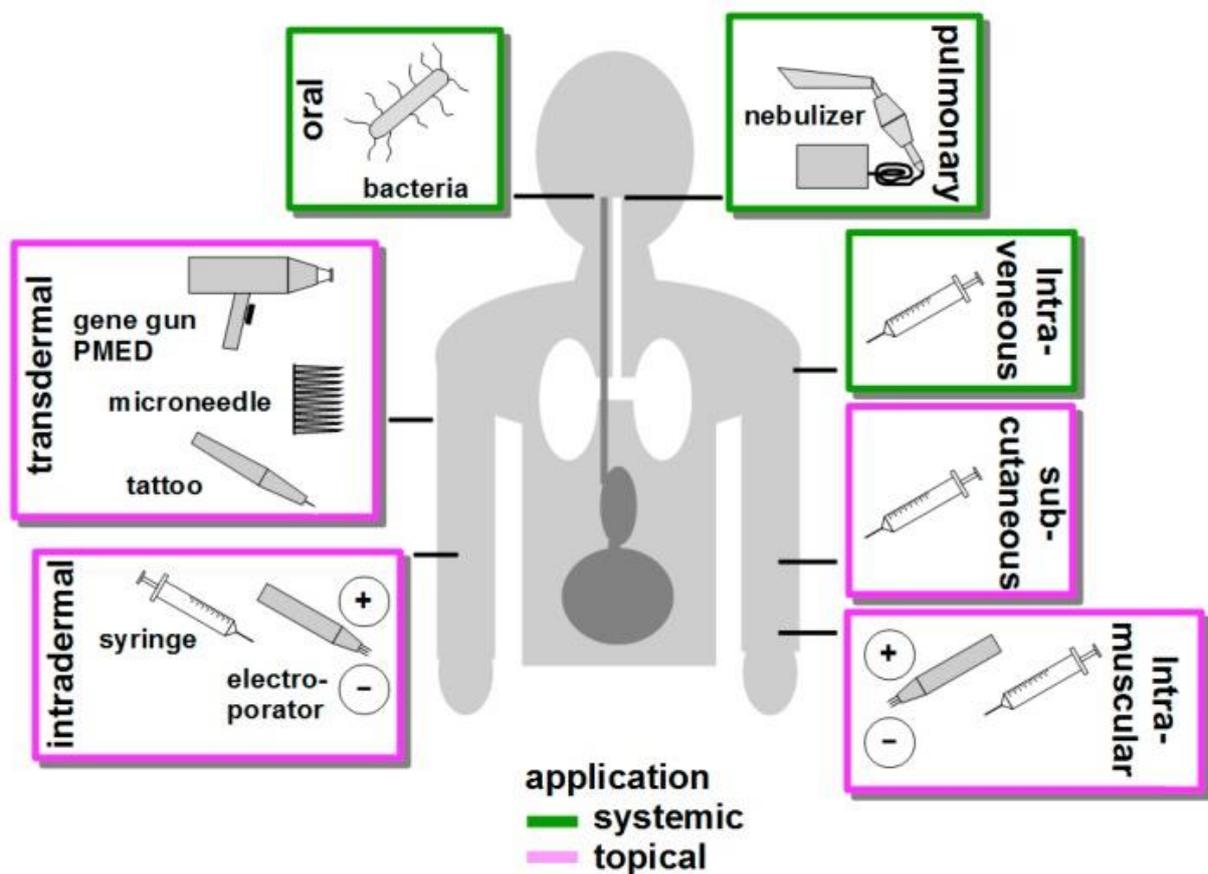


Figure 30 : Voies d'administration des vaccins à ADN selon Hobernik & Bros, 2018

- ❖ La voie la plus commune est l'administration à l'aide d'une aiguille par **voie intramusculaire** (IM) ou par **voie intradermique** (ID). La voie IM est la première à avoir été utilisée mais elle se révèle moins efficace que la voie ID, en raison de la grande proportion de cellules de Langherans (cellules dendritiques) présentes dans le derme, ce qui favorise la prise en charge du plasmide à ADN (Ghaffarifar, 2018). Le type de réaction immunitaire produit diffère également en fonction de la voie d'administration : en effet, des études ont montré que l'injection d'un vaccin à ADN par voie IM a permis d'induire une production en grande quantité d'IgG2a, contrairement à l'approche biolistique (« gene gun »), qui a permis d'induire la production en grande quantité d'IgG1. L'administration par voie ID permet d'induire quant à elle la production d'IgG mais pas d'IgA (J. Lee *et al.*, 2018). L'administration du vaccin par voie IM nécessite une dose plus importante afin d'obtenir une immunisation efficace (de l'ordre de 10 à 100 µg chez des sujets murins mais jusqu'à 0.5 à 2.5 mg pour de plus grands animaux et chez l'Homme) (Dunham, 2002).
- ❖ La **voie muqueuse** permet également d'induire une immunisation, notamment en délivrant le vaccin par voie nasale ou orale (Ghaffarifar, 2018). Cette voie permet de mimer l'infection par les agents pathogènes car la muqueuse est la principale porte d'entrée de nombreux agents pathogènes. Des études ont par ailleurs montré que cette voie d'administration permettait d'obtenir une réponse immunitaire plus importante que lors d'injection par voie systémique (IM ou ID) (M. A. Liu, 2003).
- ❖ L'**approche « biolistique »** (mot-composé dérivant de biologique et de balistique) est une méthode de transfection directe d'une cellule par le biais d'un appareil d'injection (le « gene gun »). Le gene gun propulse grâce à des gaz sous pression (souvent de l'hélium (Tregoning & Kinnear, 2014)), des microparticules d'or sur lesquelles sont adsorbés les plasmides ADN, directement dans une cellule ou un organe cible (Dunham, 2002; Ghaffarifar, 2018; J. Lee *et al.*, 2018; Tregoning & Kinnear, 2014). Tout comme l'administration du vaccin à ADN par voie ID, le gene gun permet d'induire la production d'IgG mais pas d'IgA (J. Lee *et al.*, 2018). Tout comme l'administration du vaccin par voie systémique, l'approche biolistique montre une protection modérée contre l'agent pathogène mais se démarque par la dose minimale nécessaire afin d'obtenir une immunité active bien moindre que pour les voies d'administration systémiques (de l'ordre de 0.1 à 1 µg chez les souris et une diminution de la dose similaire chez les grands animaux et chez l'Homme) (Dunham, 2002; J. Lee *et al.*, 2018; Tregoning & Kinnear, 2014).
- ❖ L'**électroporation *in vivo*** est une méthode à l'origine pratiquée *in vitro* afin d'améliorer le passage de molécules au travers de la membrane plasmique des bactéries en appliquant un courant électrique déstabilisant la membrane et créant ainsi des pores dans celle-ci afin de faciliter le passage des molécules de manière passive dans le cytoplasme de ces cellules (Dunham, 2002; Ghaffarifar, 2018; J. Lee *et al.*, 2018; Tregoning & Kinnear, 2014). Une méthode d'électroporation *in vivo* proposée consiste à créer des micropores dans le derme grâce à un système contenant des micro-aiguilles, puis d'appliquer un champ électrique dans l'hypoderme à l'aide d'une électrode, sous anesthésie (Figure 31) (Huang *et al.*, 2018). Cette méthode, principalement utilisée en expérimentation et dont le mécanisme est encore peu connu, permettrait d'induire une forte réponse immunitaire (J. Lee *et al.*, 2018) en facilitant le passage transmembranaire du plasmide vaccinal et serait également responsable d'une induction locale d'une réaction inflammatoire, améliorant la réponse immunitaire par le recrutement de cellules immunitaires (Tregoning & Kinnear, 2014). L'électroporation présente également une bonne innocuité, mais peut être à l'origine d'inconfort et de courtes

contractions musculaires à l'endroit d'application du champ électrique. Elle est généralement bien tolérée (J. Lee *et al.*, 2018; Tregoning & Kinnear, 2014). La principale limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas d'améliorer la réponse immunitaire pour tous les vaccins à ADN et des recherches supplémentaires doivent être réalisées afin de perfectionner ce système d'administration (L. Li & Petrovsky, 2016).

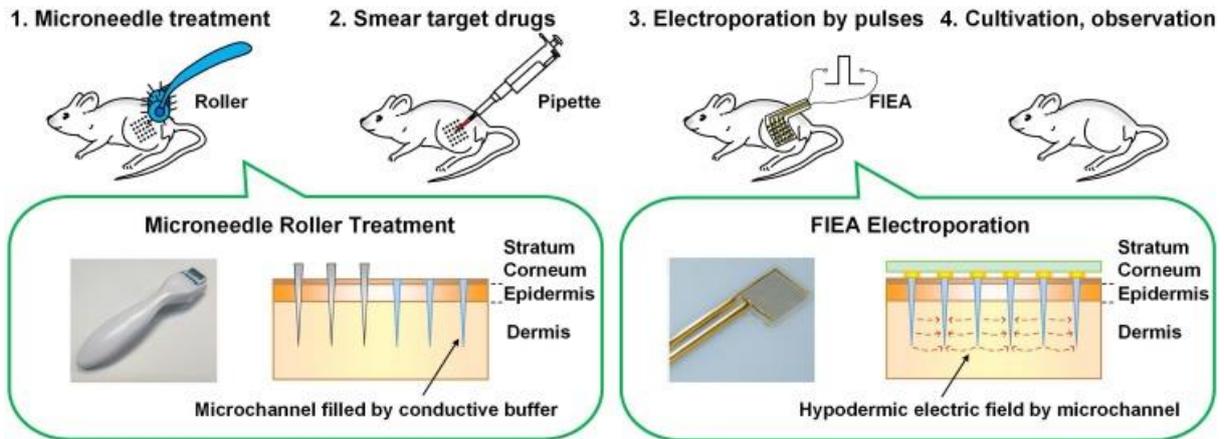


Figure 31 : Processus d'électroporation *in vivo* proposé par Huang *et al.*, 2018

Toutes ces méthodes d'administration ont pour but d'améliorer l'efficacité des vaccins à ADN en permettant une transfection plus efficace des cellules immunitaires par le plasmide. Il est également possible d'améliorer la stabilité du plasmide à ADN afin d'optimiser l'efficacité du vaccin. Les mêmes systèmes de délivrance que ceux développés pour les vaccins conventionnels peuvent être utilisés comme l'encapsulation du plasmide à ADN dans un liposome (permettant de faciliter la fusion à la membrane cellulaire et donc l'endocytose du plasmide), dans des polymères cationiques (possédant une charge positive, ils s'adsorbent à l'ADN et facilitent ainsi le passage transmembranaire du complexe ayant une charge neutre), ou dans des virosomes (on parle alors de vaccins à vecteur viral recombinant) (Tregoning & Kinnear, 2014).

2.4. Comparaison avec les vaccins conventionnels

Les vaccins à ADN possèdent de nombreux avantages en comparaison avec les vaccins conventionnels :

- ❖ Ils sont **plus faciles et moins coûteux à produire**. En effet, ils ne nécessitent qu'un bioréacteur utilisé pour la culture bactérienne. Le temps nécessaire pour construire le plasmide à partir des banques préexistantes, préparer la population bactérienne qui produira le plasmide vaccinal et pour purifier le plasmide produit est estimé entre 2 à 4 semaines, ce qui fait des vaccins à ADN un vaccin *a priori* idéal pour contrôler les maladies émergentes (Hobernik & Bros, 2018; Shafaati *et al.*, 2021; Tregoning & Kinnear, 2014).

- ❖ L'utilisation de la machinerie cellulaire eucaryote permet la transcription d'un antigène ayant une conformation tridimensionnelle et un profil de glycosylation se rapprochant le plus de celle de l'antigène natif, limitant ainsi les problèmes de mauvais repliement des protéines et des maturations post-transcriptionnelles procaryotes, retrouvés avec l'utilisation des vaccins à protéines recombinantes (Beláková *et al.*, 2007; Ghaffarifar, 2018; Shafaati *et al.*, 2021). La proximité de l'antigène vaccinal avec l'antigène natif de l'agent pathogène (notamment dans le cas des infections virales), permet de mimer avec plus de précision une infection intracellulaire et d'induire une réponse cytotoxique par le biais d'une présentation de l'antigène par le CMH-I par voie endogène aux lymphocytes T CD8+, en plus de permettre la présentation de l'antigène par le CMH-II par voie exogène. Cela permet aux vaccins à ADN d'induire une réponse humorale et cellulaire (Beláková *et al.*, 2007; Shafaati *et al.*, 2021). Ils sont également capables d'induire une forte réponse Th1 et Th2, et donc seraient, **en théorie, très fortement immunogènes** (Ghaffarifar, 2018).
- ❖ Les plasmides à ADN sont des structures **plus stables** que les antigènes protéiques, que les virus ou que les ARNm, et peuvent être conservés à température ambiante, au contraire des vaccins conventionnels. Leur conservation à basses températures permet de les conserver pendant une longue durée (Bouazzaoui *et al.*, 2021; Shafaati *et al.*, 2021). Leur stabilité contre les hautes températures permet même de les conserver plus facilement dans des régions tropicales, alors que les vaccins conventionnels nécessitent la mise en place d'une chaîne du froid (Ghaffarifar, 2018).
- ❖ Les vaccins à ADN sont également **plus sûrs** d'utilisation que les vaccins conventionnels, et notamment les vaccins vivants atténués, capables de revenir au phénotype virulent (Beláková *et al.*, 2007; Bouazzaoui *et al.*, 2021; Ghaffarifar, 2018; Hobernik & Bros, 2018). Des études montrent chez les souris que le taux d'intégration du plasmide au génome de l'individu vacciné était inférieur au taux de mutation spontané (Shafaati *et al.*, 2021).

Cependant, il existe également de nombreux inconvénients faisant des vaccins à ADN une perspective intéressante plutôt qu'une alternative concrète aux vaccins conventionnels :

- ❖ L'efficacité de la transfection des cellules immunitaires par le plasmide est en adéquation avec la qualité de la réponse immunitaire induite. De nombreux mécanismes de protection de l'organisme vont contrer cette transfection : le plasmide injecté est directement dégradé par les nucléases présentes dans la peau, les muqueuses et le plasma, ce qui limite la transfection des cellules. Seule une faible proportion de plasmide traverse la membrane plasmique des cellules et une plus faible proportion encore traverse le noyau. La faible proportion de plasmide ayant atteint le noyau n'exprime pas forcément l'antigène. Un phénomène de tolérance immunitaire consécutif à l'expression du plasmide en continu peut se mettre en place et limiter l'intensité de la réponse immunitaire. Tous ces mécanismes contribuent à la **faible immunogénicité** des vaccins à ADN constatée *in vivo*, qui est à ce jour la principale limite des vaccins à ADN (Shafaati *et al.*, 2021).

- ❖ Les données actuelles disponibles concernant l'innocuité des vaccins à ADN provient d'études réalisées sur des modèles murins et peu d'informations sont disponibles pour les grands animaux ainsi que chez l'Homme. De plus, il est théoriquement possible que le plasmide s'intègre sur des proto-oncogènes et les active ou s'insère sur un gène onco-suppresseur et l'inactive, favorisant ainsi la formation de tumeur. Il est également possible que le plasmide entraîne l'apparition de maladies auto-immunes. Les résultats obtenus chez les souris concernant l'innocuité sont rassurants, mais la réalisation d'études chez des animaux de plus grande taille et chez l'Homme permettraient d'éclaircir ce point (Ghaffarifar, 2018).

Les vaccins à ADN constituent une technologie présentant sur le papier de nombreux avantages, qui ne se vérifient pas toujours *in vivo*. Les recherches actuelles mettent l'accent sur l'amélioration de l'immunogénicité et de nombreux progrès sont effectués chaque jour sur les systèmes d'administration des vaccins, ainsi que sur l'amélioration de la structure du plasmide et la découverte de nouveaux adjuvants génétiques, afin d'améliorer l'adressage du plasmide aux cellules immunitaires compétentes et l'expression du plasmide. Ces recherches ont permis d'augmenter l'immunogénicité des vaccins à ADN. Les vaccins à ADN constituent non seulement une alternative plutôt sûre aux vaccins conventionnels, mais aussi une perspective qui pourrait révolutionner la vaccinologie, notamment en termes de prise en charge des maladies émergentes, mais également dans la production de masse et à faible coût, les rendant accessibles aux pays en voie de développement (Shafaati *et al.*, 2021).

3. Vaccins à ADN à usage vétérinaires commercialisés

Les nombreuses recherches effectuées sur les vaccins à ADN (en 2023, 37 498 articles au total ont été publiés sur PubMed depuis le début des recherches sur ces vaccins (J. Lee *et al.*, 2018)) ont permis la commercialisation de quatre vaccins à usage vétérinaire : Les vaccin prophylactiques West Nile-Innovator® chez les équidés (premier vaccin à ADN autorisé au monde) et Apex-IHN® chez le saumon (luttant contre la nécrose hématopoïétique du saumon) ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2005 aux Etats-Unis d'Amérique ainsi qu'au Canada, Oncept™ le vaccin thérapeutique contre le mélanome oral aux stades II et III du chien, ayant obtenu une AMM aux Etats-Unis en 2007 et enfin Clynav® le vaccin prophylactique contre la maladie pancréatique du saumon, premier vaccin ayant été autorisé dans l'Union Européenne en 2017 (Dory & Jestin, 2021; Ghaffarifar, 2018; J. Lee *et al.*, 2018).

Un autre vecteur à ADN est également mentionné mais son utilisation n'est ni thérapeutique, ni prophylactique mais plutôt zootechnique : il s'agit du « vaccin » à ADN pour la GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) permettant d'améliorer la croissance des porcs. Cette spécialité a été seulement autorisée en Australie (Ghaffarifar, 2018; J. Lee *et al.*, 2018). Ce vecteur ne peut pas être assimilé à un vaccin car il n'induit pas de réponse immunitaire, et ne sera donc pas développé dans la partie suivante.

3.1. Vaccin contre le West-Nile virus chez les équidés

3.1.1. Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée

3.1.1.1. Importance

Le virus du West Nile est un virus isolé pour la première fois en Ouganda en 1937 et est responsable de milliers de cas de morbidité et de mortalité chez les chevaux, les oiseaux ainsi que les hommes. Sa répartition géographique (Figure 32) est historiquement associée à l'Europe, l'Afrique, le Moyen-Orient ainsi qu'à l'Asie mais il s'est propagé en Amérique à la fin des années 90, à la suite de son introduction en 1999 à New York, et causant une épidémie durant l'été 2003 en Californie (Fiacre *et al.*, 2020; Rossi *et al.*, 2010; Snyder *et al.*, 2020).

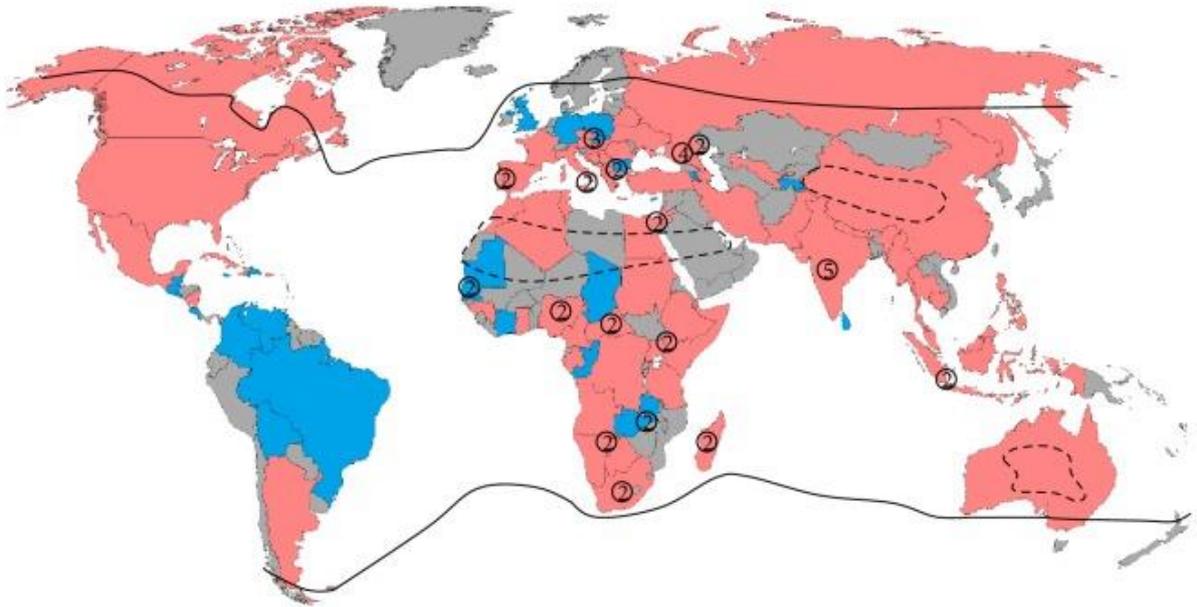


Figure 32 : Distribution géographique du WNV selon Chancey *et al.*, 2015 : en rouge, cas liés à l'Homme, en bleu, cas liés aux animaux

Au cours de cette période d'épidémie, le virus du West-Nile (WNV) fut responsable de l'infection de 50 830 **Hommes** dont 2330 sont décédés des suites de la maladie, ainsi que de 28 000 cas d'encéphalite équine aux Etats-Unis. On estime aujourd'hui que le virus est responsable de 7 millions d'infections chez l'Homme entre 1999 et 2016 aux Etats-Unis (Fiacre *et al.*, 2020; Snyder *et al.*, 2020).

Les infections au WNV touchent de nombreux vertébrés incluant les animaux de rente, les animaux de compagnie ainsi que la faune sauvage (oiseaux, chevaux et Homme notamment), mais ce sont les **oiseaux** les plus fréquemment naturellement atteints par ce virus. Chez les oiseaux, le taux de mortalité est élevé et la mort survient rapidement, sous 24h (des études réalisées chez les oies montrent une mortalité de 25 à 40 %). Les oiseaux constituent le réservoir principal du virus et leur capacité à excréter en grande quantité en fait des candidats idéaux pour la propagation de la maladie, en raison des grandes distances parcourues lors de leur migration (Fiacre *et al.*, 2020; van der Meulen *et al.*, 2005).

Chez les **chevaux**, depuis son introduction aux Etats-Unis en 1999, le WNV est responsable de 15 000 cas équins de troubles neurologiques, cependant, seulement 10 à 12 % des infections induisent l'expression de symptômes. Le taux de mortalité en revanche, varie entre 28 et 45 % (van der Meulen *et al.*, 2005).

Bien que n'induisant peu de signes cliniques chez les nombreux d'animaux sensibles à l'infection, le WNV est capable d'induire un taux de mortalité non négligeable, qui peut entraîner des conséquences économiques, écologiques et sanitaires importantes pour les éleveurs, les propriétaires et la faune sauvage, nécessitant ainsi la surveillance de cette maladie émergente dans le monde entier.

3.1.1.2. Etiologie

Le virus du West-Nile est un arbovirus de la famille des Flaviviridae et appartenant au genre *Flavivirus*. Il s'apparente au virus de l'encéphalite Japonaise. C'est un virus possédant une capsidie icosaédrique entourée par une enveloppe (bicouche phospholipidique). Le génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive. Son génome mesure 11 000 paires de bases et est constitué d'une séquence structurale codant les gènes de capsidie (gène C), de membrane et de protéines précurseurs de membrane (gènes prM et M) et d'enveloppe (E), et d'une séquence non structurale codant les protéines NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (Figure 33) (Chancey *et al.*, 2015).

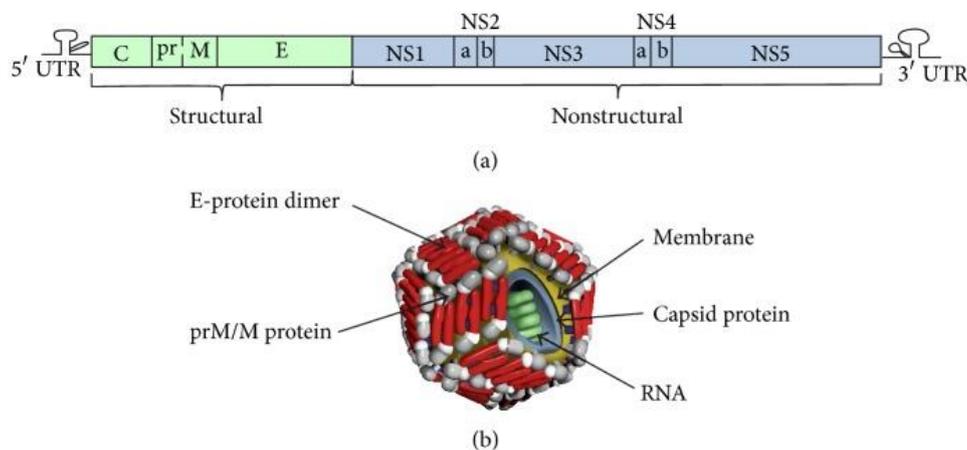


Figure 33 : Structure du génome et du WNV selon Chancey *et al.*, 2015

Durant la formation de la particule virale, les protéines prM et E s'intègrent dans la membrane en formation du virion, la protéine prM permettant d'empêcher que le virion fusionne prématurément avec la membrane plasmique de la cellule infectée en bloquant le domaine de fusion de la protéine E. Cette protéine prM, une fois la particule virale complètement assemblée, est clivée. La protéine E constitue l'antigène clé pour la vaccination car elle est la principale cible des anticorps neutralisants produits par les plasmocytes en réponse à l'infection (Chancey *et al.*, 2015).

Lors d'une infection, la reconnaissance des antigènes viraux par le système immunitaire est à l'origine d'une production d'anticorps neutralisants. Les IgM et les IgG jouent un rôle majeur dans la lutte contre le WNV : les IgM sont les premiers anticorps produits et se fixent aux antigènes viraux, et leur organisation pentamérique est à l'origine de l'activation du système du complément et de l'augmentation de la phagocytose. Les anticorps spécifiques IgG1 sont produits par les plasmocytes et sont capables de se fixer aux leucocytes au niveau de leurs récepteurs Fc, induisant une activation de la voie classique du complément et une infiltration lymphocytaire au niveau des organes respiratoires. Un vaccin optimal doit être en mesure d'induire la production durable d'une grande quantité d'IgG1

spécifiques du WNV, permettant de neutraliser le virus et ainsi de conférer une immunité protectrice contre la maladie du West-Nile (Khatibzadeh *et al.*, 2015).

Les séquences non structurales codent des protéines aux nombreuses fonctions, notamment dans la réplication de l'ARN viral et dans régulation ainsi que dans les mécanismes d'échappement du virus aux défenses immunitaires (Chancey *et al.*, 2015).

Il existe cinq lignées du WNV :

- ❖ La lignée I, formant deux clades : le clade Ia contient les WNV provenant d'Europe, du Moyen-Orient et d'Afrique ayant causé l'épidémie en Amérique du Nord. Le clade Ib comprend la souche australienne du WNV, le virus Kunjin. Les virus du clade Ia sont responsables de symptômes neurologiques graves chez l'Homme tandis que les virus du clade Ib sont responsables de symptômes modérés (Rossi *et al.*, 2010).
- ❖ La lignée II est composée des virus provenant principalement d'Afrique et causent, comme les virus du clade Ib des symptômes d'intensité modérée (Rossi *et al.*, 2010).
- ❖ Les virus des lignées III, IV et V sont encore peu connus (Rossi *et al.*, 2010).

3.1.1.3. Cycle épidémiologique et présentation clinique chez le Vertébré

Le cycle de transmission du virus fait intervenir trois principaux acteurs (Figure 34) :

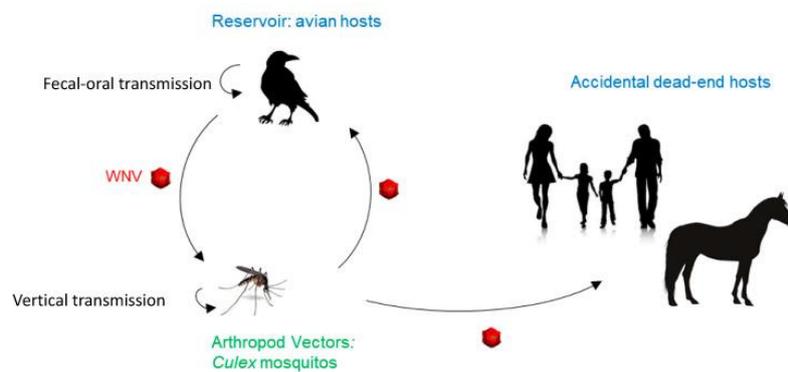


Figure 34 : Cycle de transmission du WNV selon Fiacre *et al.*, 2020

- ❖ Les **arthropodes vecteurs** (moustiques de l'espèce *Culex* principalement mais *Culiseta inornata* et les moustiques de l'espèce *Aedes* peuvent également être vecteurs) se contaminent en se nourrissant du sang d'un animal infecté par le virus, les oiseaux, principalement du fait de la virémie persistante observée chez ces animaux. Les moustiques infectés transmettent alors le virus à d'autres vertébrés sains durant le repas de sang (Chancey *et al.*, 2015; Fiacre *et al.*, 2020; van der Meulen *et al.*, 2005).

- ❖ Les **oiseaux** constituent l'espèce la plus importante du cycle de transmission. En effet, certaines espèces d'oiseaux, notamment les Passeriformes, développent, une fois contaminées par le virus, une virémie importante persistant longtemps. Cela fait d'eux une espèce réservoir du virus, parmi laquelle les moustiques constituent un « pont » favorisant la transmission : l'arthropode vecteur s'infecte dans la population aviaire lors d'un repas de sang et transmet aux autres vertébrés. Cependant, certaines espèces d'oiseaux sont moins susceptibles aux infections par le WNV comme les Gallinacées et les Psittacidés. Les oiseaux sont également capables de se contaminer par contact direct à partir de leur sécrétions cloacales et orales (Chancey *et al.*, 2015; Fiacre *et al.*, 2020; van der Meulen *et al.*, 2005).
- ❖ Les autres vertébrés et notamment les chevaux et l'Homme, constituent des culs-de-sac épidémiologiques, qui sont infectés par les moustiques et n'interviennent pas ou peu dans la transmission de la maladie car la virémie est transitoire (van der Meulen *et al.*, 2005).

Chez l'Homme, la majorité des infections par le WNV sont asymptomatiques (environ 80%). Pour les infections induisant des signes cliniques, les symptômes varient d'un état grippal, caractérisé par un état fébrile, à des maladies neuro-invasives. Cependant, on estime que moins d'un pourcent des infections aboutissent à des symptômes graves menaçant la vie de l'individu (Chancey *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2010). Les patients développant un état fébrile peuvent présenter des céphalées, des myalgies, des nausées et vomissements, ainsi que des éruptions papuleuses sur les bras, les jambes et au niveau du tronc. Les patients développant une forme neuro-invasives peuvent développer une méningite, une encéphalite ainsi qu'un syndrome poliomyélite-like caractérisé par une paralysie flasque (Sejvar, 2014).

Les équidés présentent généralement des symptômes similaires mais sont plus sensibles que l'Homme aux infections neuro-invasives. On estime qu'environ 10% des chevaux infectés par le WNV développent des affections neurologiques sévères, se caractérisant par un état fébrile (entre 38 et 40°C), une altération de l'état général (62.1%), de l'ataxie (81.5% des cas, symptôme le plus fréquent), une parésie (12.1%), des tremblements et un décubitus prolongé. D'autres signes cliniques peuvent être observés comme des fasciculations des muscles de la face, des membres et thoraciques, une paralysie temporaire du nerf facial, ainsi qu'un changement de comportement (confusion, agressivité, automutilation) (Fehér *et al.*, 2022).

3.1.1.4. Traitement et prévention

Il n'existe pas de traitement spécifique à l'infection par le WNV chez les animaux comme chez l'Homme. Le traitement mis en place repose sur du traitement symptomatique. Cependant, des études ont montré une efficacité intéressante *in vitro* de deux antiviraux, les interférons et la ribavirine chez l'Homme (Rossi *et al.*, 2010).

La lutte contre le WNV passe d'abord par la prévention sanitaire de l'infection et notamment par la mise en place de réseaux de surveillance aux différents niveaux du cycle épidémiologique (vecteurs arthropodes, oiseaux, vertébrés). La maladie du West-Nile fait d'ailleurs partie de la catégorie E (maladie à surveillance obligatoire) de la Loi Santé Animale européenne (Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament (Animal Health Law), 2021). En France c'est le Centre National de Référence des arbovirus et les Agences régionales de santé pour l'Homme, le Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en

Pathologie Equine (RESPE) pour les chevaux et le réseau SAGIR pour les oiseaux sauvages qui sont chargés principalement de cette surveillance (Snyder *et al.*, 2020; Agence Régionale de la Santé, 2022).

Le premier vaccin équin contre le WNV a été développé en 2003. Il s'agissait d'un vaccin contenant le virus entier, inactivé par le formol. Par la suite, des vaccins viraux recombinants dérivés des Canarypox virus ont été développés, ainsi qu'un vaccin peptidique chimérique (Bosco-Lauth & Bowen, 2019). Puis, en 2005 un vaccin à ADN a été commercialisé aux Etats-Unis. Ce vaccin a été développé en raison de son innocuité, sa versatilité et sa bonne conservation, notamment sa stabilité contre les changements importants de température, permettant d'améliorer la logistique lors de campagnes de vaccination dans les pays chauds et en voie de développement, contrairement aux vaccins conventionnels, nécessitant d'être stockés au froid (Dory & Jestin, 2021).

3.1.2. Présentation du vaccin

3.1.2.1. Composition du vaccin

Le vaccin contre la maladie du West-Nile a été commercialisé aux Etats-Unis en 2005 sous le nom de West Nile-Innovator® par Fort Dodge Health et fut retiré du marché en 2010. Ce vaccin est constitué d'un plasmide à ADN comprenant les gènes de la protéine pré-membranaire (prM) et de la protéine d'enveloppe (E) du WNV, et d'un adjuvant nommé MetaStim™ (De Filette *et al.*, 2012; « West Nile Virus », 2007). Cet adjuvant se présente sous la forme d'une émulsion lipidique (liposome) et permet d'améliorer la réponse humorale et cellulaire induite par la vaccination en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en activant les cellules dendritiques ainsi que les macrophages, favorisant l'expression par ces cellules de marqueurs moléculaires permettant d'améliorer la reconnaissance de l'antigène (CD83, CD86 et CMH-II) (Horohov *et al.*, 2015).

3.1.2.2. Protocole vaccinal

Des études préliminaires ont démontré qu'une seule injection par voie IM permet d'obtenir une protection suffisante et durable chez les équidés (Davis *et al.*, 2001 ; Dauphin & Zientara, 2007).

3.1.2.3. Efficacité vaccinale

Le vaccin à ADN commercialisé est capable d'induire une forte immunité cellulaire ainsi que la production d'anticorps neutralisants en grande quantité, de manière durable, en faisant un vaccin très efficace. Les études effectuées chez les souris ainsi que chez les équidés montrent qu'en une seule injection, 100% des sujets vaccinés développaient une immunité protectrice (Dauphin & Zientara, 2007; Davis *et al.*, 2001). Les chercheurs à l'origine de la mise au point du vecteur plasmidique attribuent cette excellente efficacité à la présence d'un peptide signal de translocation provenant du WNV, permettant un bon adressage aux cellules immunitaires compétentes. Les niveaux d'expression des protéines prM/M et E secrétés par les cellules transfectées ont par ailleurs été mesurés et montrent que ces trois protéines ont bien été exprimées et ont une conformation similaire à la protéine native (Davis *et al.*, 2001).

Ce vaccin a également été testé par voie IM chez la corneille d'Amérique (*Corvus brachyrhynchos*) ainsi que chez la corneille de rivage (*Corvus ossifragus*) et a permis de diminuer la mortalité de la maladie, sans empêcher l'infection. Ce vaccin induit une immunité imparfaite chez ces oiseaux et nécessite d'être amélioré afin de conférer une immunité protectrice et durable, induisant une diminution substantielle de la virémie afin de limiter la transmission du WNV par les oiseaux, qui constituent la population réservoir du virus (Davis *et al.*, 2001; Turell *et al.*, 2003).

Un vaccin à ADN contenant un plasmide codant les protéines prM et E du WNV (inspiré du plasmide utilisé pour le vaccin équin) a subi de nombreux essais cliniques chez l'Homme qui ont montré que le vaccin était capable d'induire la production d'anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse immunitaire T-dépendante, majoritairement par le biais des lymphocytes T CD4+. Ce vaccin constitue une perspective intéressante pour la prévention de la maladie du West-Nile chez l'Homme car il est capable d'induire une immunité protectrice (avec des niveaux d'anticorps neutralisants similaires à ceux induits chez le cheval) et possède une bonne innocuité (Amanna & Slifka, 2014; Martin *et al.*, 2007).

3.1.2.4. Effets secondaires

Un des avantages des vaccins à ADN est leur innocuité. Cela peut se vérifier grâce aux données récoltées lors de nombreux essais cliniques réalisés chez l'Homme et les oiseaux. Malheureusement, peu de données sont disponibles concernant l'innocuité de ce vaccin chez les équidés. Peu d'effets secondaires ont été observés lors de ces essais. Les seuls effets observés étaient localisés au site d'administration et ont été attribués à des réactions d'hypersensibilité aux vaccins ou aux propriétés des adjuvants (Jiménez de Oya *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2007). Les essais cliniques effectués chez l'Homme avec un plasmide équivalent au plasmide contenu dans le vaccin équin font état de symptômes bénins comme une légère douleur/gêne, une légère induration ainsi qu'un érythème au point d'injection. Chez certains patients, des effets systémiques ont également été rapportés mais sont majoritairement bénins : sensation d'inconfort, myalgie, maux de tête et nausées (Martin *et al.*, 2007).

Ce vaccin a par la suite été progressivement abandonné en 2009, suite au rachat de la division Fort Dodge Health de l'entreprise Wyeth par la société Pfizer (Amanna & Slifka, 2014; Brandler & Tangy, 2013).

3.2. Vaccin contre le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse du saumon

3.2.1. Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée

3.2.1.1. Importance

La nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) est une maladie causant des signes cliniques graves et une mortalité importante chez les espèces appartenant à la famille des Salmonidés, dont notamment les deux principales espèces élevées en aquaculture, le saumon Atlantique (*Salmo salar*) ainsi que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'aquaculture est une activité en pleine expansion (10% de production supplémentaire chaque année) et en 2013, l'élevage de Salmonidés a permis de produire un total de 3 millions de tonnes, comptabilisant 17.5 millions de dollars (Dixon *et al.*, 2016; Yong *et al.*, 2019).

Deux enzooties de NIH ont eu lieu au Canada entre 1992 et 1996 ainsi qu'entre 2001 et 2003 et sont responsables de pertes liées à la mortalité des truites élevées à hauteur de 40 millions de dollars canadiens et de 200 millions de dollars canadiens de pertes dues aux invendus. Ces épisodes montrent l'importance économique du virus de la NIH (NIHV), et la nécessité de contrôler la transmission de ce virus ont abouti à la création de lois en Europe ainsi qu'à la mise en place de réseaux de surveillance dans le monde. La NIH est par ailleurs une maladie à déclaration obligatoire à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Dixon *et al.*, 2016; Kibenge, 2019).

L'importance médicale de cette maladie contribue aux pertes économiques notamment en raison du taux de mortalité très élevé, qui atteint même plus de 90% chez les alevins (Yong *et al.*, 2019). En raison du développement de l'aquaculture et des échanges commerciaux à travers le monde des produits de l'aquaculture, la maladie s'est propagée à l'Europe et à l'Asie. De manière plus générale, on retrouve cette maladie dans les régions où l'aquaculture est très développée (Dhar *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2016; Kibenge, 2019; Yong *et al.*, 2019).

3.2.1.2. Epidémiologie

La NIH est une maladie possédant un spectre d'action étroit et semble cibler majoritairement les espèces de la famille des Salmonidés. Cependant, de nombreuses autres espèces sont susceptibles d'être porteuses de ce virus, sans pour autant en exprimer les symptômes, comme l'anguille d'Europe (*Anguilla anguilla*), la daurade royale (*Sparus aurata*), le turbot (*Scophthalmus maximus*), le bar (*Dicentrarchus labrax*). Ces espèces contribuent également à la transmission de la NIH et la connaissance des espèces sensibles à la maladie permet l'amélioration des programmes de surveillance (Dhar *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2016).

Les conditions d'élevage jouent un rôle important dans la transmission de la NIH comme la température des bassins (le virus se développant notamment dans des eaux froides avec une température comprise entre 8 et 14°C), la surpopulation avec une densité trop importante (favorisant la rencontre entre individus sains et infectés) et les conditions générant un état de stress des poissons (densité, manipulations physiques répétées, mauvaise qualité d'eau, diminution de la quantité de nourriture, diminution de la concentration en oxygène dissous, utilisation de cuivre, qui possède des propriétés immunosuppressives, ...) (Dixon *et al.*, 2016).

La transmission du virus se fait de manière horizontale par le biais d'un contact direct entre un poisson infecté et un poisson sain ou d'un poisson porteur sain à un poisson sain sensible au NIH, par diffusion dans l'eau du bassin, mais également de manière verticale, par passage du virus dans les œufs (bien que ce mécanisme semble encore controversé) par le biais des sécrétions émises par le poisson (mucus, fluides sexuels, matières fécales, ...) (Dhar *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2016).

3.2.1.3. Etiologie

Le virus responsable de la NIH fait partie de la famille des *Rhabdoviridae* ayant une forme en balle de fusil (Figure 35) (Dhar *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2016).

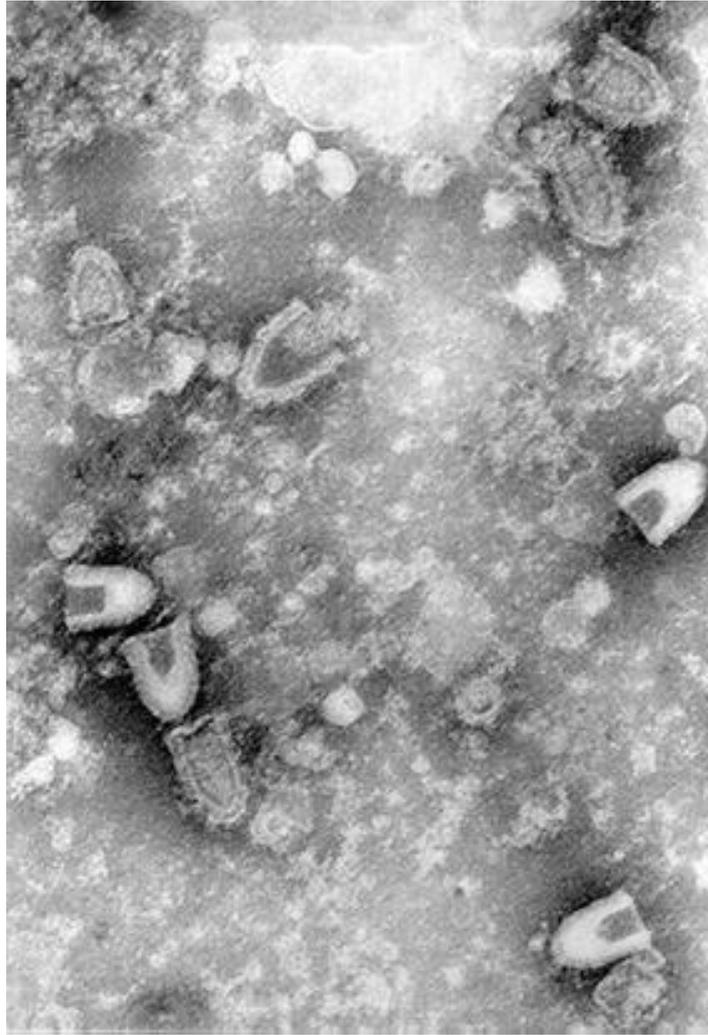


Figure 35 : Image au microscope électronique à transmission du NIHV selon Dixon et al., 2016

Il s'agit d'un virus à ARN simple brin, non segmenté, à polarité négative, possédant un génome constitué d'environ 11 000 paires de bases. Ce génome code pour six protéines (Figure 36) : la protéine de nucléocapside (gène N), la phosphoprotéine associée à la polymérase (gène P), la protéine de matrice (gène M), la glycoprotéine (gène G), la protéine non-virion (gène NV) et la polymérase (gène L) (Dhar et al., 2013; Dixon et al., 2016; Kurath et al., 2003).

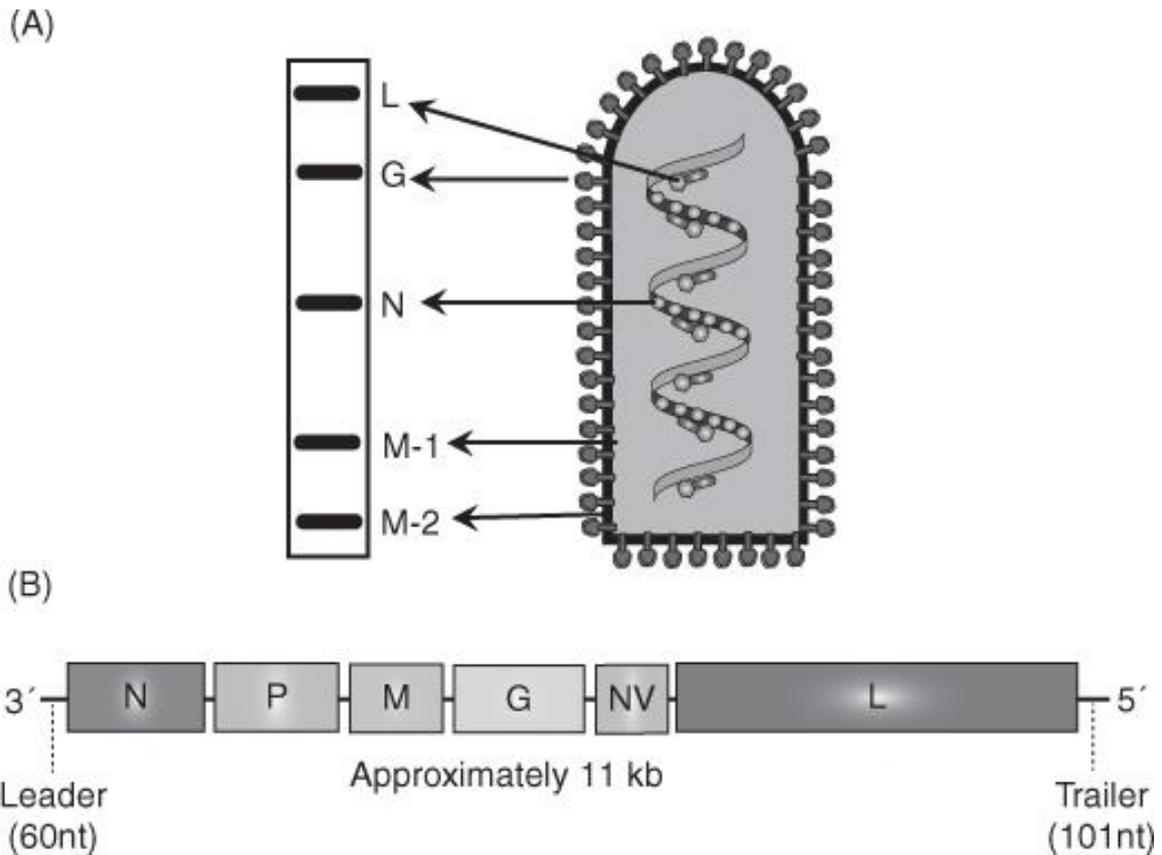


Figure 36 : Schéma de l'organisation génomique du NIHV selon Dhar *et al.*, 2013

Le gène N est le gène le plus exprimé parmi les 6, faisant de la protéine de nucléocapside la protéine retrouvée en plus grande concentration. C'est également le gène exprimé le plus rapidement post-infection (en 2-3 heures). Ces deux caractéristiques font du gène N un candidat idéal pour diagnostiquer les infections débutantes à NIHV (Dhar *et al.*, 2013).

Le gène G permet de définir 3 génogroupes de NIHV : le génogroupe U pour Upper, le génogroupe M pour Middle et le génogroupe L pour Lower, qui correspond à la corrélation de ces séquences avec les séquences de virus NIHV isolés dans la partie haute (Upper), moyenne (Middle) et basse (Lower) d'Amérique du Nord. La variabilité d'une région du gène G (nommée « séquence mid-G »), composée de 303 nucléotides, permet de classer les NIHV dans ces trois génogroupes (Kurath *et al.*, 2003). Par la suite, deux autres génogroupes ont été identifiés en Europe et en Asie, respectivement génogroupes E et J, qui dérivent des génogroupes identifiés en Amérique du Nord et qui montrent une évolution rapide de ces souches originelles en raison d'une forte pression de sélection dans ces zones géographiques. Les souches provenant de ces génogroupes possèdent une virulence variable et contribuent à l'affinité d'une souche pour une espèce donnée (Dixon *et al.*, 2016).

3.2.1.4. Pathogénie et présentation clinique

Deux voies d'entrée du virus ont été proposées : le NIHV contenu dans l'eau contaminée passerait par la bouche du poisson, puis rejoindrait le tube digestif, où il infecte les entérocytes et s'y réplique, et enfin rejoindrait la circulation sanguine. L'autre voie d'entrée serait les branchies, la peau et les nageoires, où des études ont montré une répllication active du virus et la base des nageoires pourrait constituer un réservoir à virus. Après passage dans la circulation sanguine, le virus rejoint les reins, le cœur, la rate et le foie au bout de 8h. Après 2 à 4 jours post-infection, on retrouve des concentrations en virus élevées dans les reins, qui vont le disséminer dans tous les autres organes (dont la rate et la moëlle osseuse hématopoïétique chez les alevins, qui sont sévèrement atteintes). La mort survient rapidement et on estime que le taux de mortalité atteint 80 à 100% sous 5 à 10 jours. Les alevins survivants peuvent cependant garder de lourdes séquelles telles que des déformations de la colonne vertébrale (scoliose ou lordose) (Spickler, 2007).

Les signes cliniques exprimés par les poissons infectés sont les suivants : léthargie avec épisodes d'hyperexcitabilité caractérisée par une frénésie, distension abdominale, exophtalmie, peau terne et branchies pâles, selles longues et semi-transparentes restant attachées à l'anus, pétéchies à la base des nageoires pectorales, de la bouche, des muscles adjacents à l'anus et du sac vitellin des œufs. Chez les alevins, une mortalité élevée et soudaine peut être le seul signe d'infection par le NIHV. Les signes cliniques sont la conséquence de nombreuses lésions internes telles que de la nécrose rénale, splénique et hépatique (nécrose focale dans le foie), des lésions hémorragiques rénales, péritonéales et dans la vessie natatoire, ainsi que des pétéchies dans les organes digestifs (caeca pyloriques, intestins) et les feuilletts péricardiques, péritonéaux et méningés (Spickler, 2007).

3.2.1.5. Prévention

Il n'existe pas de traitement médical disponible pour cette maladie. La lutte contre cet agent pathogène dépend principalement de la mise en place de réseaux de surveillance. En France, les élevages aquacoles peuvent être qualifiés d'élevages « indemnes de NIH » s'ils respectent des mesures d'hygiène, d'élevage et d'introduction de poissons et de matières premières dérivées de l'aquaculture provenant de l'étranger conformes à l'arrêté du 27 juin 2018 (relatif à la mise en place d'un plan d'éradication du NIH en France), qui impose une visite sanitaire annuelle obligatoire au cours de laquelle des prélèvements sont effectués afin de tester la présence du NIHV dans l'élevage (Légifrance, 2018).

Un vaccin à ADN a également été développé comme méthode de prophylaxie médicale de la NIH (Yong *et al.*, 2019).

3.2.2. Présentation du vaccin

3.2.2.1. Composition du vaccin

Le vaccin contre la NIH a été développé et commercialisé en 2005 au Canada sous le nom d'Apex-IHN® par le laboratoire Elanco Animal Health (Dory & Jestin, 2021). Le plasmide à ADN contenu dans le vaccin comprend le gène codant la protéine G virale. Ce gène a été obtenu à partir de la souche virale isolée en 2015 en Italie, nommée IHNV/O.mykiss/I/TN/86/Feb15 (Marsella *et al.*, 2022). Aucun adjuvant n'intervient dans la composition du vaccin selon la fiche technique fournie par ELANCO.

3.2.2.2. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal fait état d'une seule injection par voie IM dans les muscles épaxiaux (muscles érecteurs du rachis), crânio-latéralement à la nageoire dorsale, de 0.05 mL du vaccin, après anesthésie préalable du poisson. La fiche technique du vaccin préconise une absence d'exposition au NIHV de l'animal nouvellement vacciné d'une durée d'au moins 400 degré-jours et la vaccination doit être réalisée plus de 60 jours avant abattage (Drugs "Apex-IHN for Animal Use", 2023).

3.2.2.3. Efficacité vaccinale

La vaccination contre le NIHV ne permet pas d'induire une immunité de groupe suffisante afin de protéger toute la population de poissons en ne vaccinant qu'une partie de la population. Une étude a montré que l'échec vaccinal chez un Saumon d'Atlantique a permis le développement du virus dans toute la population de l'élevage. Il est donc essentiel de vacciner la totalité de la population afin d'obtenir une immunité protectrice (Long *et al.*, 2017). En revanche, la protection immunitaire individuelle est excellente et permet de réduire drastiquement la mortalité d'environ 83 à 98% chez les sujets vaccinés (Dory & Jestin, 2021; Long *et al.*, 2017).

Le vaccin permet de réduire la mortalité des Salmonidés en bloquant la réplication virale, diminuant ainsi la charge virale du milieu. Cependant, ce vaccin fait partie de la catégorie des vaccins anti-mortalité, qui permettent de réduire la mortalité induite par le virus, sans enrayer sa transmission entre individus sensibles, ce qui ne permet pas la mise en place d'une immunité protectrice (Long *et al.*, 2017).

Le vaccin est capable d'induire la production d'anticorps neutralisants chez les individus jusqu'à 12 mois post-vaccination (85% de séroconversion à 7 mois post-vaccination contre 50% à 12 mois) mais n'est pas capable d'induire la production d'anticorps neutralisants chez les individus plus de 17 mois post-vaccination. Cette durée de production d'anticorps post-vaccinaux ne semble pas entraîner d'impact majeur sur l'efficacité vaccinale, probablement en lien avec la conduite d'élevage aquacole : en effet, un cycle de production de Salmonidé n'excède pas 18 mois, or, la majorité des épizooties de NIH ont lieu au cours des 12 premiers mois. La vaccination permet alors d'induire une protection durant la période critique de la production, contribuant ainsi à la bonne efficacité du vaccin (Long *et al.*, 2017).

3.2.2.4. Effets secondaires

Peu d'informations sont disponibles sur l'innocuité du vaccin Apex-IHN®, cependant, aucun effet secondaire n'a été déclaré (Spickler, 2007).

En revanche, de nombreuses controverses ont suivi l'utilisation de ce vaccin chez le poisson, destiné à la consommation humaine. Le principal sujet de débat concerne l'innocuité du vaccin chez l'Homme : en effet, théoriquement, le plasmide vaccinal pourrait être transmis à l'Homme lors de la consommation du poisson, et pourrait s'intégrer au génome humain et être à l'origine de cancers. Certaines études ont permis de démontrer une intégration négligeable voire absente du plasmide au génome humain. Cependant, cette question de l'intégration génomique du plasmide reste encore grandement débattue (Yong *et al.*, 2019).

Pour contourner ce problème, Alonso et son équipe ont inséré un promoteur contrôlé par l'interféron régulateur 1A (IFR1A) dans le plasmide vaccinal, afin d'éviter son expression dans les cellules eucaryotes. Lors de la vaccination, ce sont les interférons produits par les cellules de l'immunité innée qui vont permettre d'activer le promoteur IFR1A contenu dans le plasmide vaccinal, déclenchant alors l'expression du gène codant pour l'antigène (Alonso *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2019).

Dans certains pays, comme la Norvège, les poissons vaccinés avec les vaccins à ADN sont considérés comme Organismes Génétiquement Modifiés (OGM), ce qui peut entraîner une mauvaise presse auprès des consommateurs. D'autres chercheurs ont mis au point d'autres vecteurs capables de contourner ce problème. Pour cela, le vecteur inclue un premier promoteur qui induit chez le poisson l'expression d'une glycoprotéine virale G à l'origine de la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice, et un second promoteur inductible par ZnCl₂, qui régule l'expression de la protéine virale M, capable d'induire l'apoptose des cellules transfectées. Ce vaccin expérimental présente l'avantage de n'induire aucun effet secondaire chez le poisson et d'induire une réponse immunitaire protectrice (Yong *et al.*, 2019).

Bien qu'intéressants sur le plan de la santé publique et d'un point de vue commercial, ces vaccins expérimentaux n'ont pas été commercialisés et le seul vaccin disponible à ce jour reste l'Apex-IHN® (Yong *et al.*, 2019).

3.3. Vaccin contre la maladie pancréatique du saumon

3.3.1. Présentation de l'agent pathogène et de la maladie associée

3.3.1.1. Importance

La maladie pancréatique (MP) est une maladie découverte en 1976 en Ecosse chez le saumon d'Atlantique et a même atteint 19% des sites d'élevage de salmonidés du pays vers la fin de l'année 1985. Cette maladie s'est par la suite étendue aux pays européens (Figure 37) environnants et la Norvège semble être le pays le plus sévèrement atteint, avec des épisodes d'épizooties évoluant chaque année depuis 1985 (Jansen *et al.*, 2017; Taksdal *et al.*, 2007).

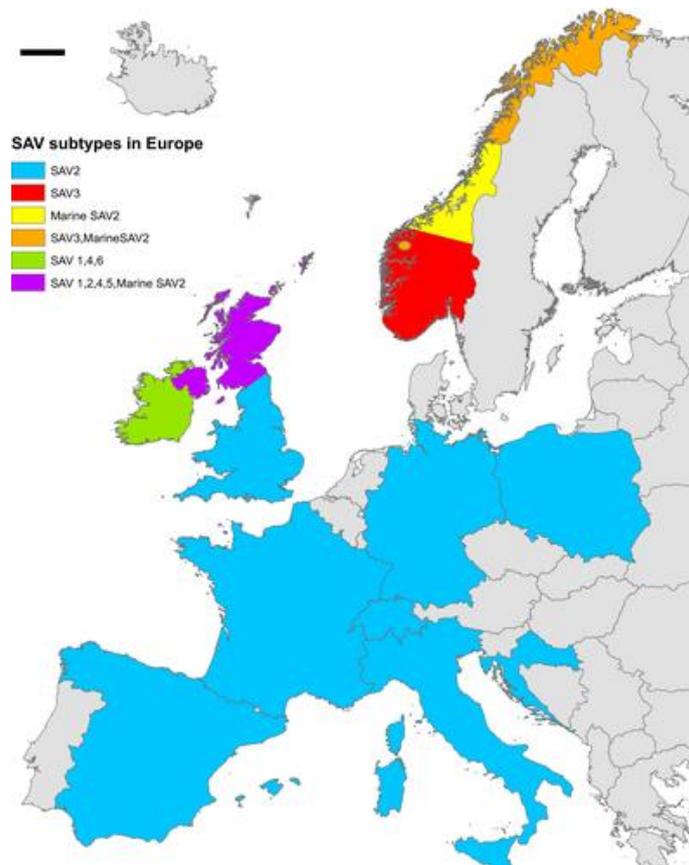


Figure 37 : Distribution du virus de la maladie pancréatique en Europe selon M. D. Jansen et al., 2017

La MP se développe pendant les étapes de transfert des poissons dans l'eau de mer jusqu'à leur abattage, entraînant des épisodes d'épizooties caractérisées par des taux de mortalité pouvant atteindre jusqu'à 63% de la population de l'élevage. Le taux moyen de mortalité atteint par exemple 12% en Irlande mais une grande variabilité de la mortalité est observée entre les différentes régions de ce pays. Des études réalisées en Norvège suggèrent que cette variabilité de la mortalité est due au sous-type de virus, avec des différences de virulence entre chaque sous-type. Durant ces épisodes d'épizooties, les poissons ayant une taille supérieure à la moyenne étaient plus largement touchés et ceux ayant survécu à l'infection développent des troubles de la croissance, participant alors à une diminution de la biomasse produite (11.2% de biomasse perdue durant les épizooties de 2003 et 2004 en Irlande) (Jansen et al., 2017).

Les épizooties de 2003 et 2004 en Irlande sont ainsi responsables d'une perte de 35 millions d'euros de chiffres d'affaires et de 12 millions de pertes dues à la baisse de production au total. En Norvège, l'épizootie de 2007 est responsable d'une diminution de 70% de la production à l'origine d'une augmentation du coût de production de 0.75€ par kilogramme de poisson en raison de la forte mortalité, des traitements effectués, de la diminution de la qualité du produit final (les filets notamment) et de la prophylaxie. Ces pertes économiques ont également limité les échanges commerciaux entre les pays avec le refus des pays indemnes d'importer des produits provenant des élevages de pays affectés par la maladie, entraînant alors des pertes économiques supplémentaires pour les pays concernés (Jansen et al., 2017).

3.3.1.2. Epidémiologie

La MP est une maladie transmise majoritairement de façon horizontalement. La pression d'infection est un facteur important de survenue d'épizooties et se traduit par le contact prolongé d'un élevage avec l'eau d'un élevage infecté (Jansen *et al.*, 2017). Un autre facteur influençant directement le temps de contact est la présence d'un fort courant permettant de disséminer plus loin le virus et d'infecter d'autres élevages. Ce paramètre est influencé par la vitesse du courant (dus aux marées, l'intensité et la direction du vent, ainsi que l'activité nautique) (Jansen *et al.*, 2017; Viljugrein *et al.*, 2009). Des études ont permis de montrer que 80% des élevages étaient infectés de manière indirecte par le biais des courants. Le prêt de matériel d'un élevage infecté à un autre élevage est responsable de 16% des infections et que les autres voies de transmission horizontale non spécifiques étaient responsables de seulement 4% des infections. Les méthodes de lutte passent avant tout par des méthodes hygiéniques (Aldrin *et al.*, 2010; Jansen *et al.*, 2017).

Le virus a été identifié dans les fèces et le mucus des poissons infectés. Le virus a également été retrouvé dans des poissons marins, constituant alors une population réservoir, qui permet une transmission indirecte de la MP. Les saumons d'élevage s'étant échappés des bassins pourraient également transmettre la MP et ainsi participer à la propagation de la maladie (Jansen *et al.*, 2017).

3.3.1.3. Etiologie

La MP est due à un virus enveloppé à ARN simple brin, de polarité positive, appartenant à la famille des *Togaviridae* et du genre *Alphavirus*. Il est communément appelé Salmonid Alphavirus (SAV). Son génome est constitué de 12 000 paires de bases et code huit protéines (Figure 38) : quatre glycoprotéines structurales formant la capsid (E1, E2, E3 et 6K) et quatre protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). La protéine E2 permet au virus de se lier au récepteur de la cellule cible, permettant ainsi la fusion des membranes et l'internalisation de ce virus. Les gènes E2 et nsP3 ont des séquences possédant une grande variabilité et ont permis de mettre en évidence 6 sous-types de SAV, nommés SAV1 à SAV6 (Deperasińska *et al.*, 2018; Jansen *et al.*, 2017).



Figure 38 : Organisation génomique du SAV selon McLoughlin & Graham, 2007

Le sous-type SAV2 possède la particularité d'avoir deux variants : le variant d'eau douce (SAV2 FW), connu pour induire la maladie du sommeil (sleeping disease ou SD), identifiée en France, et le variant d'eau de mer (SAV2 MW), induisant la MP chez les animaux d'élevage en milieu marin (Deperasińska *et al.*, 2018; Jansen *et al.*, 2017). Les autres sous-types sont responsables de l'induction de la MP chez les poissons d'élevage, mais les sous-types SAV1 et SAV3 possèdent une virulence plus élevée que les autres (Jansen *et al.*, 2017).

3.3.1.4. Pathogénie et présentation clinique

La pathogénie du SAV est peu connue. On suppose que le virus entre dans l'organisme par le biais des branchies, où il se réplique lentement et peut rester longtemps, entretenant l'infection sur une longue période. Le virus passerait alors dans le sang, puis serait transporté par voie hématogène dans différents organes comme le cœur, les reins et il peut être détecté dans le pancréas et les cellules musculaires (Herath *et al.*, 2016).

Une fois l'organe cible atteint, le SAV se réplique dans le cytoplasme de la cellule cible. Pour cela, il nécessite d'être internalisé pour commencer son cycle de réplication : la protéine E2 de l'enveloppe virale est reconnue par le récepteur cellulaire et induit l'endocytose du virus grâce aux clathrines. Une fois dans le cytoplasme, une grande partie (2/3) de l'ARN simple brin de polarité positive (ARNsb +) est rapidement traduite en protéines non structurales, qui vont servir de modèle pour la production d'ARN génomique, codant les protéines structurales du virus. Les particules virales traduites (nucléocapsides, ARN et nsP) traversent la membrane plasmique de la cellule et deviennent ainsi enveloppées (Herath *et al.*, 2016).

Les cellules myocardiques semblent être le principal lieu de réplication des SAV, qui y provoquent des lésions importantes à l'origine de dommages importants des cardiomyocytes et favorisant la mise en place d'une cardiomyopathie dilatée (CMD). On retrouve également des lésions rénales et branchiales, où le virus semble s'installer de manière chronique et faire perdurer l'infection (Herath *et al.*, 2016).

De la même manière, les lésions du parenchyme pancréatique caractérisées par la perte du tissu pancréatique exocrine et des cellules musculaires sont à l'origine de pancréatites et de myosites (Thorarinsson *et al.*, 2021).

Le SAV entraîne l'apparition de signes cliniques chez les jeunes poissons au cours de leur première année de vie tels qu'une anorexie soudaine, une léthargie, une diminution de la croissance, une qualité de la chair diminuée à l'abattage, une augmentation d'émission de selles et une mortalité pouvant varier entre 5 et 65% (Deperasińska *et al.*, 2018; Thorarinsson *et al.*, 2021).

3.3.1.5. Prévention

La lutte contre le SAV consiste principalement à mettre en place des méthodes de prophylaxie sanitaire et médicale. Concernant la prophylaxie sanitaire, de nombreuses études ont mis en évidence une sensibilité du virus aux pH extrêmes, aux températures élevées et aux désinfectants usuels. Le virus est également capable de survivre 2 mois dans l'eau d'un bassin d'élevage, et peut ainsi être transmis aux élevages voisins directement ou indirectement par le biais du prêt de matériel (filets, bateaux permettant le transport des poissons, ...), la désinfection est donc une étape fondamentale dans la lutte contre la maladie. Le statut de l'élevage vis-à-vis du SAV peut être connu grâce à la réalisation d'une RT-PCR, et il permet de limiter l'importation de poissons infectés d'un élevage infecté à un élevage sain. Les *Alphavirus* sont considérés comme des arboviroses chez les mammifères et peuvent être transmis par les poux notamment, un traitement antiparasitaire externe approprié permet également de limiter le risque de transmission de la MP. Des conduites d'élevage limitant le stress permettent de réduire la pression d'infection, notamment en multipliant les repas, en limitant la densité, et en ajoutant des compléments vitaminiques (E et C) qui sont antioxydants et favorisent la cicatrisation tissulaire (McLoughlin & Graham, 2007).

La mise en place d'une prophylaxie médicale avec la vaccination permet également de réduire le risque d'infection (Deperasińska *et al.*, 2018; Jansen *et al.*, 2017; McLoughlin & Graham, 2007; Røsæg *et al.*, 2021; Skjold *et al.*, 2016; Thorarinnsson *et al.*, 2021).

3.3.2. Présentation du vaccin

3.3.2.1. Composition du vaccin

Le vaccin Clynav[®] est un vaccin contre la MP du saumon d'Atlantique ayant obtenu une autorisation d'utilisation en Europe en 2017. C'est à ce jour le seul vaccin à ADN autorisé en Europe (Dory & Jestin, 2021; European Medicines Agency, 2018). Le plasmide vaccinal est un plasmide pUK-SPDV-poly2#1 à ADN surenroulé (Figure 39), dérivant du SAV de sous-type 3, encodant plusieurs gènes codant pour des protéines virales telles que la protéine de capsid, la protéine membranaire 6K, la protéine d'enveloppe E2 du virus, permettant la fixation du virus à la cellule cible et les protéines « Spike » E1 et E3. La séquence plasmidique possède également un haut degré d'homologie avec la séquence du gène codant pour les protéines virales du sous-type SAV2 présente dans les bases de données génomiques (autour de 98%). L'expression dans les cellules eucaryotes de ces protéines virales est permise grâce à la présence du promoteur dérivé d'un cytomégalo virus (CMV Promoter dans la Figure 39). Le vaccin permet la mise en place d'une réponse immunitaire contre SAV3 principalement mais peut-être également utilisé pour protéger les salmonidés contre les sous-types SAV1 et SAV2 (European Medicines Agency, 2018; Simard & Horne, 2014).

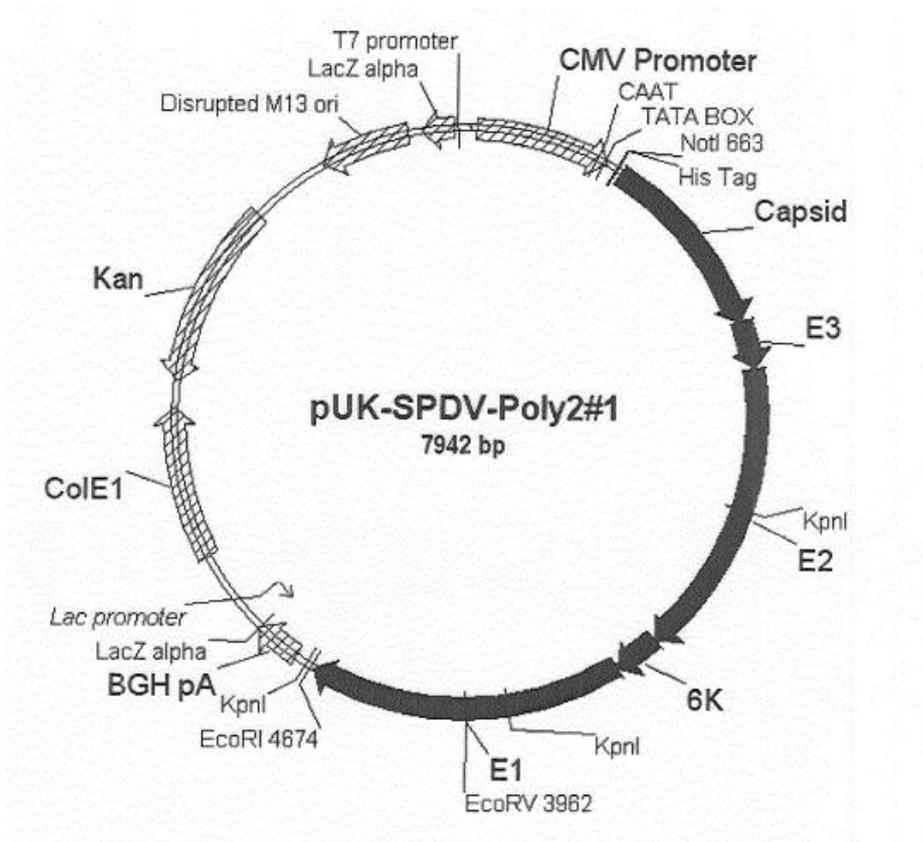


Figure 39 : Schéma du plasmide vaccinal Puk-spdv-Poly2#1 selon Simard & Horne, 2014

3.3.2.2. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal repose sur une administration unique de 0,05 mL de vaccin par voie intramusculaire après anesthésie du saumon. L'injection doit être réalisée sur des saumons d'au moins 25 g crânialement et latéralement à la nageoire dorsale, dans les muscles épaxiaux (European Medicines Agency, 2018).

3.3.2.3. Efficacité vaccinale

Le vaccin contre la MP du saumon permet d'induire une immunité protectrice contre le sous-type SAV3. La durée de protection effective du vaccin est estimée à 399 degrés jours¹⁸⁶. L'administration permet de protéger les jeunes saumons contre la MP en réduisant les lésions cardiaques, pancréatiques, musculaires et en réduisant la perte de poids (Dory & Jestin, 2021; European Medicines Agency, 2018; Thorarinsson *et al.*, 2021). Il permet également de diminuer la mortalité des saumons pendant 9.5 mois (European Medicines Agency, 2018).

Ce vaccin induit une production d'anticorps neutralisants en grande quantité, permettant de diminuer la virémie chez les poissons sensibles et ainsi de diminuer le risque de transmission de l'agent pathogène au sein de l'élevage. L'importance de la virémie est également fortement corrélée à la sévérité des lésions cardiaques chez les jeunes saumons. La diminution de la virémie est donc responsable d'une diminution des lésions chez les saumons infectés (Thorarinsson *et al.*, 2021).

3.3.2.4. Effets secondaires

Le vaccin contre la MP est assez sûr d'utilisation, les effets secondaires étant peu nombreux et évoluent de manière transitoire. On retrouve parmi les effets secondaires les plus fréquents (plus d'un animal sur 10) : un changement dans le comportement de nage pouvant durer jusqu'à deux jours post-injection, une pigmentation au point d'injection jusqu'à 7 jours post-injection, et une anorexie pouvant durer jusqu'à 9 jours post-injection. De manière plus ponctuelle (entre 1 et 10 animaux sur 100), des traumatismes liés à l'injection peuvent perdurer 90 jours sur 5% des poissons. Un surdosage de dix fois la dose thérapeutique n'entraîne pas d'autres symptômes que ceux décrits précédemment (European Medicines Agency, 2018).

3.4. Vaccin contre le mélanome oral du chien

3.4.1. Etude du mélanome oral canin

3.4.1.1. Histopathologie et prédispositions génétiques

Le mélanome est la tumeur de la cavité orale la plus commune chez le chien. Il existe des prédispositions raciales bien connues. Ainsi, les Scottish terriers, les goldens retrievers, les caniches, les teckels, les Bergers d'Anatolie, les Cockers spaniel, les Chow-chow et les Gordon Setter sont prédisposés à cette affection (Bergman, 2007; Palma *et al.*, 2021). Les chiens âgés sont également plus prédisposés à développer la maladie, bien qu'elle puisse être présente chez le jeune chien (Bergman, 2007). C'est une tumeur extrêmement agressive et malgré les progrès effectués concernant la prise en charge, le pronostic reste encore assez sombre. Le chien est un modèle expérimental de cette maladie chez l'Homme car la présentation clinique ainsi que les caractéristiques biologiques et génétiques de la tumeur sont très similaires chez les deux espèces (Palma *et al.*, 2021; Prouteau *et al.*, 2022).

Le mélanome oral canin résulte d'une transformation tumorale des mélanocytes dérivant de la crête neurale. Contrairement aux autres mélanomes cutanés, les UV ne jouent pas un rôle dans le processus de transformation des mélanocytes. La croissance de ces tumeurs est très rapide et invasive, facteur impliqué dans le fort pouvoir métastatique du mélanome oral (MO) et à la faible réponse aux traitements anti-cancéreux conventionnels (Palma *et al.*, 2021).

L'apparition d'un MO chez le chien nécessite la mise en place de quatre mécanismes : la création d'une **instabilité génétique** (dus à des erreurs de réplication commises par l'ADN polymérase non corrigées, et à la dégradation de l'ADN par les ROS lors de stress oxydatif), la **prolifération cellulaire** de manière anarchique (principalement induite par une mutation de l'oncogène TP53, impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules dont l'ADN est trop endommagé), puis l'acquisition par les cellules de **caractères invasifs** (perte de l'inhibition de contact et dégradation des membranes plasmiques rendant les cellules tumorales mobiles) et **métastatiques** et enfin la **stimulation de l'angiogenèse** afin de vasculariser la tumeur (passage d'un phénotype bénin à un phénotype malin par un mécanisme appelé « switch angiogénique », au cours duquel les cellules tumorales produisent des facteurs pro-angiogéniques dont les plus importants sont VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) et l'IL-8 et ne produisent plus de facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine, les IFN α et β et l'angiostatine) (Sulaimon & Kitchell, 2003).

3.4.1.2. Présentation clinique

Les MO canins sont délimités à la cavité orale et on peut les retrouver dans l'ordre décroissant sur les gencives, les lèvres, la langue, et le palais dur. Les mélanomes sont des tumeurs le plus souvent pigmentées, mais on peut retrouver de manière assez fréquente (30% des tumeurs (Palma *et al.*, 2021)) des mélanomes non pigmentés, soulignant ainsi l'importance de réaliser des analyses histologiques sur les tumeurs excisées car la pigmentation ne constitue pas un signe pathognomonique du MO (Bergman, 2007).

Les sites privilégiés de métastases (dans 75% des cas) sont les nœuds lymphatiques régionaux, ainsi que les poumons, mais on peut retrouver sporadiquement des métastases sur les organes abdominaux, le cerveau, le cœur, la paroi abdominale, et le squelette appendiculaire (Palma *et al.*, 2021; Pazzi *et al.*, 2022).

3.4.1.3. Etablissement d'un stade

L'établissement d'un stade et d'un grade permettent de donner une valeur pronostique de l'affection. Le stade se définit par l'extension de la tumeur en fonction de critères de taille, d'invasion des nœuds lymphatiques régionaux et de la présence de métastases à distance. Le stade est établi suite à la réalisation d'examens d'imagerie permettant de mettre ou non en évidence la présence d'une infiltration locale ou à distance. A la suite de ces examens, le stade est classé en catégories établies par la classification TNM mise en place par l'OMS (*Figure 40*) (National Cancer Institute "Cancer Staging", 2015).

Table 1 Traditional World Health Organization TNM-based Staging Scheme for Dogs with Oral Melanoma

T: Primary tumor
T1 Tumor ≤ 2 cm in diameter
T2 Tumor 2-4 cm in diameter
T3 Tumor > 4 cm in diameter
N: Regional lymph nodes
N0 No evidence of regional node involvement
N1 Histologic/cytologic evidence of regional node involvement
N2 Fixed nodes
M: Distant metastasis
M0 No evidence of distant metastasis
M1 Evidence of distant metastasis
Stage I = T1 N0 M0
Stage II = T2 N0 M0
Stage III = T2 N1 M0 or T3 N0 M0
Stage IV = Any T, any N and M1

Figure 40 : Stades de mélanome oral canin selon Bergman, 2007

Ainsi, on établit l'existence de quatre stades de MO :

- ❖ **Stade I** : Tumeur de 2 cm ou moins de diamètre sans invasion des nœuds lymphatiques régionaux ni présence de métastases à distance.
- ❖ **Stade II** : Tumeur de 2 à 4 cm de diamètre sans invasion régionale ou à distance.
- ❖ **Stade III** : Deux possibilités existent :
 - Tumeur de 2 à 4 cm de diamètre avec invasion des nœuds lymphatiques régionaux mais pas de métastases à distance.
 - Tumeur de plus de 4 cm de diamètre sans invasion régionale ou à distance.
- ❖ **Stade IV** : Tumeur de n'importe quelle taille, envahissant ou non les nœuds lymphatiques régionaux et avec présence de métastases à distance.

Ces stades permettent de déterminer des médianes de survie, qui sont de l'ordre de 17 à 18 mois pour les MO de stade I, de 5 à 6 mois pour les MO de stade II et de 3 mois pour les MO de stade III, avec pour seul traitement l'excision de la tumeur (Bergman, 2007).

3.4.1.4. Traitement

Le traitement du MO est multimodal : il fait appel dans un premier temps au contrôle du développement local de la tumeur primitive (Pazzi *et al.*, 2022).

- ❖ La première étape du traitement du MO est souvent la **chirurgie**, qui permet d'excision de la tumeur. Cette méthode peut s'avérer efficace dans les stades débutants de la maladie, mais l'excision seule constitue rarement un traitement efficace à 100% et nécessite l'exérèse avec une marge saine pour être optimale, ce qui n'est pas toujours le cas et dépend de l'accessibilité de la tumeur (Bergman, 2007). L'exérèse en marge saine ne réduit pas le développement de métastases et l'invasion des nœuds lymphatiques régionaux dans la plupart des cas (Pazzi *et al.*, 2022).
- ❖ La **chimiothérapie** peut constituer un traitement complémentaire à l'abord chirurgical. C'est une méthode basée sur l'administration au patient d'un principe actif ciblant les cellules en division et ayant une activité toxique sur les cellules tumorales. Les agents chimiothérapeutiques classiques, couplés à la chirurgie n'induisent cependant pas une amélioration significative de la médiane de survie. D'autres agents plus récents et utilisés en injection intra-tumorale (inhibiteurs de la tyrosine kinase comme le mastinib et le toceranib) sont des alternatives intéressantes mais encore peu étudiées dans le cadre du MO (Pazzi *et al.*, 2022). De manière plus générale, des études effectuées chez l'Homme montre que le MO est une tumeur extrêmement résistante à la chimiothérapie (Bergman, 2007).
- ❖ La **radiothérapie** est une méthode basée sur l'irradiation de la tumeur à l'aide d'un rayonnement ionisant permettant de tuer les cellules tumorales et ainsi de réduire la taille de la tumeur. Tout comme la chimiothérapie, elle est capable d'induire des effets secondaires, qui sont surtout des réactions cutanées liées à l'irradiation. Cette méthode, utilisée seule, permet de contrôler localement l'évolution du MO (Pazzi *et al.*, 2022). Des chiens ont été soumis à des programmes de radiothérapie utilisant des doses croissant toutes les semaines, comprises entre 6 à 9 Gy jusqu'à atteindre une dose totale de 24 à 36 Gy et ont montré un taux de rémission complète de 53 à 69% et de rémission partielle de 25 à 30% (Bergman, 2007).
- ❖ Enfin, l'**immunothérapie** est une alternative intéressante permettant l'utilisation de principes actifs capables d'activer le système immunitaire du patient et de le diriger contre les cellules tumorales (Waldman *et al.*, 2020). Bien que peu efficaces dans un premier temps, le développement de vaccins à ADN a permis d'améliorer grandement l'efficacité de ce type de traitement, qui constitue aujourd'hui une alternative intéressante aux thérapies anticancéreuses conventionnelles par la présence d'une bonne innocuité et d'une efficacité notable (Bergman, 2007).

3.4.2. Présentation du vaccin

3.4.2.1. Composition du vaccin

Le vaccin Oncept™ est un vaccin commercialisé par Boehringer et autorisé aux Etats-Unis en 2007 comme traitement complémentaire de la chirurgie et de la chimiothérapie pour les MO de stade II et III (Dory & Jestin, 2021; Pazzi *et al.*, 2022; Treggiari *et al.*, 2016; Verganti *et al.*, 2017). Le plasmide vaccinal comprend le gène codant la tyrosinase et provenant de l'Homme. Ce gène code la tyrosinase humaine (huTYR), qui est une enzyme de nature glycoprotéique impliquée dans la synthèse de mélanine et qui est sur-exprimée par les mélanocytes tumoraux (Grosenbaugh *et al.*, 2011; Verganti *et al.*, 2017). La huTYR est une enzyme similaire à la tyrosinase canine (homologue à 85%), mais diffère suffisamment de la tyrosinase canine pour induire une réponse immunitaire ciblée sur les mélanocytes tumoraux (Grosenbaugh *et al.*, 2011; Pellin, 2022).

Après injection du vaccin, l'antigène vaccinal huTYR est exprimé par les mélanocytes tumoraux afin de produire de la mélanine (Grosenbaugh *et al.*, 2011; Pellin, 2022). La huTYR étant reconnu comme antigène exogène, il est pris en charge à l'intérieur des mélanocytes tumoraux puis associé au CMH-II. Dans ces cellules, la transformation tumorale favorise la surexpression du gène codant pour les molécules du CMH-II. Les mélanocytes normaux ne présentant pas de molécule du CMH-II, la présence d'une grande quantité de molécules du CMH-II associées à la huTYR à la surface des mélanocytes tumoraux est reconnue par les cellules du système immunitaire, provoquant l'induction d'une réponse effectrice dirigée contre le mélanome (Grosenbaugh *et al.*, 2011).

3.4.2.2. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal repose sur quatre injections de 0.4 mL de vaccin, espacées de deux semaines d'intervalle. Des rappels sont conseillés tous les 6 mois (Dory & Jestin, 2021; Drugs "Oncept for Dogs", 2023).

La vaccination est réalisée en regard de la face médiale de la cuisse, caudalement au fémur, à l'aide d'un dispositif de vaccination transdermique nommé Vet Jet® (Figure 41) (Drugs "Oncept for Dogs", 2023). L'injection transdermique possède l'avantage comparé aux autres voies d'administration de potentialiser la réponse effectrice Th1, à l'origine de la mise en place d'une réponse CTL (Grosenbaugh *et al.*, 2011).

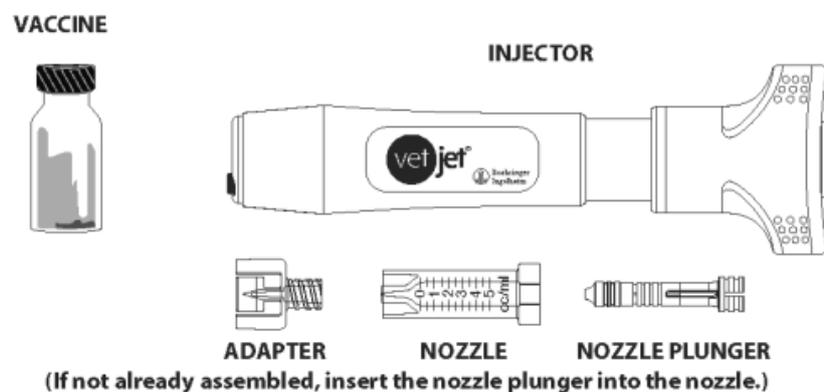


Figure 41 : Dispositif de vaccination transdermique Vet Jet® (Drugs "Oncept for Dogs", 2023)

3.4.2.3. Efficacité vaccinale

Les études effectuées sur le vaccin commercialisé tendent vers des résultats contradictoires. D'un côté certaines études observent une amélioration significative du temps moyen de survie après traitement, mais dans toutes ces études, les chiens avaient reçu des traitements supplémentaires tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie (Grosenbaugh *et al.*, 2011; Verganti *et al.*, 2017).

De l'autre côté, de nombreuses études ont démontré que l'utilisation seule du vaccin contre les MO de stades II et III ne permettait pas d'améliorer significativement la médiane de survie post-traitement. L'hypothèse avancée permettant d'expliquer cette différence entre les résultats de ces études est l'utilisation d'autres traitements comme la radiothérapie et la chimiothérapie, qui ont un impact positif sur la médiane de survie (Ottnod *et al.*, 2013; Pellin, 2022; Treggiari *et al.*, 2016).

Ces résultats montrent que l'efficacité réelle de ce vaccin reste encore à démontrer et qu'à ce jour, il ne permet pas d'améliorer significativement la durée de vie de l'animal ainsi que la progression du MO. Des études complémentaires sont en cours et cherchent à améliorer la vaccination en modifiant le gène exprimé, ainsi que la méthode d'administration (électroporation *in vivo*, système d'injection intradermique, vaccin à cellules dendritiques, ...) mais n'offrent pas encore de réelle efficacité (Pazzi *et al.*, 2022).

3.4.2.4. Effets secondaires

Contrairement à l'efficacité, les études sont unanimes sur un point : l'innocuité du vaccin Oncept®. Les traitements anticancéreux actuels (chimiothérapie, radiothérapie), sont très peu spécifiques et entraînent de nombreux effets secondaires pouvant être graves. La thérapie génique par la vaccination à ADN offre une méthode alternative à ces traitements conventionnels, intéressante notamment par son approche spécifique et peu cytotoxique. En effet, le vaccin produit une protéine utilisable uniquement par les mélanocytes tumoraux. Les effets secondaires de ce vaccin sont ainsi considérés comme minimes et se traduisent dans la majorité des cas par des inflammations locales, souvent secondaires à l'injection : douleur au point d'injection, tuméfaction et chaleur, raideur ou boiterie du membre vacciné, érythèmes, ... (Grosenbaugh *et al.*, 2011; Pellin, 2022)

Des réactions systémiques, mais peu spécifiques, ont également été rapportés à la suite de l'administration de ce vaccin comme une léthargie, une hyporexie, une polyuro-polydipsie, des vomissements ainsi que de la diarrhée, un appétit augmenté, et de l'incontinence, mais pourraient être reliées à d'autres facteurs que la vaccination (Grosenbaugh *et al.*, 2011).

4. Etat des recherches en cours sur d'autres applications des vaccins à ADN

4.1. Vaccins à ADN contre les maladies infectieuses

La vaccination est un outil prophylactique très important dans la lutte contre les maladies infectieuses. En effet, elle permet d'induire une immunisation active contre un grand nombre d'agents pathogènes. Cependant, il existe encore à ce jour des agents pathogènes pour lesquels aucun vaccin conventionnel ne permet d'induire une protection immunitaire suffisante. C'est le cas par exemple du virus de l'immunodéficience féline (FIV), appartenant à la famille des Rétroviridae et au genre des Lentivirus (Dunham, 2002). Des études ont montré que les vaccins conventionnels, et plus particulièrement les vaccins vivants atténués étaient capables d'induire une immunité active contre les souches de FIV homologues à la souche vaccinale (proches génétiquement), mais pas contre les souches hétérologues plus virulentes. Les premiers essais avec les vaccins à ADN ont mis en évidence la mise en place d'une immunité protectrice basée sur une forte réponse cellulaire CTL, sans production d'anticorps neutralisants. D'autres études ultérieures ont montré que l'utilisation de l'IFN- γ comme adjuvant permettait en théorie de renforcer cette réponse cellulaire, mais aucune amélioration de la réponse immunitaire n'a été observée avec cet adjuvant (Dunham, 2002; Gupta *et al.*, 2007; Hosie *et al.*, 1995). Les vaccins à ADN constituent une alternative intéressante pour la prévention du FIV, mais nécessitent de tester d'autres cytokines pour obtenir une réponse immunitaire cellulaire protectrice (Gupta *et al.*, 2007).

Certains vaccins à ADN ont pour objectif d'améliorer les vaccins conventionnels déjà existants pour certaines maladies infectieuses. En effet, les vaccins conventionnels et plus particulièrement les vaccins vivants atténués possèdent une bonne immunogénicité mais une mauvaise innocuité. Les vaccins à ADN possèdent une excellente innocuité (bien que la question de l'intégration du plasmide à ADN dans le génome de l'individu vacciné doit encore être étudiée) et constituent une solution sûre d'utilisation, mais manque encore d'immunogénicité car ils induisent surtout une production d'anticorps localisée au point d'injection (Brisse *et al.*, 2020). C'est le cas du vaccin à ADN contre la maladie d'Aujeszky chez le porc : les vaccins inactivés produits pour cette maladie possédaient une faible immunogénicité. Des vaccins à ADN qui encodent des gènes codant plusieurs glycoprotéines, les gpB, gpC, gpD et gpE ont été développés. Ils possèdent une bien meilleure immunogénicité que les vaccins inactivés et sont capables d'induire une immunité totale contre les souches modérément virulentes ainsi qu'une immunité partielle contre les souches très virulentes, mais restent tout de même moins immunogènes que les vaccins vivants atténués. Cependant, les vaccins à ADN restent plus sûrs d'utilisation que les vaccins vivants atténués et le développement de leur immunogénicité pourrait permettre de produire un vaccin conférant une immunité protectrice et sûr d'utilisation (Dunham, 2002). De plus, la réponse humorale induite par la vaccination avec un vaccin à ADN contre la maladie d'Aujeszky permet la production d'anticorps très spécifiques de la glycoprotéine exprimée par le vecteur plasmidique vaccinal, permettant le développement d'outils diagnostics permettant la reconnaissance d'autres glycoprotéines du virus, non exprimées par le plasmide. Les vaccins à ADN permettent donc la mise en place d'une stratégie DIVA (OIE Terrestrial Manual "Aujeszky disease", 2018).

L'émergence de nouvelles maladies ou la réémergence d'agents pathogènes disparus, ou dont le risque était maîtrisé impliquent des mesures rapides afin d'enrayer la transmission de l'agent pathogène à grande échelle. Il faudrait environ 5 à 18 ans pour produire un vaccin conventionnel, de sa conceptualisation à la phase d'essais cliniques, avec un coût de production estimé entre 200 millions et 500 millions de dollars, limitant ainsi leur production aux pays ayant les moyens de les produire. Les vaccins à ADN possèdent l'avantage d'être très rapides à produire en raison de la rapidité de séquençage de la souche responsable d'une épidémie. Chez l'Homme, le développement d'outils de séquençage a notamment permis de diminuer le temps de production d'un vaccin de 20 mois pour l'épidémie de syndrome aigu respiratoire sévère (SARS) à Coronavirus de 2003 à 3,25 mois en 2016 pour l'épidémie de Zika. La rapidité de production d'un vaccin est essentielle dans l'enrayement d'une épidémie en cours (Brisse *et al.*, 2020).

4.2. Vaccins à ADN contre les néoplasies

Les vaccins conventionnels sont des vaccins majoritairement utilisés en préventif, dans le cadre de la prophylaxie médicale. Les nombreux progrès effectués en biologie moléculaire ont permis de mettre au point des vaccins thérapeutiques, qui ont pour but de soigner une maladie. Ces vaccins thérapeutiques sont notamment mis au point pour lutter contre l'évolution de néoplasies et permettent de booster le système immunitaire et de rediriger son action contre la tumeur. Pour cela, les vaccins à ADN sont des candidats intéressants et ont même été commercialisés (ex : Oncept™). Le principe repose sur l'insertion de gènes codant des protéines marqueurs spécifiques de la tumeur, qui ne sont pas reconnues par les CPA dans le plasmide vaccinal. Les vaccins à ADN présentent l'avantage par rapport aux vaccins conventionnels d'avoir une bonne innocuité. C'est un paramètre qui a été important dans le développement de vaccins chez les individus immunodéprimés. Un autre avantage des vaccins à ADN est qu'ils permettent d'obtenir un antigène fidèle à l'antigène tumoral, permettant ainsi de limiter l'apparition de phénomènes de tolérance immunitaire. Bien que les vaccins à ADN constituent une solution intéressante contre les néoplasies, les vaccins à ARN semblent être plus prometteurs (Brisse *et al.*, 2020).

4.3. Vaccins à ADN contre les parasites

Il existe de nos jours une grande variété de traitements antiparasitaires ayant une efficacité démontrée sur les infestations parasitaires. Cependant, ces traitements peuvent être à l'origine de nombreux effets secondaires pouvant même conduire à la mort par effet neurotoxique chez certaines races de chien ayant une déplétion du gène MDR1 (Multi-Drug Resistance gene 1) (Geyer & Janko, 2012). La surconsommation d'antiparasitaires est un autre problème à l'origine de l'apparition de parasites résistants pour ces molécules. La vaccination permet de développer une immunité protectrice contre les parasites. Le principal exemple permettant d'illustrer l'apport de la vaccination pour la protection contre les parasites est le développement d'un vaccin contre la toxoplasmose (Warner *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2021; X. Zhang *et al.*, 2023). *Toxoplasma gondii* est un parasite infestant une grande variété de vertébrés, dont les Hommes, chez qui il évolue de manière asymptomatique dans la majorité des cas mais peut être à l'origine d'avortements et d'encéphalites. On retrouve la même symptomatologie chez de nombreuses autres espèces telles que les brebis, les chats, les bovins, les chiens, etc... (Warner *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2021; X. Zhang *et al.*, 2023)

Toxoplasma gondii possède trois formes distinctes au cours de son cycle : l'ookyste, le tachyzoïte et le bradyzoïte. Le développement d'un vaccin protégeant parfaitement contre la toxoplasmose doit permettre d'induire une protection contre les trois formes du parasite. De nombreux vaccins conventionnels ont été testés et ont donné des résultats variables : les vaccins inactivés et à sous-unités ne sont pas suffisamment immunogènes bien que sûrs d'utilisation, et les vaccins vivants atténués permettent d'obtenir une immunité complète mais la souche mutante de toxoplasme est susceptible de revenir à un phénotype virulent. Les vaccins à ADN ont l'avantage d'être versatiles et peuvent encoder de nombreux gènes traduisant des antigènes de surface (protéines de la famille des SAG des tachyzoïtes), ou des protéines sécrétées par *Toxoplasma* (protéines MIC, GRA et ROP), et d'être conçus pour induire le minimum d'effets secondaires. Cependant, les vaccins à ADN actuels contre *Toxoplasma* induisent une réponse immunitaire insuffisante, en raison de leur incapacité à mimer le mécanisme d'infestation cellulaire de *T.gondii* comme les vaccins vivants atténués le font, et nécessitent des améliorations en terme d'immunogénicité pour constituer une réelle alternative, notamment avec l'apport des adjuvants et l'avènement d'outils bio-informatiques. Des études suggèrent que de tels vaccins pourraient apparaître sur le marché sous cinq ans, en raison de la réduction du temps nécessaire afin de produire un vaccin à ADN (Warner *et al.*, 2021).

4.4. Vaccins à ADN contre les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique, l'arthrite rhumatoïde, la myasthénie gravis et bien d'autres, touchent de nombreux individus chez l'Homme et ont même été décrites chez les animaux. Il n'existe que peu de traitements contre ces maladies, qui passent par l'utilisation de molécules immunosuppressives, non curatives et à l'origine de nombreux effets secondaires entraînant des complications plus difficiles à maîtriser que la maladie en elle-même (Garren, 2009; N. Zhang & Nandakumar, 2018). L'étiologie exacte des maladies auto-immunes n'est pas encore parfaitement connue mais on suppose une action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux : dans le cas de l'arthrite rhumatoïde chez l'Homme, le tabagisme, certaines hormones et les infections bactériennes sont connus pour favoriser l'apparition de cette maladie, tandis qu'un polymorphisme d'un simple nucléotide du gène PTPN22 C1858T est un facteur génétique favorisant le développement de l'arthrite rhumatoïde. Il existe plusieurs mécanismes à l'origine des maladies auto-immunes dont la surstimulation de certaines populations de macrophages par les lymphocytes T, la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B, les phénomènes de réactions croisées entre les antigènes du soi et les auto-anticorps produits par les lymphocytes B et bien d'autres mécanismes. Un vaccin à ADN encodant l'auto-antigène CII a été testé sur des rats atteints d'arthrite auto-immune et a permis de diminuer la sévérité de l'arthrite en favorisant la mise en place d'une réponse T_{reg} , et de produire de nombreux lymphocytes CD4+ CD25+ intervenant dans les réactions de régulation de la réponse immunitaire en induisant le passage d'une réponse cytotoxique Th1 à une réponse humorale Th2. Les vaccins à ADN sont donc des candidats très intéressants pour la prise en charge thérapeutique des maladies auto-immunes. Cependant, des recherches supplémentaires doivent être effectuées afin d'améliorer cette technologie, certains vaccins à ADN possédant une structure contenant des séquences CpG non méthylées, connues pour inhiber les lymphocytes T CD4+CD25+ (N. Zhang & Nandakumar, 2018).

Les vaccins à ADN présentent de nombreuses applications intéressantes concernant la prophylaxie vétérinaire contre les maladies infectieuses et constituent même dans certains cas des outils thérapeutiques permettant la lutte contre certaines maladies auto-immunes et cancers, mais font face au développement de nouveaux vaccins génétiques qui semblent tout aussi prometteurs, mis en avant depuis quelques années et la pandémie de COVID-19 : les vaccins à ARNm.

Partie III : Etat des lieux des vaccins à ARN en médecine vétérinaire

1. Historique des vaccins à ARN

L'ARN messenger (ARNm) est une molécule découverte en 1961 par Brenner et son équipe, jouant un rôle d'intermédiaire dans la synthèse de protéines à partir de l'ADN. Il a fallu attendre une vingtaine d'années, pour développer l'idée d'utiliser l'ARNm comme outil thérapeutique. En effet, Malone et son équipe mettent en évidence une propriété fondamentale de l'ARNm : sa capacité à transfecter les cellules eucaryotes et à être exprimé puis traduit dans ces cellules-hôtes. C'est en 1990 et grâce aux travaux de Wolff et de son équipe, que les premiers essais d'injection intramusculaire *in vivo* d'ARNm exprimé *in vitro* chez des souris, démontrant alors la possibilité de produire des vaccins à partir de l'ARNm. Depuis ces premiers essais, la technologie des vaccins à ARNm ne cesse de se développer et de nombreuses nouvelles méthodes permettant d'améliorer les performances de ces vaccins émergents. C'est ainsi qu'ont lieu en 2002 les premiers essais cliniques de vaccins à ARNm contre les métastases de cancers prostatiques, utilisant la technique de transfection *ex vivo* des cellules dendritiques. En 2009, l'amélioration de la stabilité de la traduction des vaccins à ARNm est permise grâce à la modification des nucléosides. En 2009, les premiers essais cliniques d'injection *in vivo* d'ARNm ont lieu (Xu *et al.*, 2020). La pandémie de COVID-19 de 2019 a mis sur le devant de la scène les vaccins à ARNm et a surpris l'opinion publique par leur capacité à être produits rapidement à grande échelle. En raison des conséquences importantes sur la santé publique ainsi que des conséquences socio-économiques mondiales, les recherches se sont accentuées pour mettre rapidement au point un vaccin permettant d'enrayer la pandémie, ce qui a entraîné le développement de nouvelles améliorations de cette technologie (Sandbrink & Shattock, 2020; Su *et al.*, 2022; Y. Wang *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020).

2. Caractéristiques des vaccins à ARN

2.1. Construction des vaccins à ARNm

2.1.1. Types de vaccins à ARNm

Il existe plusieurs types de vaccins à ARNm mais deux voire trois types se détachent du reste : il s'agit des vaccins à ARNm ne se répliquant pas (Non-Replicating mRNA ou NRM), les vaccins à ARNm se répliquant (Self-amplifying mRNA ou SAM) et enfin les vaccins à ARNm constitué de deux séquences à ARNm permettant de s'auto-amplifier (Trans-amplifying mRNA ou taRNA) (Bhattacharya *et al.*, 2022; Le *et al.*, 2022; Sandbrink & Shattock, 2020; Schmidt & Schnierle, 2023).

- ❖ Les **vaccins NRM** (Figure 42A) sont des structures d'ARNm encodant le minimum nécessaire afin de produire un antigène :
 - Une coiffe localisée à l'extrémité 5', qui est une structure nucléotidique (guanosine méthylée en N7 chez les eucaryotes) impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique mais qui possède surtout un rôle de protection de l'ARNm de la dénaturation par les 5'-3' RNAses. Le profil de méthylation de la coiffe des ARNm est un élément permettant au système immunitaire inné de distinguer l'ARNm exogène de l'ARNm endogène (Ramanathan *et al.*, 2016; S *et al.*, 2020; Schmidt & Schnierle, 2023).

- Une séquence 5'-UTR (Untranslated Region), qui est une structure nucléotidique non traduite et disposant une conformation tertiaire particulière permettant la reconnaissance de l'ARNm par le complexe ribosomal (Le *et al.*, 2022; S *et al.*, 2020; Schmidt & Schnierle, 2023). Une séquence Kozak est souvent ajoutée sur la séquence 5'-UTR afin d'améliorer la traduction des ARNm. Cette séquence Kozak est une séquence conservée chez tous les organismes eucaryotes et est située sur le codon start AUG des ARNm eucaryotes (Benitez-Cantos *et al.*, 2020; Schmidt & Schnierle, 2023).
 - Un ORF (Open Reading Frame) dans lequel est inclus la séquence de l'antigène vaccinal (Schmidt & Schnierle, 2023).
 - Une séquence 3'-UTR, qui est une séquence non traduite impliquée dans la stabilité de l'ARNm, dans de nombreux mécanismes de régulation de la traduction, dans la polyadénylation et l'adressage des ARNm (Barrett *et al.*, 2012; Le *et al.*, 2022; Schmidt & Schnierle, 2023).
 - Une queue polyadénylée (Poly-A) située à l'extrémité 3', qui est une séquence d'environ 200 acides aminés permettant de stabiliser l'ARNm en le protégeant de sa dénaturation par les exonucléases 3'-5' (Le *et al.*, 2022; Schmidt & Schnierle, 2023).
- ❖ Les **vaccins SAM** (Figure 42B) reprennent la même structure que les vaccins NRM, mais encodent des gènes de la machinerie virale et notamment un gène codant pour une réplicase virale, qui permet l'auto-amplification de l'ARNm. De nombreuses machineries virales ont été testées mais les gènes les plus utilisés dérivent des Alphavirus (comme le virus de l'encéphalite vénézuélienne ou le virus de la forêt Semliki) (Le *et al.*, 2022). Les vaccins SAM dérivés des Alphavirus contiennent des séquences codant pour des protéines non structurales ayant diverses fonctions : nsP1 possède une activité enzymatique permettant la méthylation de la structure « cap », nsP2 possède une activité hélicase favorisant la réplication de l'ARNm, nsP3 possède un rôle encore inconnu et nsP4 constitue l'ARN polymérase ARN-dépendante permettant la réplication de l'ARNm vaccinal (réplicase) (Jose *et al.*, 2009).
- ❖ Les **vaccins taRNA** (Figure 42C) constituent une variation de la technologie des vaccins SAM et sont composés de deux séquences d'ARNm, l'une basée sur la structure d'un SAM d'Alphavirus dont le gène de la réplicase a été délété, et l'autre encodant un gène régulateur de la réplicase, permettant une transactivation de l'expression du premier ARNm en grande quantité (Beissert *et al.*, 2020; Le *et al.*, 2022).

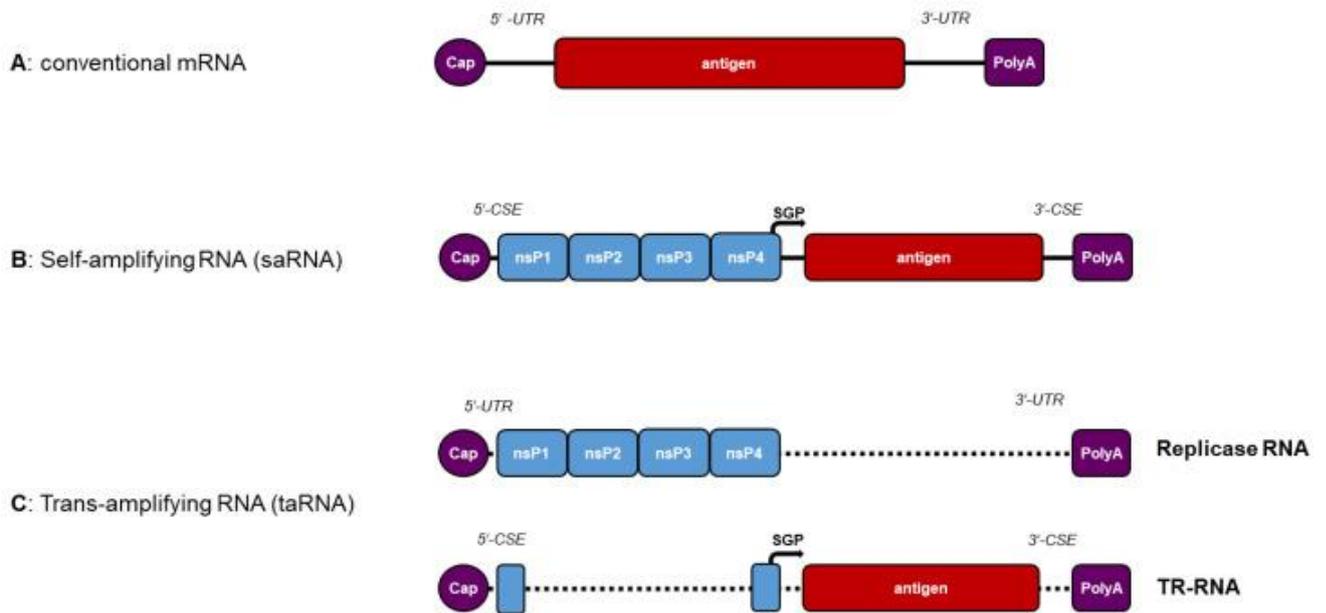


Figure 42 : Schéma des différents types de vaccins à ARNm selon Schmidt & Schnierle, 2023

2.1.2. Production des vaccins à ARNm

Le processus de fabrication des vaccins à ARNm se déroule selon plusieurs étapes *in vitro* (Figure 43 et Figure 44) :

- ❖ La première étape consiste à **sélectionner l'antigène d'intérêt** permettant d'induire une réponse immunitaire optimale. Pour cela, de nombreuses simulations à l'aide d'outils informatiques permettent de mettre au point le vaccin candidat qui sera produit ultérieurement (Figure 43). La mise au point d'un vaccin à ARNm exprimant un antigène de nature protéique passe par l'identification de la séquence d'un gène codant pour cet antigène. Il existe de nombreuses bases de données de séquences génomiques telles que GenBank ou PBD. Une fois la séquence antigénique identifiée, des simulations informatiques vont permettre d'identifier et de distinguer les épitopes de cet antigène qui permettront d'induire une réponse T cytotoxique, de ceux qui induisent une réponse T helper et de ceux qui induisent une réponse humorale. Cette étape d'identification permet la sélection d'épitopes hautement immunogènes et ayant le plus faible potentiel allergénique possible. Une fois cette étape de sélection antigénique achevée, d'autres simulations informatiques permettent de déterminer le pourcentage de la population couverte par le choix de ces épitopes, c'est-à-dire le pourcentage d'individus vaccinés pour lesquels une immunité protectrice sera acquise par l'utilisation des séquences d'épitopes choisies (Bhattacharya *et al.*, 2022).

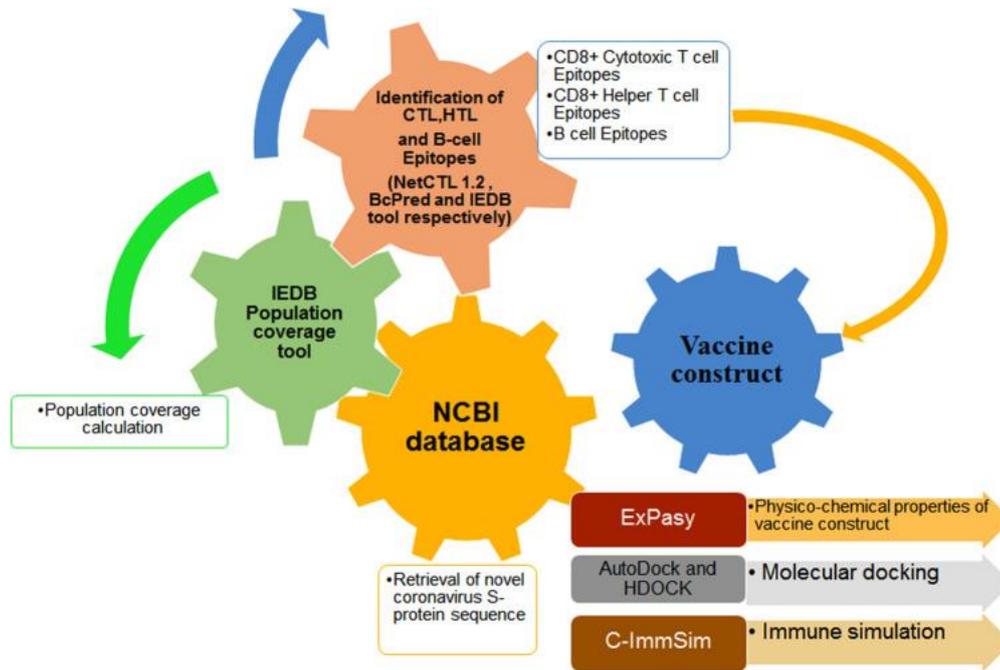


Figure 43 : Diagramme illustrant l'utilisation des outils informatiques dans la mise au point du vaccin contre le SARS-CoV2 selon Bhattacharya et al., 2022

- ❖ L'étape de **construction du vaccin** intervient ensuite. Pour cela, la séquence antigénique est introduite dans un plasmide à ADN, qui servira en tant qu'unité transcriptionnelle permettant de produire une grande quantité d'ARNm vaccinal (Linares-Fernandez *et al.*, 2020). C'est également à cette étape que le choix du type de vaccin à ARNm est fait, notamment par l'ajout d'une séquence de réplicase pour les vaccins SAM ou la fabrication de deux vecteurs pour les vaccins taRNA (Bhattacharya *et al.*, 2022). La séquence plasmidique contient un promoteur de phage T7, qui permet d'obtenir un bon rendement de production. Une méthode alternative à l'utilisation de plasmides à ADN est le recours à la PCR (Figure 44A). La production de l'ARNm vaccinal est permise par l'ajout d'une ARN polymérase de phage T7. Le capping en 5' de l'ARNm vaccinal est obtenu en une étape lors de la transcription par l'ajout de structures analogues à la structure Cap (ARCA ou Clean-Cap) ou en deux étapes, par une réaction enzymatique, après l'étape de transcription. Il résulte de ces réactions plusieurs produits : des fragments d'ADN, des ARNdb, des ARNsb sans extrémité Cap et des ARNsb avec extrémité Cap, qu'il faudra purifier (Figure 44B) (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

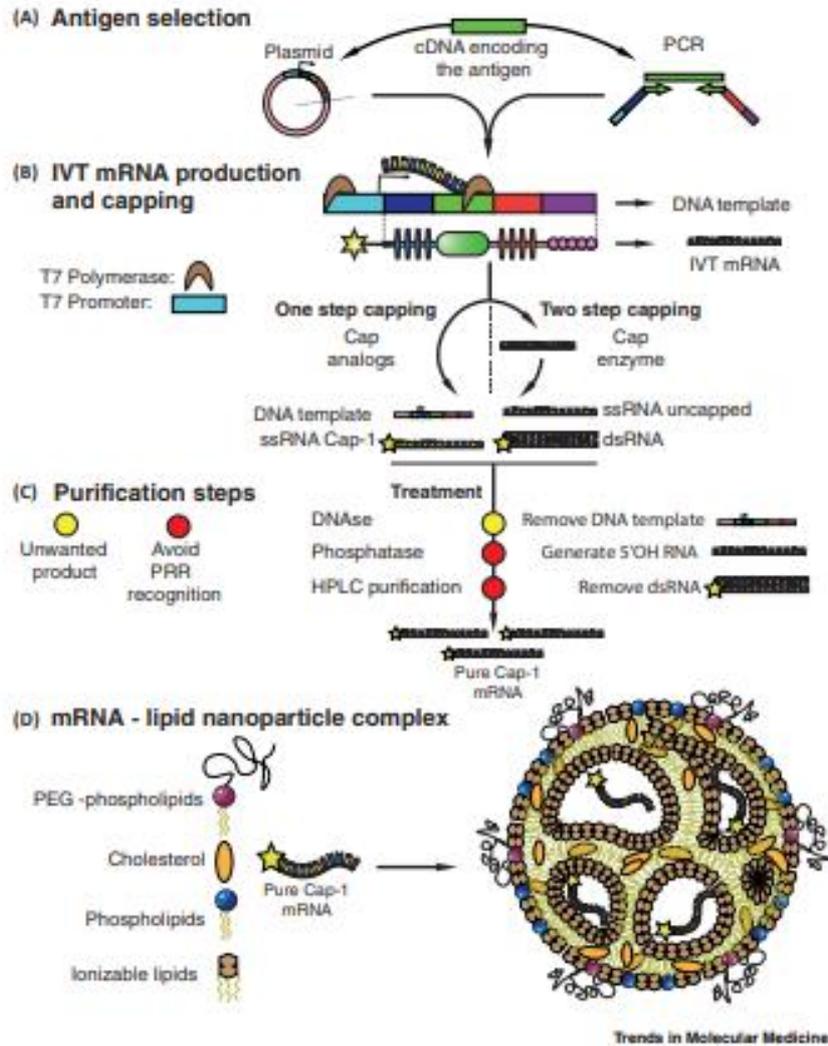


Figure 44 : Procédé de fabrication des vaccins à ARNm *in vitro* selon Linares-Fernandez *et al.*, 2020

- ❖ **L'étape de purification** (Figure 44C) permet d'éliminer les fragments d'ADN et d'ARNm non désirés, qui pourraient avoir un effet négatif sur la mise en place d'une immunité protectrice chez l'individu vacciné. Les fragments d'ADN sont éliminés par l'ajout de DNases, les ARNm ne possédant pas de structure Cap peuvent être déphosphorylés et les ARNm d'intérêt (ARNsb avec structure Cap) sont soumis à une chromatographie haute-performance en phase liquide (HPLC) pour être purifiés des ARNdb (permet d'éliminer 50% des ARNdb). Une autre méthode permet d'éliminer jusqu'à 90% des ARNdb, il s'agit de la FPLC pour Fast Protein Liquide Chromatography, qui comble les défauts de la HPLC. L'étape de purification est primordiale car elle permet d'obtenir un haut niveau d'expression de l'antigène par les ARNm *in vivo*, et donc un niveau d'immunogénicité du vaccin satisfaisant (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

- ❖ La dernière étape consiste à ajouter à l'ARNm vaccinal les **technologies adjuvantes** ou de délivrance permettant d'améliorer l'efficacité du vaccin. La *Figure 44D* illustre l'utilisation de nano-complexes lipidiques capables de contenir de nombreux ARNm vaccinaux, améliorant la stabilité de l'ARNm et sa délivrance aux cellules cibles chez l'individu vacciné. Il ne s'agit pas de la seule méthode permettant d'améliorer les performances vaccinales et ces autres méthodes seront abordées dans la partie consacrée aux technologies d'amélioration des vaccins à ARNm (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

2.1.3. Avantages et inconvénients des différents types de vaccins à ARNm

Les vaccins NRM sont des vaccins possédant une structure d'ARNm mature possédant le moins de modifications susceptibles de favoriser la survenue de réactions de dégradation de l'ARNm vaccinal par les cellules de l'immunité innée. L'absence d'inclusion de séquences supplémentaires fondamentales à leur fonctionnement permet l'ajout de séquences antigéniques ne nécessitant pas de restriction de taille et permet ainsi le choix d'une grande variété d'antigènes (Xu *et al.*, 2020). Leur limite se trouve dans leur incapacité à produire une grande quantité d'antigènes et de maintenir une réaction immunitaire suffisante *in vivo* (Y. Wang *et al.*, 2021).

Les vaccins SAM quant à eux possèdent des caractéristiques supplémentaires en faisant de meilleurs candidats pour obtenir une immunité protectrice. En effet, par leur propriété d'autoréplication, les vaccins SAM peuvent induire la production d'une grande quantité d'antigènes à partir d'une faible quantité d'ARNm, permettant d'améliorer l'immunogénicité et la durée de la réponse immunitaire (jusqu'à 2 mois). L'injection de ce type de vaccin permet d'imiter une infection chronique par un agent pathogène, et ainsi de favoriser la reconnaissance des PAMP par les cellules dendritiques. Cependant, cette propriété d'autoréplication nécessite l'ajout d'une machinerie virale permettant d'exprimer une réplicase d'origine virale, qui réduit la taille de la séquence antigénique et favorise l'apparition de réactions de dégradation de l'ARNm vaccinal par les cellules de l'immunité innée, ainsi que de réactions immunitaires incontrôlées (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Un autre avantage de cette technologie est l'amélioration de la stabilité des ARNm et la praticité d'emploi (Y. Wang *et al.*, 2021). Les vaccins SAM sont également capables de produire des auto-adjuvants lors de leur réplication sous la forme d'ARNdb, qui sont reconnus par le système immunitaire inné (Pardi *et al.*, 2018).

Les antigènes produits par les vaccins SAM possèdent une grande taille et ont un haut degré de structure secondaire, ce qui limite leur niveau de production. Pour pallier cela, les vaccins taRNA ont été mis au point. Ce système permet la réplication d'ARNm de plus petite taille ce qui augmente leur stabilité. Il présente également l'avantage d'induire moins de réactions avec l'immunité innée, favorisant ainsi une meilleure expression de l'antigène d'intérêt (Le *et al.*, 2022). Les vaccins taRNA sont plus rapides à produire que les vaccins SAM car le brin d'ARNm contenant la séquence de la réplicase a toujours la même constitution, seul le brin d'ARNm contenant le gène d'intérêt doit être produit et peut même être produit à l'avance en fonction des besoins saisonniers (Beissert *et al.*, 2020).

2.2. Mode d'action des vaccins à ARNm

Les vaccins à ARNm sont composés d'un brin d'ARNm encodant une séquence codant pour un antigène permettant d'induire, une fois exprimé, une immunité durable et efficace. Tout comme les vaccins à ADN, les vaccins à ARNm détournent la machinerie cellulaire afin d'exprimer leur séquence immunogène, mais ils se démarquent par leur prise en charge directe par les ribosomes de la cellule cible sans passer par le noyau, ce qui permet d'éliminer la problématique de l'intégration du vaccin au génome de l'individu vacciné. La *Figure 45* permet d'illustrer le mode d'action des vaccins à ARNm : les auteurs ont pris le parti d'encapsuler l'ARNm vaccinal dans un liposome, qui va favoriser l'endocytose de la particule ribonucléique (Le *et al.*, 2022). Il existe de nombreuses autres méthodes permettant d'améliorer l'adressage de l'ARNm vers la cellule cible, qui seront abordées dans la partie consacrée aux technologies d'amélioration de ces vaccins. Une fois dans le cytoplasme de la cellule, les ARNm encore inclus dans les vésicules endosomales sont libérés et sont pris en charge par les ribosomes afin de produire des antigènes de nature protéique. Ces antigènes vont permettre d'induire une immunité cellulaire et humorale par le biais de plusieurs mécanismes (Chaudhary *et al.*, 2021; Le *et al.*, 2022) :

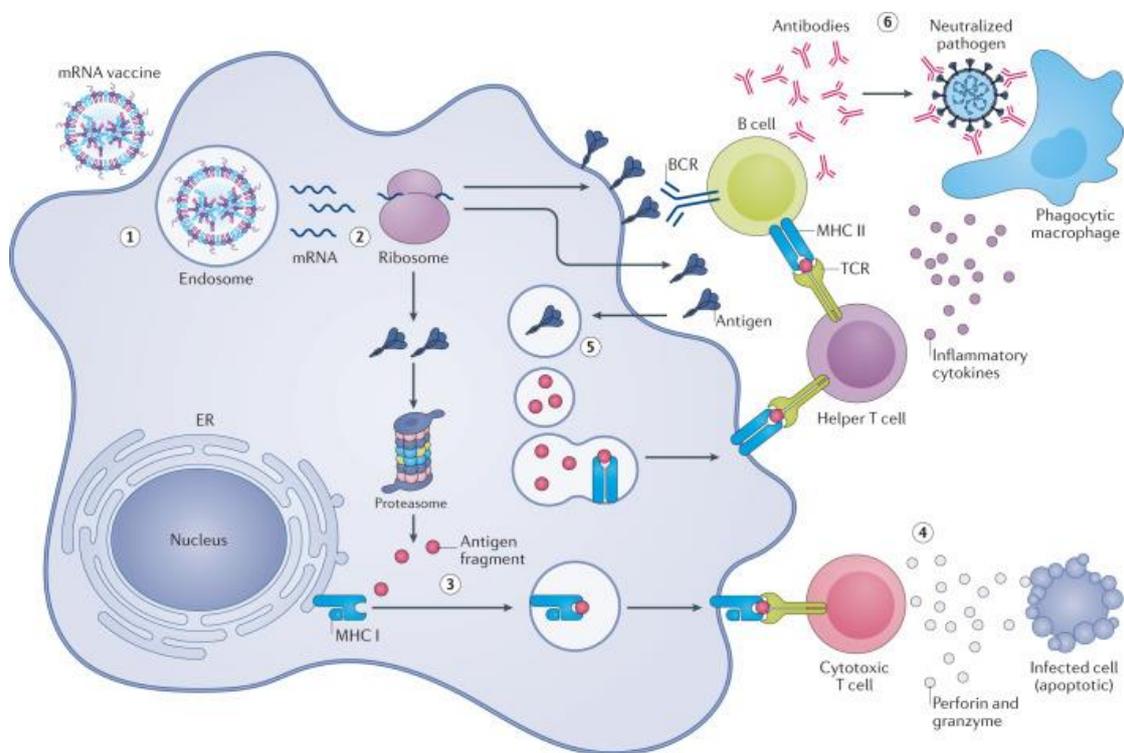


Figure 45 : Schéma du mode d'action des vaccins à ARNm selon Chaudhary *et al.*, 2021

- ❖ Les antigènes produits peuvent être dénaturés en fragments peptidiques par le système ubiquitine-protéasome de la cellule, qui sont par la suite associés aux molécules du CMH-I. Le complexe CMH-I/peptide est ensuite transporté jusqu'à la membrane plasmique de la cellule et présenté à sa surface, où il sera reconnu par les lymphocytes CD8+ afin d'induire une réponse CTL (Chaudhary *et al.*, 2021; Le *et al.*, 2022).

- ❖ Les antigènes peuvent également être sécrétés dans le milieu extra-cellulaire puis être endocytés par d'autres CPA. Une fois dans le cytoplasme de ces CPA, ils sont dénaturés par des enzymes protéolytiques et associés aux molécules du CMH-II, pour former un complexe peptide/CMH-II qui sera présenté à la surface de la cellule et reconnu par les lymphocytes T CD4+ afin d'induire une réponse immunitaire Th (Chaudhary *et al.*, 2021; Le *et al.*, 2022).
- ❖ Enfin, les antigènes sécrétés sont susceptibles d'être reconnus par les récepteurs BCR des lymphocytes B, permettant ainsi leur activation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Chaudhary *et al.*, 2021; Le *et al.*, 2022).

Les vaccins à ARNm sont également capables de stimuler les cellules effectrices de l'immunité innée par le biais de la reconnaissance de l'ARNm vaccinal par les PRR des cellules immunitaires et notamment les CPA (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

- ❖ Au sein de la vésicule endosomale, le TLR-3 est capable, par exemple, de reconnaître l'ARNm double brin (ARNdb), activant ainsi le TRIF, domaine de la protéine TIR impliquée dans les voies de production des interférons de type I. La reconnaissance de l'ARNm simple brin (ARNsb) exogène par le TLR-7 ou le TLR-8 est responsable de la production du facteur de différenciation myéloïde MyD88 et induit la production d'IFN- β et de cytokines pro-inflammatoires (*Figure 46*) (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).
- ❖ Dans le cytoplasme de la cellule, d'autres PRR sont impliqués dans la reconnaissance des ARNm exogènes, comme les récepteurs RIG-I-like (Retinoic acid-inducible gene-I-like) et récepteurs NLR (NOD-like receptors), qui sont également impliqués dans la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires. Les IFN-I sont capables d'activer de nombreux gènes impliqués dans la dégradation de l'ARNm. Les protéines kinases ARN-dépendantes (PKR) se lient aux ARNdb et phosphorylent un facteur d'initiation d'origine eucaryote (eIF-2), entraînant ainsi l'inhibition de la traduction des ARNm, limitant ainsi la capacité de traduction de l'ARNm exogène d'origine microbienne. La liaison de l'ARNdb aux récepteurs à l'oligoadénylate synthétase (OAS) entraîne l'activation de la RNase L, responsable de la dégradation de l'ARNm exogène d'origine microbienne (*Figure 46*) (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

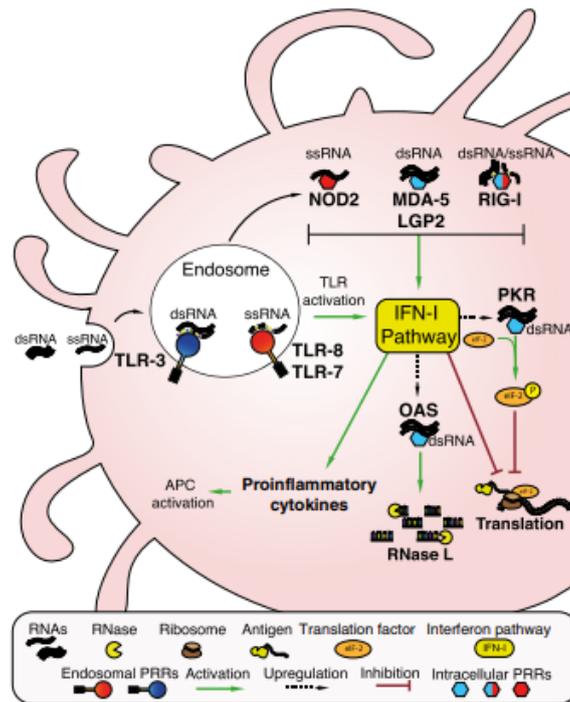


Figure 46 : Induction de l'immunité innée par l'ARNm exogène selon Linares-Fernandez et al., 2020

L'induction de l'immunité innée est responsable de l'activation des cellules effectrices de l'immunité adaptative, par le biais notamment de la production de cytokines pro-inflammatoires, permettant ainsi de renforcer l'intensité de la réaction immunitaire adaptative et de recruter les cellules de l'immunité adaptative. Cependant, il est important de prendre en compte les mécanismes moléculaires de l'immunité innée, notamment la production d'IFN-I participant à la dégradation de l'ARNm d'origine microbienne peut également entraîner la dégradation de l'ARNm vaccinal, ce qui peut conduire à la diminution de l'efficacité vaccinale et contribuer à l'apparition d'échecs vaccinaux. Une solution pourrait être de modifier la structure de l'ARNm afin que ce dernier active l'immunité adaptative sans activer les voies responsables de la dégradation de l'ARNm (Linares-Fernandez et al., 2020).

2.3. Technologies d'amélioration des vaccins à ARNm

2.3.1. Amélioration de la stabilité et de la traduction des ARNm

L'amélioration des vaccins à ARNm passe tout d'abord par l'amélioration de sa stabilité : en effet, l'ARNm vaccinal est considéré comme provenant du non soi par le système immunitaire et est en conséquence soumis à l'action des exonucléases spécialisées dans la dégradation des acides nucléiques (notamment les RNases). L'ARNm vaccinal doit alors conserver certaines structures présentes sur les ARNm eucaryotes afin de limiter cette dégradation par les enzymes de l'hôte, tout en conservant son pouvoir immunogène. La structure Cap en 5', la région 5'-UTR, l'Open Reading Frame (ORF), la région 3'-UTR et la queue poly-A sont des structures retrouvées chez les organismes eucaryotes, qui nécessitent d'être conservées afin de maintenir une stabilité de l'ARNm et sa capacité à être traduit. Il est toutefois possible de modifier ces structures afin d'obtenir une efficacité vaccinale optimale (Figure 47) (Pardi et al., 2018; Linares-Fernandez et al., 2020) :

5'Cap	5'UTR	ORF	3'UTR	Poly-A
Biological relevance				
Cap -Eukaryotic modification -Important for translation initiation, mRNA stability, nuclear export. -When suboptimal, recognized as PAMPs by the innate immunity. -RNA Closed-Loop.	5' UTR -Recognition by translation machinery. -Recognized and scanned by ribosomes. -Important for mRNA translation and stability. -RNA Closed-Loop.	ORF -Sequence encoding the gene of interest (GOI), in mRNA vaccine encodes the antigen.	3'UTR -Important for translation initiation and mRNA stability.	Poly A -Important for mRNA stability. -Recognition by Poly-A binding proteins (PABP) and recruitment of translation factors. -Important for translation initiation (RNA Closed-Loop).
Region optimization				
-Natural Cap-1 to avoid PRR recognition and enhance translation. -Enzymatic capping for higher capping efficiency.	-Inclusion of Kozak sequence. -No strong secondary structures. -No other start codon. -Polysome profiling to count the ribosome loading in sequences <i>in-silico</i> .	-Codon optimization increases translation. -Low optimal codons may be important for adequate folding.	-Optimal sequences derived from highly stable mRNA (β -Globin). -2x copies in tandem -RNA Closed-Loop	-Poly-A sequences of 120 units. -Adding a poly-U sequence, providing a dsRNA in the poly-A, increases adjuvant effect.
Whole molecule optimization				
-Avoiding binding sites of miRNAs present in the target cells. -Uridine depletion to avoid recognition by innate immunity. -Production at high temperature (50°C) using a thermostable polymerase and/or low Mg^{2+} concentration, to decrease dsRNA levels. -mRNA purification using HPLC to decrease dsRNA amount. -Avoidance of highly stable and long secondary structures that could activate PRRs.				

Figure 47 : Récapitulatif des modifications structurelles de l'ARNm permettant l'amélioration de la stabilité et de la traduction selon Linares-Fernández et al., 2020

❖ La **structure Cap** est constituée du nucléoside méthylé à la 7^e position, la 7-méthylguanosine (m^7G), qui est reliée au premier nucléotide de la séquence ARNm par un pont formé de trois groupements phosphates (ppp) selon la structure suivante : m^7GpppN , où N est le premier nucléotide. Lors de la mise en place de cette structure Cap *in vitro*, des structures analogues à la Cap peuvent être utilisées mais peuvent se lier d'une manière incorrecte au brin d'ARNm. Pour contrer cela, des structures nommées anti-reverse cap analogs (ARCA), qui sont des structures modifiées permettant d'assurer la liaison du groupement méthyle de la structure Cap au bon groupement hydroxyle lors de la transcription. L'utilisation de ces ARCA permet d'améliorer significativement l'efficacité de la transcription en assurant une reconnaissance optimale de la structure Cap par le facteur d'initiation de traduction 4E (eIF4E) ribosomal. Des modifications des ARCA comme l'ajout de nucléotide phosphorothioate ont permis d'augmenter l'affinité de la structure Cap au facteur eIF4E du ribosome, améliorant la traduction et limitant la sensibilité cette structure aux enzymes de décapsulation, augmentant ainsi la stabilité de l'ARNm vaccinal. D'autres analogues de la structure Cap ont été testés et en 2018, la structure CleanCap® (Figure 48) a été mise au point, et se base sur l'ajout d'une structure trimérique initiateur, qui forme une structure Cap naturelle en 5', améliorant l'efficacité d'encapsulation de 90 à 99 % (Xu et al., 2020).

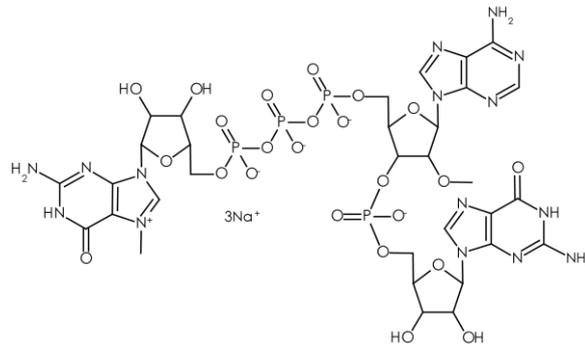


Figure 48 : Structure CleanCap® selon TriLink Biotechnologies

- ❖ Les **régions UTR** sont des sites de liaisons de protéines impliquées dans la réplication et la traduction des ARNm. Pour améliorer la traduction, il est important d'optimiser ces régions afin d'améliorer les niveaux d'expression de l'ARNm *in vivo*. De nombreux facteurs de la traduction se fixent sur la région 3'-UTR et possèdent la particularité d'être instables. Il est donc nécessaire d'introduire des séquences permettant de stabiliser la région 3'UTR comme les séquences riches en adénine et uracile (séquences AU) et riches en guanine et uracile (séquences GU). L'ajout de ces séquences permet de stabiliser l'ARNm et d'améliorer demi-vie, permettant ainsi une expression durable. Ces structures préviennent également de la formation de liaisons de l'ARNm sur lui-même, qui sont des motifs reconnus par les cellules dendritiques. Une autre solution est d'utiliser les régions 3'-UTR dérivées de l'ARNm codant les globulines α et β , connues pour contenir des éléments régulateurs assurant une excellente stabilité et une bonne traduction. Des améliorations similaires existent pour la région 5'-UTR comme l'ajout d'une séquence Kozak (GCC-(A/G)-CCAUGG) permet d'améliorer l'initiation de la traduction. Il est cependant important de ne pas stabiliser excessivement cette région car cela empêche la bonne reconnaissance de la séquence start par le ribosome (Linares-Fernandez *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020).
- ❖ L'**ORF** est la région codante de l'ARNm et contient la séquence de l'antigène vaccinal. L'optimisation de cette séquence permet d'améliorer le taux de traduction de l'ARNm, mais qui ne doit pas dépasser un certain seuil car de nombreuses protéines perdent en qualité avec l'augmentation du rendement de traduction. En effet, ces protéines subissent par la suite des procédés de maturation qui leur confère leur structure secondaire et tertiaire finale et l'utilisation de codons de l'ORF ayant un faible rendement de production permet de favoriser le bon repliement des protéines et d'améliorer leur stabilité. Il s'agit donc de trouver un bon compromis entre optimisation du rendement de traduction et optimisation de la qualité de l'antigène produit lors de la traduction (Xu *et al.*, 2020). L'optimisation de l'ORF passe par l'optimisation des codons : l'utilisation de codons codant pour les acides aminés les plus fréquents ou l'usage de codons retrouvés sur la majorité des ARN de transfert (ARNt), utiliser des di-codons qui ont une efficacité optimale quand placés l'un à côté de l'autre et la modification de l'ORF avec un bon ratio de codons retrouvés sur les protéines exprimées naturellement en grande quantité, sont des stratégies permettant d'améliorer significativement le rendement de traduction et de la phase d'élongation, qui régit la longueur des protéines traduites et diminue le risque d'obtention de protéines incomplètes. Cependant, une protéine trop longue pourrait entraîner la fixation d'une DEAD-box ARN hélicase sur

l'ARNm et favorise sa dégradation. Un autre inconvénient d'une élongation trop importante est le défaut de repliement de l'antigène, altérant drastiquement ses propriétés. Il existe un autre facteur permettant d'optimiser l'ORF : il s'agit de la proportion en guanosine et cytosine (GC%), qui permet de stabiliser l'ARNm et jouent un rôle dans le rendement de traduction lors de la différenciation cellulaire. Une autre amélioration, indirectement reliée à la proportion de GC est la déplétion en uridine dans l'ORF, qui permet également d'améliorer les rendements de traduction. La dernière amélioration consiste à maintenir une structure secondaire de l'ARNm permettant l'accessibilité aux ribosomes et les structures en tête d'épingle et les structures trop stables favorisent la dégradation de l'ARNm par les RNAses et empêchent la fixation du ribosome (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

- ❖ La **queue poly-A** est une structure terminale jouant un rôle de protection de l'ARNm contre les exonucléases 3'-5' et assurent donc sa stabilité. Certaines protéines peuvent se lier à la queue poly-A (Poly A Binding Protein ou PABP) et former une structure en boucle en se fixant à l'extrémité Cap en 5', permettant ainsi de protéger l'intégrité de l'ARNm en limitant les réactions de déadénylation de la queue poly-A, tout en permettant l'accès aux ribosomes (Figure 49). La taille de la queue poly-A a également une importance cruciale dans le maintien de la stabilité de l'ARNm et on estime que la taille optimale est de 120 à 150 nucléotides (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

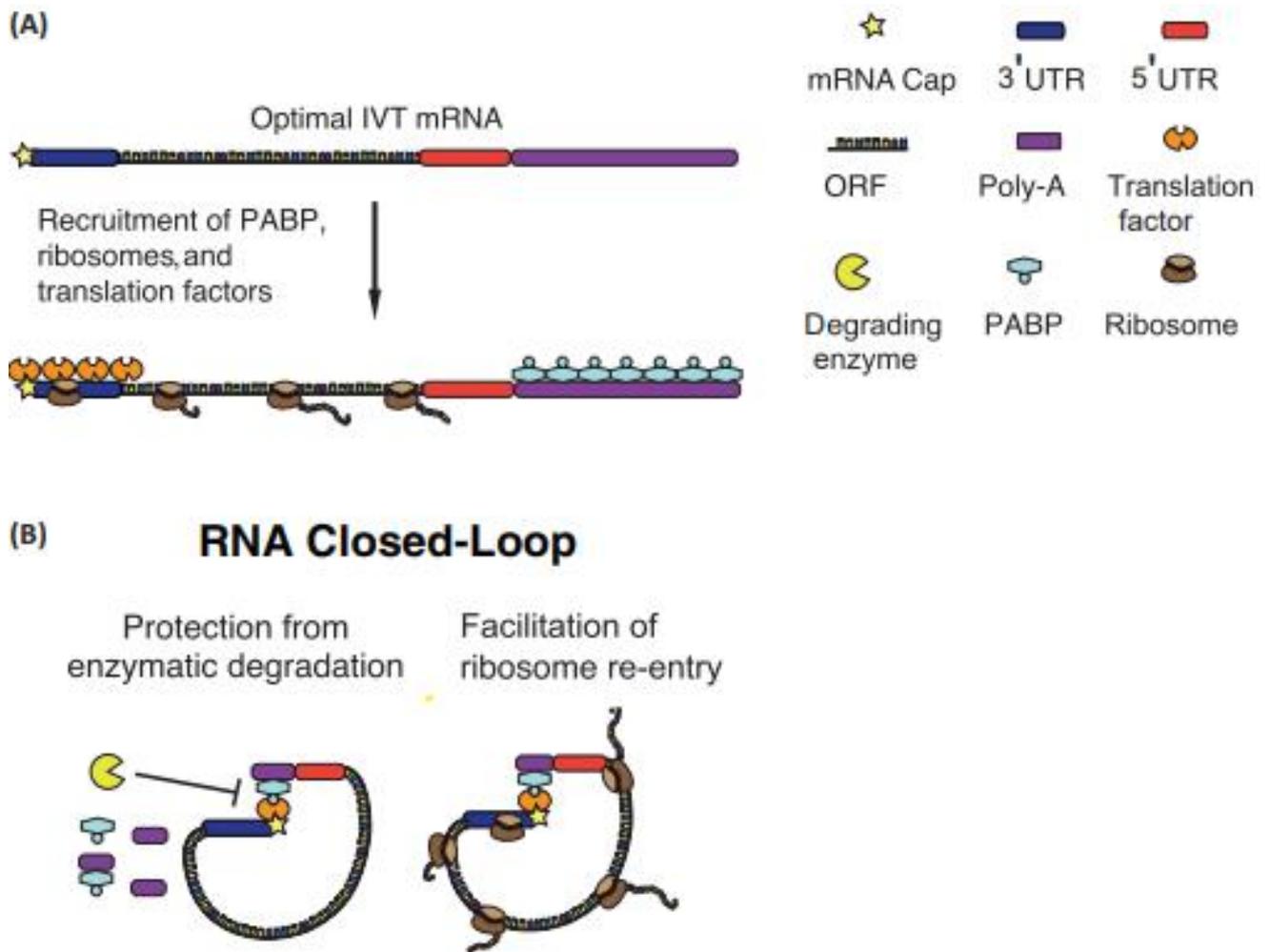


Figure 49 : Structure en boucle fermée de l'ARNm selon Linares-Fernández *et al.*, 2020

2.3.2. Régulation de la réponse immunitaire

Les ARNm possèdent un pouvoir auto-adjuvant permettant de favoriser leur reconnaissance par les CPA. En effet, l'ARNm peut être reconnu par les TLR3, TLR7 et TLR8, et l'ARNdb peut être reconnu par les récepteurs des protéines RIG-I, qui favorisent la maturation des CPA, l'induction de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. Toutes ces stimulations aboutissent à la mise en place d'une forte immunité humorale et cellulaire, mais peuvent également activer des voies de dégradation de l'ARNm vaccinal. La synthèse d'IFN-I en trop grande quantité peut également être à l'origine d'une diminution de la vitesse de traduction, de l'arrêt de recrutement de lymphocytes T CD8+ et ainsi contribuer à l'arrêt de la réaction immunitaire. Il est donc important de réguler ces réactions immunitaires néfastes pour l'ARNm. Il existe plusieurs méthodes d'immunomodulation (Linares-Fernandez *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020) :

- ❖ La partie dédiée à la production des vaccins à ARNm évoque l'importance de l'étape de **purification** du vaccin. Des méthodes comme la HPLC ou la FPLC (cette dernière améliorant nettement le rendement de la purification) permettent d'éliminer les principaux contaminants produits lors de la réplication de l'ARNm. Les ARNdb font partie de ses contaminants et induisent la production d'une grande quantité d'IFN-I et activent les récepteurs des protéines RIG-I et affectent négativement l'immunogénicité, il est donc important de les éliminer par ces méthodes de purification. Les fragments incomplets d'ARNm sont également susceptibles d'être reconnus par les cellules de l'immunité innée et d'entraîner la dégradation des ARNm vaccinaux (Xu *et al.*, 2020). Lors d'utilisation d'un mélange vaccinal composé de nombreuses impuretés, la concentration en IFN-I augmente et active en priorité les lymphocytes T CD8+, qui reconnaissent en plus le complexe CMH-I/antigène par le biais de leur récepteur TCR. La combinaison des deux signaux induit un signal d'apoptose du lymphocyte CD8+, diminuant l'efficacité de la réponse CTL (*Figure 50*). La purification est susceptible d'augmenter jusqu'à 1000 fois la production d'antigènes dans les cellules dendritiques (Linares-Fernandez *et al.*, 2020).

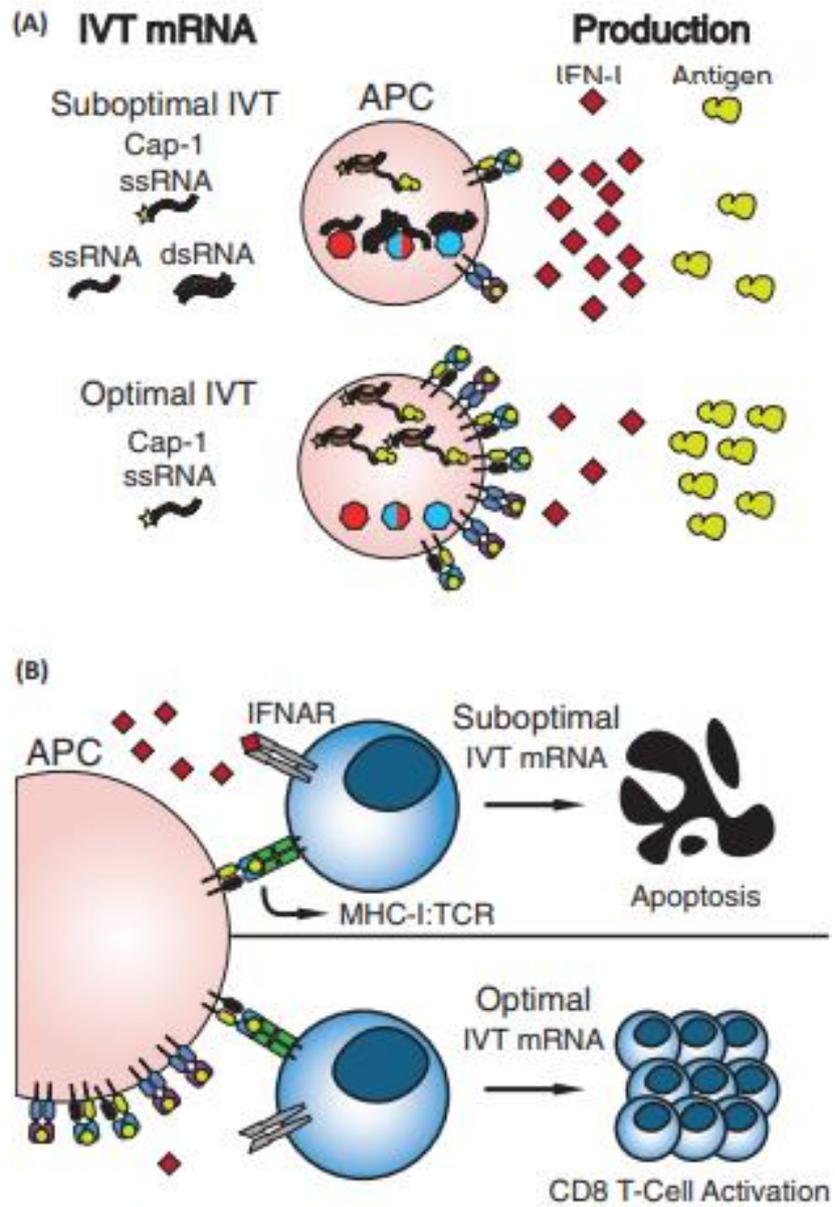


Figure 50 : Importance de la purification sur la production d'IFN-I et leurs conséquences sur la production d'antigènes et la réponse CTL selon Linares-Fernández et al., 2020

- ❖ **L'optimisation de la séquence d'ARNm** vaccinal a également son importance sur la régulation de la réponse immunitaire. En effet, l'ARNsb peut être reconnu par des PRR cellulaires et entraîner la production d'IFN-I, qui vont inhiber la traduction de l'ARNm. Par exemple, les protéines avec des répétitions tétratricoïdes induites par les IFN (IFIT) se fixent sur l'extrémité 5' Cap ou sur le facteur d'initiation de la traduction eIF3 et empêchent l'initiation de la traduction. La structure Cap classique, m⁷GpppN (Cap0) est susceptible d'être reconnue par un PRR, tout comme les ARNm possédant une structure Cap m⁷GpppNmN (Cap1) et ceux ne possédant pas de structure Cap. Cependant, même s'ils sont reconnus par les PRR, les ARNm avec une structure Cap1 peuvent tout de même conserver leur capacité à être traduits. La modification de l'ORF peut également jouer un rôle sur la régulation de la réponse immunitaire : en effet, la modification des nucléosides d'uridine par des pseudo-uridines permet de diminuer la reconnaissance de l'ARNm par les 2'-5'-Oligoadénylate Synthétases (OAS), qui induisent la production d'IFN-I, et contribue ainsi à améliorer la stabilité de l'ARNm et à augmenter la capacité de traduction. La modification d'autres nucléosides a été testée et a démontré les mêmes résultats que pour l'uridine. Ces modifications concernent principalement la cytidine, changée pour la 5-méthyl-cytidine (Xu *et al.*, 2020).
- ❖ L'ajout d'**adjuvants** permet également d'améliorer l'immunogénicité des vaccins à ARNm. Certaines technologies de délivrance du vaccin ont des propriétés adjuvantes. En effet, l'ajout d'une nano-émulsion cationique (MF59) dans un vaccin SAM a permis d'augmenter significativement l'immunogénicité et l'efficacité du vaccin, tout en étant bien toléré chez les animaux vaccinés, grâce à la présence d'ammonium quaternaires qui ont un effet adjuvant. Cependant, ils sont associés à une grande production d'IFN-I et possèdent donc un effet adjuvant intéressant, mais favorisant la dégradation de l'ARNm vaccinal (Brito *et al.*, 2014; Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). L'utilisation de protamines pour stabiliser l'ARNm est une autre méthode de délivrance intéressante, et les protamines peuvent être reconnues par les TLR7 et TLR8, à l'origine de l'induction d'une réponse Th1 (Xu *et al.*, 2020). Une autre stratégie consiste à ajouter des séquences dans l'ARNm vaccinal de molécules immunomodulatrices. Le TriMix est un ensemble de gènes codant pour les protéines activatrices de l'immunité CD70, le ligand de CD40L et le TLR4. Cet adjuvant a permis d'améliorer l'immunogénicité des ARNm non purifiés, des ARNm injectés seuls, et des ARNm non modifiés, a permis d'améliorer l'intensité de la réponse CTL et la maturation des cellules dendritiques en CPA. Cette technologie possède également une excellente innocuité (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020).

2.3.3. Amélioration de l'administration des vaccins à ARNm

La majeure grande partie des méthodes de délivrance s'inspire de celles utilisées pour les vaccins à ADN. L'ARNm nécessite de passer la membrane plasmique de la cellule cible avant d'entrer dans le cytoplasme et de détourner la machinerie cellulaire ribosomale afin de produire l'antigène vaccinal. Deux principales méthodes sont alors possibles : la transfection *ex vivo* de cellules dendritiques par l'ARNm vaccinal puis l'injection de ces cellules dans l'animal, ou l'injection directe de l'ARNm nu ou accompagné de molécules permettant d'augmenter sa stabilité ou à l'aide de moyens de délivrance particuliers (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Les principales méthodes de délivrance sont récapitulées dans la *Figure 51* :

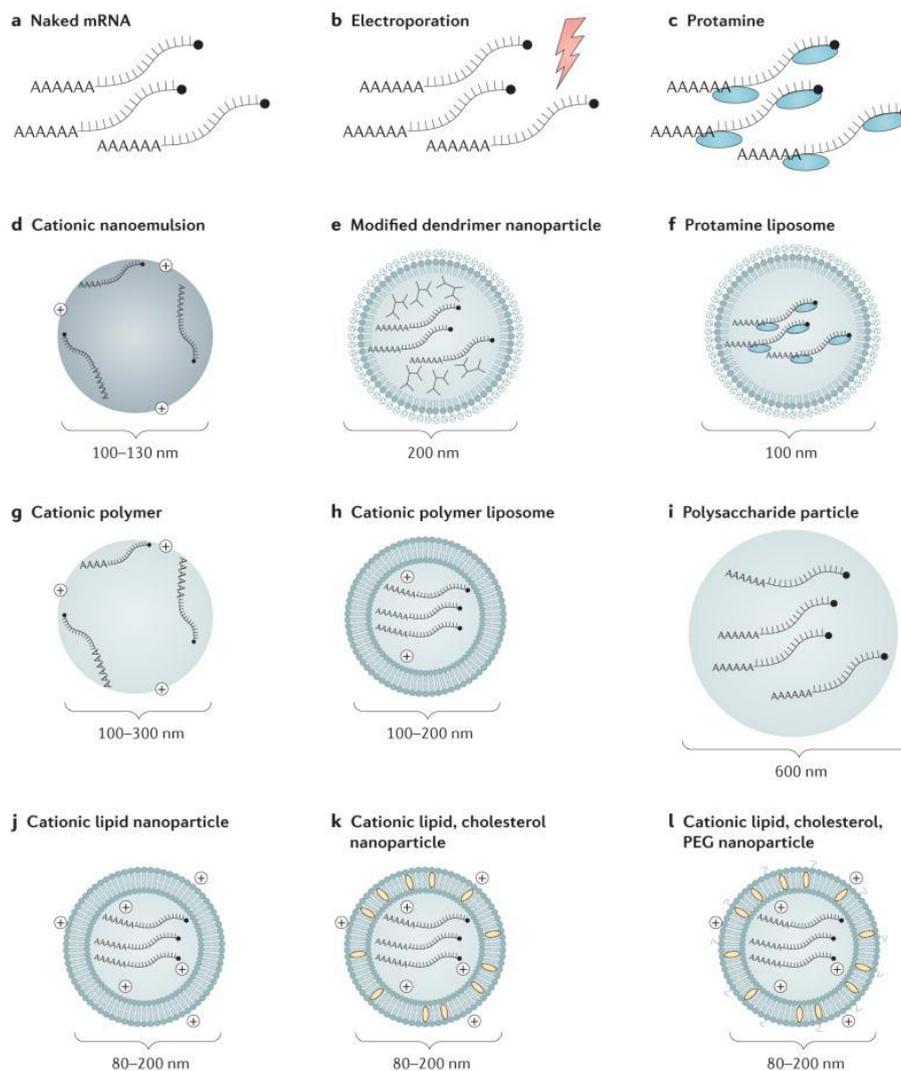


Figure 51 : Principales structures de délivrance des vaccins à ARNm selon Pardi et al., 2018

- ❖ **L'injection d'ARNm nu** (Figure 51a) permet d'induire une immunisation efficace. La voie d'administration joue un rôle important dans l'efficacité vaccinal et la voie intradermique semble être la voie la plus prometteuse pour stimuler la réponse immunitaire en raison de la présence d'une grande quantité de cellules dendritiques dans le derme. L'injection intranodale dans une tumeur d'un ARNm nu et non modifié, encodant des antigènes tumoraux, a permis l'induction d'une forte réponse Th et CTL, à l'origine d'un ralentissement de la production de la tumeur et d'une augmentation de la médiane de survie (Pardi et al., 2018).
- ❖ La **transfection de cellules dendritiques *ex vivo*** s'appuie sur la capacité des cellules dendritiques à exercer leur fonction de CPA après activation par l'antigène et maturation. La transfection des cellules dendritiques par l'ARNm vaccinal fait intervenir une autre méthode favorisant la délivrance : l'électroporation. L'application d'un champ électrique dans le milieu de culture favorise l'apparition de pores dans les membranes des cellules dendritiques et permet un haut niveau de transfection par l'ARNm. L'injection de cellules dendritiques transfectées *in vivo* permet d'induire principalement une réponse cytotoxique, faisant de ces vaccins des candidats idéaux pour traiter certains cancers (Pardi et al., 2018).

- ❖ Des **méthodes physiques de délivrance** du vaccin comme l'électroporation (*Figure 51b*) permettent d'améliorer l'adressage de l'ARNm vaccinal aux cellules dendritiques. L'électroporation *in vivo* (ou électroporation intradermique, méthode expérimentale utilisant une électrode placée sur la peau d'un animal permettant l'application d'un champ électrique pulsé après injection intradermique du vaccin (Roos *et al.*, 2009)) permet de favoriser le passage transmembranaire de l'ARNm en créant des pores dans la membrane plasmique des cellules dendritiques (Pardi *et al.*, 2018). Le taux de transfection lié à cette méthode pourrait même atteindre 50 à 90% (Xu *et al.*, 2020). Cependant, une étude suggère que cette méthode ne permet d'augmenter la transfection des cellules dendritiques que pour les vaccins SAM (Johansson *et al.*, 2012; Pardi *et al.*, 2018). Une autre méthode est l'utilisation d'un gene gun, qui permet de propulser à grande vitesse des particules d'or sur lesquelles sont adsorbés les ARNm vaccinaux. Cependant, bien que prometteuses, ces méthodes physiques s'accompagnent d'un taux de mortalité cellulaire important, diminuant le taux de transfection et ont été remplacées par des méthodes plus prometteuses encore : l'encapsulation de l'ARNm dans des lipides et des nano-polymères (Pardi *et al.*, 2018).

- ❖ Les **protamines** (*Figure 51c*) sont des peptides cationiques qui se lient aux ARNm vaccinaux et permettent d'améliorer leur stabilité en les protégeant de la dégradation par les RNAses (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Le complexe ARNm/protamines permet également d'induire une forte réaction immunitaire en activant les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules NK, les neutrophiles et les lymphocytes B, montrant ainsi le pouvoir adjuvant des protamines (Xu *et al.*, 2020). En revanche, il a été démontré que les protamines limitaient l'expression des protéines car les liaisons formées avec les ARNm sont trop étroites et limitent la fixation de facteurs de la traduction sur les ARNm (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). La technologie RNActive® permet de contourner ce problème : il s'agit d'une séquence ARNm couplés aux protamines dont les nucléotides A, U, G et C ont été modifiés afin de multiplier par 4 ou 5 l'expression protéique, sans altérer la structure primaire de la protéine (sa séquence en acides aminés), ce qui permet de compenser la perte de la capacité d'expression des protéines liée aux liaisons avec les protamines (Kallen *et al.*, 2013; Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020).

- ❖ Les **lipides cationiques et polymères** (*Figure 51d-l*) sont des structures conçues dans le but d'encapsuler l'ARNm afin de le protéger des exonucléases et d'assurer un adressage optimal aux cellules dendritiques. Certaines de ces structures ont montré une amélioration notable des vaccins à ARNm *in vitro* sur des cellules cancéreuses et ont ainsi été commercialisées. Cependant, ces structures commercialisées ont montré une grande toxicité et une faible efficacité *in vivo*, nécessitant une amélioration de la technologie. Par la suite, ces structures ont évolué pour devenir aussi très efficaces et sûrs d'utilisation, et sont apparues des technologies déjà utilisées pour les vaccins à ADN tels que les ARN interférents (siRNA) et les nanoparticules lipidiques (LNP), qui sont devenus les principaux modes de délivrance. Les LNP ont par ailleurs démontré une bonne efficacité quand ils étaient couplés aux vaccins SAM et NRM (Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Les LNP contenant des ARNm vaccinaux injectés par voie sous-cutanée, intradermique et intra-nodale ont permis la production locale d'antigènes et ont favorisé la mise en place d'une réaction immunitaire locale, tandis que ceux injectés par voie systémique (voie intraveineuse) ont été pris en charge par les apolipoprotéines E (apoE) et délivrés au foie par le biais des récepteurs aux apoE hépatocytaires, ce qui a permis la production d'antigènes dans le foie jusqu'à 4 jours post-injection (Akinc *et al.*, 2010; Pardi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). D'autres voies d'administration ont été testées, comme l'inhalation trachéale et l'injection intra-péritonéale et ont permis d'induire une expression systémique de l'antigène, mais en proportion moindre que la voie intraveineuse (Xu *et al.*, 2020). L'efficacité de la production antigénique est grandement dépendante de la voie d'administration et l'injection intradermique et sous-cutanée permet d'obtenir la production protéique la plus efficace et la plus durable mais limitée au point d'injection. Cette production durable favorise la mise en place d'une immunisation durable par le biais d'une augmentation du taux d'anticorps produits dans les centres germinaux par les lymphocytes B mais aussi d'une induction d'une réponse Th folliculaire dans les mêmes centres germinaux. Bien que le mécanisme exact par lequel ces deux réactions immunitaires germinales contribuent à la mise en place d'une immunité durable, il a été démontré que ces deux populations cellulaires devaient être activées afin de générer la production d'anticorps neutralisants sur le long terme, ce qui peut s'avérer essentiel dans la lutte contre les virus échappant à l'immunité humorale (Pardi *et al.*, 2018).

2.4. Comparaison avec les vaccins conventionnels et les vaccins à ADN

Longtemps délaissée au profit des vaccins à ADN, la vaccination à l'aide d'ARNm s'est développée progressivement et la pandémie de COVID-19 a permis de la mettre sur le devant de la scène en raison de ses nombreux avantages en comparaison avec les vaccins conventionnels et à ADN :

- ❖ La **facilité et la rapidité de production** sont des propriétés que les vaccins à ARNm partagent avec les vaccins à ADN et permettent de développer une réponse rapide pour le contrôle des maladies infectieuses à développement rapide ou émergentes. Leur production *in vitro* est très rapide, contrairement aux vaccins conventionnels (sous-unités, vivants atténués et inactivés), car ils ne nécessitent que le séquençage d'un gène du pathogène pour lequel on souhaite développer un vaccin, qui peut être déjà présent dans des bases de données génomiques. De plus, le rendement de production est bon et permet la production rapide de vaccins à ARNm. Cependant, la trop grande longueur de la séquence ribonucléique constitue un obstacle à la production (West, 2022; Pardi *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2021).

- ❖ La **longue durée de conservation** est également un avantage non négligeable : les vaccins à ARNm sont toujours actifs après lyophilisation pendant 3 ans quand conservés entre 5 et 25°C et jusqu'à 6 mois à 40°C, ce qui est une propriété intéressante pour leur conservation dans les pays chauds (Pardi *et al.*, 2018).
- ❖ Les vaccins à ARNm présentent une **bonne innocuité** car leur production ne nécessite pas l'intervention d'agents chimiques toxiques et d'agents pathogènes inactivés, qui pourraient revenir à leur phénotype pathogène, comme cela peut être le cas pour les vaccins viraux vivants atténués, les vaccins inactivés et les vaccins à sous-unités. Leur mode d'action dépend de la synthèse protéique ribosomale et le risque d'intégration de l'ARNm au génome de l'individu vacciné est nul, contrairement aux vaccins à ADN. Les essais cliniques réalisés montrent par ailleurs que les vaccins à ARNm n'entraînent que des effets secondaires bénins à modérés (Gote *et al.*, 2023; West, 2022; Pardi *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2021).
- ❖ Les vaccins à ARNm présentent également une **grande variété** de réponses immunitaires, contrairement aux vaccins conventionnels : en effet, ils favorisent la mise en place d'une réponse cellulaire et humorale ainsi que l'immunité innée, qui va stimuler l'immunité adaptative et ainsi améliorer l'immunogénicité du vaccin. Des études ont même démontré que les vaccins à ARNm étaient plus efficaces que les vaccins à ADN car ils ne nécessitent pas de passer la membrane nucléaire pour induire la synthèse d'antigènes (Rosa *et al.*, 2021). Les essais cliniques de vaccination à l'aide d'ARNm réalisés chez les animaux montrent par ailleurs une bonne immunogénicité et des résultats prometteurs quant à l'induction d'une immunité protectrice (Sandbrink & Shattock, 2020).

Cependant, il est important de relativiser l'importance de ces propriétés avantageuses des vaccins à ARNm, car il existe de nombreuses limites, qui viennent diminuer l'efficacité vaccinale et qui constituent autant d'axes de recherches à investiguer dans le but de perfectionner cette technologie :

- ❖ L'**innocuité** des vaccins à ARNm est démontrée et n'induit chez un individu vacciné que des symptômes discrets à modérés, mais à l'échelle d'une population, ces effets indésirables sont retrouvés chez une grande majorité des individus vaccinés. C'est ainsi que pour le vaccin CureVac®, vaccin à ARNm antirabique stabilisé par des protamines, 78% des individus vaccinés ont développé des effets secondaires. Un autre exemple est l'apparition de réactions anaphylactiques chez les individus vaccinés contre le COVID-19, qui était significativement supérieure en comparaison avec les vaccins conventionnels (4,7 réactions anaphylactiques pour un million d'individus vaccinés). L'explication apportée pour ce phénomène est l'existence d'anticorps dirigés contre les LNP englobant les ARNm vaccinaux, produits lors d'une immunisation antérieure contre des lipides similaires. Les vaccins à ARNm induisent tout de même moins d'effets secondaires que les vaccins vivants atténués (Gote *et al.*, 2023; Pardi *et al.*, 2018).

- ❖ La **production d'anticorps** induite par les vaccins à ARNm n'est pas suffisamment durable, contrairement aux vaccins vivants atténués. Le développement de certaines technologies améliorant les vaccins à ARNm, tels que les LNP ciblant les CPA par le biais de ligands, permettent de favoriser la mise en place de la réponse immunitaire humorale dans les centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques. Néanmoins, la durabilité de la production d'anticorps varie énormément entre chaque antigène et nécessite d'autres recherches pour comprendre les mécanismes impliqués (Gote *et al.*, 2023). Il est donc nécessaire de recourir à des injections répétées du vaccin à ARNm afin d'obtenir une immunisation suffisante, contrairement aux vaccins vivants atténués, qui peuvent induire une immunité durable toute la vie de l'animal avec une seule primovaccination, comme c'est le cas pour la vaccination contre la variole chez l'Homme, chez qui on retrouve des anticorps neutralisants jusqu'à 75 ans post-vaccination (Hammarlund *et al.*, 2003; West, 2022). L'injection répétée du même vaccin comme les vaccins à sous-unités peut être à l'origine de phénomène d'interférence avec les anticorps préexistants, inhibant la mise en place d'une immunité protectrice. Il pourrait alors être intéressant d'avoir recours aux vaccins à ARNm pour les injections de rappel car le système immunitaire n'a pas développé d'anticorps dirigés contre l'ARNm, ce qui permet la production d'antigènes vaccinaux sans risque d'interférence (Sehrawat *et al.*, 2023).
- ❖ La **stabilité** est le défaut principal des vaccins à ARNm. Contrairement aux vaccins à ADN, qui sont des structures très stables, les ARNm sont soumis à l'action des exonucléases et la reconnaissance de certaines structures favorisent la production d'IFN-I, à l'origine de leur dégradation, diminuant ainsi leur immunogénicité. La stabilisation des ARNm permise par les LNP ou les protamines notamment, peuvent même être à l'origine de réactions anaphylactiques (Gote *et al.*, 2023). Il a été démontré par ailleurs que l'injection d'ARNm nu par voie intraveineuse entraînait sa dégradation rapide (Brisse *et al.*, 2020). La stabilité est un critère également recherché dans la formulation de vaccins administrables par voie muqueuse : certains vaccins vivants atténués et inactivés chez les volailles sont administrés dans l'eau de boisson et induisent une immunité muqueuse satisfaisante, ce qui est actuellement impossible avec les vaccins à ARNm, bien que certaines études montrent la capacité des vaccins à ARNm à induire une immunité muqueuse (Sehrawat *et al.*, 2023).

En résumé, tout comme les vaccins à ADN, les vaccins à ARNm constituent une technologie prometteuse, mais souffrant de problèmes similaires. L'immunogénicité de ces vaccins est bien meilleure que celle des vaccins à ADN mais reste bien moindre que celle des vaccins vivants. En revanche, les vaccins à ARNm sont plus sûrs d'utilisation que les vaccins vivants atténués, ce qui est un atout et permet la production de vaccins contre des agents pathogènes très virulents, pour lesquels il serait préférable d'éviter tout risque de réversion au phénotype virulent comme le virus de la fièvre aphteuse (Sehrawat *et al.*, 2023). La vaccination à l'aide d'ARNm est récente et nécessite de nombreux ajustements afin de surmonter ses limites, mais la pandémie de COVID-19 a permis le développement rapide de nouvelles technologies novatrices, améliorant chaque jour un peu plus les vaccins à ARNm (Dory & Jestin, 2021).

3. Vaccins à ARN à usage vétérinaire avec autorisation conditionnelle

Bien qu'il n'existe pas de vaccin à ARN possédant une AMM vétérinaire, deux vaccins prometteurs ont obtenu une AMM conditionnelle, qui permet leur utilisation exceptionnelle en réponse à une épizootie ayant de graves conséquences médicales et/ou économiques avant d'avoir obtenu toutes les informations nécessaires sur leur innocuité et leur efficacité à long terme (Agence Nationale de Sécurité du Médicament, 2021). Il s'agit des vaccins contre l'Influenza aviaire et la diarrhée épidémique porcine (DEP).

3.1. Vaccin contre l'influenza aviaire

3.1.1. Présentation de l'agent pathogène

3.1.1.1. Importance

L'influenza aviaire est une maladie virale susceptible d'induire des conséquences dramatiques en cas de pandémie et de panzooties. La première source d'inquiétude concernant les virus appartenant à la famille Influenza est leur conséquence sur la santé publique : en effet, chez l'Homme en 1918, un virus Influenza de la catégorie A (souches atteignant majoritairement les mammifères et les oiseaux) a causé une pandémie mondiale qui a entraîné la mort de 50 millions de personnes. Cette maladie fut alors nommée « grippe espagnole ». Cette pandémie a été le point de départ de nombreuses recherches, et grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la génétique, il a été découvert que la transmission inter-espèces était possible par le biais de réarrangement génétiques du virus (Lycett *et al.*, 2019).

Depuis les années 90, le virus de l'influenza aviaire est responsable de nombreuses épizooties partout dans le monde, entraînant des conséquences sur la santé animale, économiques et sociétales désastreuses et impactant durement la filière de production de viande de volaille. En 2006 a eu lieu une épizootie de grippe aviaire en Turquie de virus influenza H5N1 hautement pathogène (IAHP) ayant entraîné l'abattage de 2,5 millions de volailles, à l'origine d'une perte de 226 millions de dollars. Cette perte s'est également accompagnée d'une défiance des consommateurs envers les produits d'origine aviaire, qui ont résulté en la baisse de 54% des ventes dans la capitale Ankara, et en la diminution du prix de la viande et des œufs de 32% (Chmielewski & Swayne, 2011). Une épizootie de virus Influenza IAHP est en cours touchant un total de 86 pays dans le monde depuis octobre 2021, et est responsable de 46 millions de cas confirmés dans les élevages, aboutissant à la mise à mort ou l'abattage préventif de 245 millions de volailles (dont 22 millions en France), entraînant de lourdes pertes économiques pour les éleveurs et des perturbations de l'industrie de viande de volaille (défauts d'approvisionnements et restriction des échanges). Les pertes économiques sont encore en cours d'évaluation mais on estime qu'un milliard d'euros a été dépensé par l'Etat français pour indemniser les éleveurs et mettre en place des mesures sanitaires adéquates (Bolo & Fournier, 2023).

3.1.1.2. Epidémiologie

De nombreuses souches du virus Influenza circulent dans l'avifaune sauvage, qui constituent la population réservoir du virus, dans lequel il va se multiplier. Les canards sauvages, les oies et les passereaux sont les principales populations impliquées dans la transmission du virus (Causey & Edwards, 2008; Chmielewski & Swayne, 2011; Lycett *et al.*, 2019). Les contacts directs et indirects entre l'avifaune sauvage et les volailles d'élevage sont responsables de la majorité des infections par le virus, et l'infectiosité d'un oiseau infecté est grandement corrélée à la durée et au niveau d'excrétion du virus. Il existe deux formes du virus, les formes hautement pathogènes (IAHP) et les formes faiblement pathogènes (IAFP). Des études ont montré que les formes hautement pathogènes étaient responsables d'une excrétion virale plus intense que pour les formes faiblement pathogènes (Germeraad *et al.*, 2019).

Il existe trois principaux facteurs responsables de l'infection des oiseaux de la faune sauvage : le **milieu de vie** (forte prévalence chez les oiseaux marins et d'eau douce où l'eau est un milieu propice au développement et à la transmission du virus), la **saison** (les changements écologiques durant la fin de l'automne et le début de l'hiver sont à l'origine d'une baisse de l'immunité, favorisant l'infection) et les **migrations** (transmission du virus à longue distance) (Causey & Edwards, 2008; Lycett *et al.*, 2019).

La circulation de plusieurs sous-types du virus au sein des populations de l'avifaune sauvage est problématique en raison de leur capacité à se réarranger et à former un nouveau sous-type, capable d'infecter l'Homme et de nombreux autres mammifères, à l'origine du développement de pandémies (Causey & Edwards, 2008).

Les matières virulentes à l'origine de l'infection des oiseaux sont les fèces, les sources d'eau contaminées, la nourriture, les structures d'élevages et matériels d'élevages et les aérosols, qui peuvent être disséminés par le vent (Chmielewski & Swayne, 2011).

3.1.1.3. Etiologie

La grippe aviaire est une maladie virale causée par le virus Influenza, de la famille des Orthomyxoviridae, et du genre des Influenzavirus de type A. Ce sont des virus à ARNs négatif composé de huit segments, favorisant les réarrangements géniques à l'origine du haut pouvoir de variation du virus (Chmielewski & Swayne, 2011; de Wit *et al.*, 2008; Lycett *et al.*, 2019; Spackman, 2020; Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Le genre Influenzavirus contient 4 types : le type A, infectant les Hommes, de nombreux autres mammifères, ainsi que les oiseaux de la faune sauvage et les oiseaux domestiques, le type B et le type C, infectant uniquement les Hommes, et un type D, récemment décrit (Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Les huit segments d'ARNm codent pour dix protéines (*Figure 52*) : une protéine de nucléocapside (NP), trois enzymes transcriptases (PB-1, PB-2 et PA), deux protéines de surfaces hémagglutinines et neuraminidases (HA et NA), deux protéines matricielles (M1 et M2) et deux protéines non structurales (N1 et N2) (Chmielewski & Swayne, 2011).

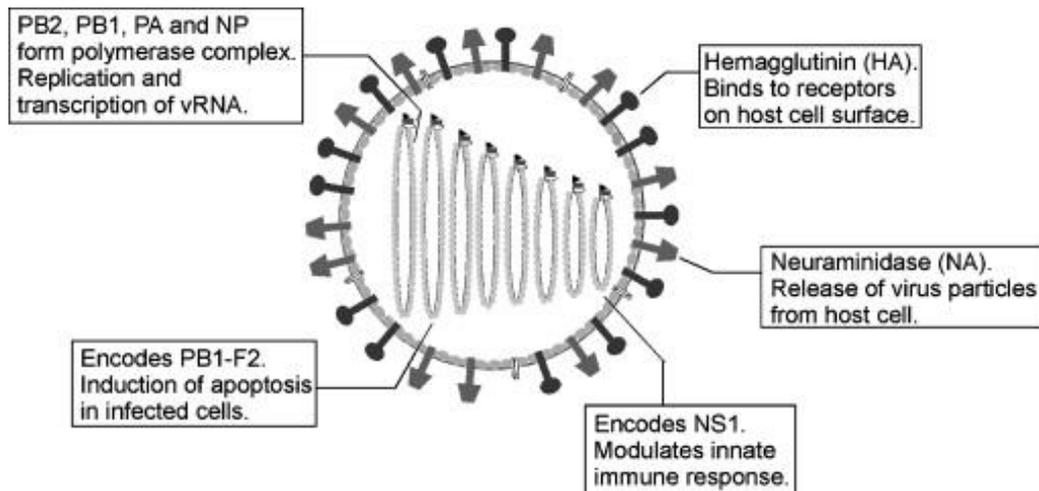


Figure 52 : Structure génomique du virus Influenza selon de Wit *et al.*, 2008

Les protéines NP, PB-1, PB-2 et PA sont impliquées dans la formation d'un complexe polymérase, permettant la réplication virale. Les protéines hémagglutinines se lient aux récepteurs de la cellule cible et permettent ainsi l'attachement viral aux cellules de l'épithélium respiratoire principalement. Les protéines neuraminidases sont impliquées dans la libération des virions par la cellule infectée. La protéine M1 est associée à l'ARNm viral (Chmielewski & Swayne, 2011; de Wit *et al.*, 2008). HA, NA et M2 sont également capables d'induire une réponse immunitaire, à l'origine de la production d'anticorps neutralisants (Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Les protéines NS1 sont responsables de la modulation de la réponse immunitaire innée après reconnaissance du virus et sont corrélées à sa pathogénicité (de Wit *et al.*, 2008).

Il existe 16 types d'hémagglutinines H1 à H16, et 9 types de neuraminidases N1 à N9, permettant de caractériser le sous-type de virus circulant dans les populations (Chmielewski & Swayne, 2011; de Wit *et al.*, 2008). Il existe des variations entre les différents sous-types. Les souches IAHP sont systématiquement des souches H5 ou H7, bien que ces deux hémagglutinines soient en proportion principalement retrouvées dans des souches IAFP (Chmielewski & Swayne, 2011; Lycett *et al.*, 2019).

Lors d'une infection naturelle par le virus Influenza, le système immunitaire met en place plusieurs mécanismes permettant d'éliminer le virus et à défaut, de limiter sa progression :

- ❖ La **réponse humorale** est composée de la production d'anticorps systémique, mais également mucoale. Le virus Influenza est composé de dix protéines mais seulement quatre sont reconnues comme antigènes par le système immunitaire : il s'agit des protéines de surface HA et NA, ainsi que les protéines membranaires M1 et M2. Il existe 16 HA et 9 NA différentes, et le système immunitaire n'est capable de produire des anticorps que pour chaque sous-type et aucun phénomène de neutralisation croisée n'est possible entre chaque sous-type (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).
 - Pour chaque **protéine HA**, il existe 5 sites susceptibles d'être reconnus comme antigène. La production d'anticorps par le système immunitaire neutralise la capacité des virus à se fixer sur les récepteurs cellulaires et à fusionner sa membrane avec celle de la cellule (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).
 - La **protéine NA** est une enzyme permettant le clivage de l'acide salicylique, permettant la libération du virus après fixation à la cellule. Les NA induisent aussi la production d'anticorps neutralisants par le système immunitaire mais à moindre niveau que les HA (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).

- La **protéine M2** agit comme un canal ionique pour le virus et induit une diminution du pH dans l'endosome, favorisant l'internalisation du contenu de la particule virale dans la cellule. La production d'anticorps contre cette protéine ne permet pas d'induire de protection totale contre le virus mais permet de diminuer son excrétion et confère une protection partielle (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).
- La **protéine M1** constitue un antigène utile pour le diagnostic de la maladie, mais est surtout une cible de choix pour le développement d'un vaccin. En effet, sa séquence protéique est hautement conservée entre tous les sous-types de virus Influenza et la production d'un vaccin utilisant cette protéine permettant d'obtenir des niveaux de d'anticorps suffisants pourrait induire une protection contre tous les sous-types de virus Influenza (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).

La réponse immunitaire humorale joue un rôle important dans la mise en place d'une immunité durable permettant de protéger les oiseaux contre les infections futures car la voie d'entrée du virus, et notamment des souches IAHP se fait par les muqueuses respiratoires. Par ailleurs, des études ont observé la production d'IgA chez des canards ayant été soumis au virus Influenza (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).

- ❖ Peu de données sont disponibles sur l'induction de l'**immunité cellulaire** (réponses Th et CTL) par le virus Influenza. Chez certaines souches particulières de virus, notamment la souche H5N9 Ty/Ont, il a été observé une destruction des tissus lymphoïdes résultant en une destruction des lymphocytes T. Le mécanisme proposé est la réplication du virus dans les macrophages, à l'origine de la libération de cytokines induisant une apoptose des cellules lymphocytaires (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).
- ❖ En revanche, il a été démontré que les virus Influenza sont capable de moduler l'**immunité innée**. En effet, la protéine virale PB-2 est capable d'inhiber la réponse innée en bloquant la production d'IFN-I. Cela est permis par l'inhibition des voies de transduction (STAT1/STAT2, JAK1, etc...) responsables de l'activation de l'expression de gènes codant pour les IFN-I (Yang *et al.*, 2022).

D'autres mécanismes sont impliqués dans l'échappement du virus au système immunitaire et reposent sur l'instabilité virale. En effet, ces virus possèdent un pouvoir mutagène important, qui peut être à l'origine d'une variabilité toute aussi importante des séquences de HA. On estime que seulement 30% de la totalité des séquences génomiques de ce virus sont conservées (Chmielewski & Swayne, 2011). Deux principaux mécanismes sont alors impliqués :

- ❖ La **dérive antigénique** est un mécanisme basé sur l'impossibilité du virus à réparer les mutations spontanées et les erreurs commises durant la réplication en raison d'une absence de mécanismes de réparation. Par exemple, l'insertion de multiples acides aminés basiques sur les sites de clivage des HA par délétion, insertion, substitution d'un nucléotide dans la séquence d'un virus IAHP H5 ou H7 peut conduire à la formation d'un virus H5 ou H7 IAHP (Chmielewski & Swayne, 2011).
- ❖ La **cassure antigénique** est un phénomène de réassortiment génétique par recombinaison entre différents sous-types de virus Influenza lors de co-infections. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de la pandémie de grippe espagnole en 1918 (Chmielewski & Swayne, 2011).

La capacité d'un virus Influenza à infecter une espèce dépend de sa capacité à reconnaître un récepteur cellulaire. Chez l'Homme, le virus possède une affinité pour les récepteurs α 2,3-acide sialique, alors que chez les oiseaux, le virus reconnaît majoritairement les récepteurs α 2,6-acide sialique. Certains oiseaux expriment cependant des récepteurs α 2,3-acide sialique, tout comme l'Homme, favorisant le passage du virus d'une espèce à l'autre, bien que ce phénomène soit minoritaire. En revanche, les réarrangements génétiques précédemment évoqués sont susceptibles d'induire l'apparition d'une affinité pour les récepteurs cellulaires d'une autre espèce, favorisant la transmission inter-espèce (Chmielewski & Swayne, 2011).

3.1.1.4. Pathogénie et présentation clinique

Les hémagglutinines jouent un rôle fondamental dans la pathogénicité des virus Influenza. Les HA sont des protéines présentes sur l'enveloppe virale et qui sont reconnues par des récepteurs α 2,3-galactose, initiant ainsi l'endocytose par la cellule-cible, au sein de laquelle le virus va utiliser la machinerie ribosomale pour produire ses particules virales. Le précurseur de l'hémagglutinine HA0, est clivé en HA1 et HA2, libérant ainsi le peptide de fusion de la partie N-terminale de HA2, favorisant l'endocytose du virus. Pour les IAHP, le précurseur HA0 est clivé par des protéases contenues uniquement dans les cellules épithéliales notamment digestives et respiratoires causant des lésions de ces organes (Chmielewski & Swayne, 2011; França & Brown, 2014; Lycett *et al.*, 2019; Pantin-Jackwood & Swayne, 2009). Chez les gallinacées, l'infection a lieu initialement dans les cellules de l'épithélium de la cavité nasale et s'étend dans un second temps à l'arbre respiratoire profond et atteint également l'épithélium digestif. La surinfection bactérienne, virale ou fongique peut être à l'origine de lésions respiratoires sévères (Pantin-Jackwood & Swayne, 2009). Le virus peut également se multiplier dans les cellules épithéliales des oviductes de dindes et ainsi être présentes dans les œufs (França & Brown, 2014).

Dans le cas des IAHP, la présence de multiples acides aminés basiques sur les sites de clivage de l'hémagglutinine est reconnue par une protéase ubiquitaire nommée « furine » retrouvée dans de nombreux organes dont le cœur et le système nerveux. Les lésions sont localisées aux neurones, aux tubules rénaux, aux cellules acineuses pancréatiques, aux cardiomyocytes, aux cellules surrénaliennes, et à l'épithélium pulmonaires et sont la conséquence de lésions de nécroses consécutives à l'induction de l'apoptose de ces cellules par la réplication massive du virus et de la sécrétion de nombreuses cytokines inductrices de l'apoptose (IFN- β et TGF- β). L'infection débute le plus souvent par l'infection des cellules de l'épithélium nasal par le virus, puis s'étend aux cellules endothéliales, favorisant son passage dans la circulation sanguine. Les virus rejoignent les organes ciblés par le biais de la circulation sanguine, et se répliquent dans le cerveau, la peau, le cœur et les autres organes abdominaux. Ces étapes ont lieu entre 24 et 48h, expliquant l'apparition d'une mortalité brutale de l'animale en raison des lésions multi-organiques. Des lésions endothéliales favorisent l'apparition d'œdèmes et d'hémorragies et de micro-thrombus à l'origine d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et de phénomènes d'ischémie (França & Brown, 2014; Pantin-Jackwood & Swayne, 2009).

Les signes cliniques observés diffèrent chez les différentes espèces de volaille mais on retrouve dans le cadre d'une infection par un IAFP des symptômes bénins à modérés (mortalité faible < 5% chez les gallinacées et infection asymptomatique chez les autres espèces aviaires) avec une forte morbidité (> 50% chez les gallinacées), surtout respiratoires (toux, éternuements, râles crépitants, écoulements oculaires) et affectant peu l'état général (baisse d'activité et de consommation d'eau et de nourriture, diminution de la ponte). Dans le cas d'une infection par un IAHP, les signes cliniques sont sévères, d'apparition brutale et peuvent aboutir à des morts subites. Ils se caractérisent par une atteinte sévère de l'état général (léthargie, coma, chute de la ponte), des signes digestifs (diarrhées muqueuses contenant de la bile ou des urates) et des signes neurologiques après 3 à 10 jours (trémulations de la tête, torticolis, convulsions, ...). On observe cependant peu de signes respiratoires avec les IAHP (França & Brown, 2014; Pantin-Jackwood & Swayne, 2009).

3.1.1.5. Traitement et prévention

Il n'existe pas de traitement médical contre l'influenza aviaire autre qu'un traitement de soutien symptomatique. Les mesures de prophylaxie sont privilégiées afin d'éviter l'importation de la maladie dans un élevage et des mesures de police sanitaire sont mises en place lorsqu'un élevage est contaminé, afin d'éviter la propagation de la maladie aux élevages voisins (Chmielewski & Swayne, 2011).

Les mesures prophylactiques sanitaires sont les principales mesures permettant de limiter le risque d'introduction de la maladie et passent par le respect des bonnes pratiques hygiéniques d'élevage et d'abattage (désinfection des locaux entre chaque lot, apport d'eau potable et de nourriture non contaminées, respect du vide sanitaire entre chaque lot, maintien des carcasses au froid négatif). La communication est un aspect important dans la lutte contre la maladie car elle permet aux éleveurs de reconnaître les prodromes associés à la maladie et d'agir le plus rapidement possible pour empêcher la propagation. La mise en place de réseaux de surveillance événementielle et programmée permet d'identifier des foyers d'Influenza dans l'avifaune sauvage et ainsi de déterminer les zones à risque. Lors de détection d'un foyer d'influenza l'abattage préventif de l'intégralité du lot est recommandé, ainsi que la mise en place d'une zone de quarantaine autour de l'élevage ainsi que de zones de surveillance dans le périmètre de l'élevage infecté (Chmielewski & Swayne, 2011).

La vaccination est à ce jour inefficace dans la prévention de la maladie en raison du fort pouvoir mutagène du virus et des épidémies d'influenza aviaire ont même été observées dans des pays ayant mis en place des programmes de vaccination. La vaccination contre les virus Influenza aviaires est interdite en France (Swayne, 2012).

3.1.2. Présentation du vaccin à ARNm

3.1.2.1. Composition du vaccin

Les laboratoires Merck Animal Health ont reçu l'autorisation conditionnelle de produire et d'utiliser un vaccin à ARNm contre le virus de l'Influenza en raison d'une épizootie ayant eu lieu aux Etats-Unis en 2015. Cette autorisation a permis au laboratoire de produire et de vacciner en urgence les poules pondeuses seulement pour cette épizootie, à condition qu'il respecte des normes d'efficacité et d'innocuité jugées suffisantes par le United States Department of Agriculture (USDA) (Akashalo, 2015).

Le vaccin contient un vecteur plasmidique dérivé de la souche TC-83 d'un Alphavirus, le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne. Ce vecteur est constitué d'un promoteur 26S d'Alphavirus, permettant une bonne amplification de la séquence d'ARNm. La séquence antigénique choisie pour ce vaccin est celle de l'hémagglutinine H5 de la souche de virus Influenza IAFP A/gyrfalcon/Washington/41088/2014. Le vaccin ne contient aucun adjuvant (Ladman *et al.*, 2019).

3.1.2.2. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal utilisé expérimentalement et proposé par la suite repose sur une injection du vaccin par voie SC à des poulets d'une semaine, de 7 semaines et de 18 semaines d'âge. Les poulets étaient ensuite soumis à une injection de la souche IAHP A/turkey/MN/12582/2015 du virus par voie intra-choanale et leur sérum ont été prélevés et soumis à des tests d'inhibition de l'hémagglutination afin d'évaluer la production d'anticorps induite par la vaccination avant chaque administration de vaccin et à 7, 18 et 36 semaines d'âge (Ladman *et al.*, 2019).

3.1.2.3. Efficacité vaccinale

Les analyses effectuées lors de la phase expérimentale cherchaient à mettre en évidence un effet protecteur du vaccin, qui se traduirait par une diminution de la mortalité et de la morbidité, ainsi que de l'excrétion cloacale et orale du virus. Le vaccin à ARN a été testé conjointement avec un vaccin inactivé. Le vaccin à ARN (RP sur la *Figure 53*) a permis de diminuer significativement la morbidité, tout comme le vaccin inactivé, mais a même permis de diminuer significativement la mortalité en comparaison avec le vaccin inactivé, chez des poules de race Leghorn de 7 semaines, 6 semaines après la primo-vaccination (*Figure 53*) (Ladman *et al.*, 2019).

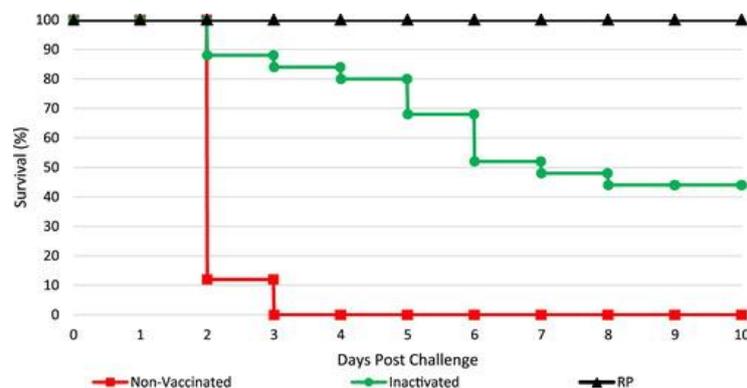


Figure 53 : Effet de la vaccination avec un vaccin à ARN (RP) et avec un vaccin inactivé sur le taux de survie des poules de race Leghorn vaccinées à 1 semaine d'âge selon Ladman *et al.*, 2019

Les deux vaccins ont également permis de diminuer significativement l'excrétion cloacale et orale du virus, cependant, le vaccin à ARN a permis de réduire l'excrétion cloacale de manière beaucoup plus importante que le vaccin inactivé (Ladman *et al.*, 2019).

Pour les individus de 18 semaines, ayant reçu une injection du vaccin à une semaine d'âge, puis une seconde à 7 semaines d'âge, les titres en anticorps sont significativement plus élevés avec deux injections du vaccin à ARN en comparaison avec deux injections de vaccin inactivé. Les taux de séroconversion des individus atteignent 91% avec le vaccin à ARN contre 34% avec le vaccin inactivé.

Lors de ces expérimentations, seules les deux injections de vaccin à ARN ont permis d'empêcher complètement la mortalité des poules. Le vaccin à ARM permet également de diminuer plus efficacement l'excrétion cloacale et orale du virus (Ladman *et al.*, 2019).

Pour les individus de 36 semaines, ayant reçu une injection du vaccin à une semaine d'âge, puis à 7 semaines d'âge et enfin à 18 semaines d'âge, le taux de séroconversion des individus vaccinés uniquement avec le vaccin à ARN atteint 100%, leur taux d'anticorps est significativement plus élevé que pour les autres, et seuls les individus vaccinés uniquement avec le vaccin à ARN sont protégés contre toute mortalité induite par le virus (Figure 54) (Ladman *et al.*, 2019).

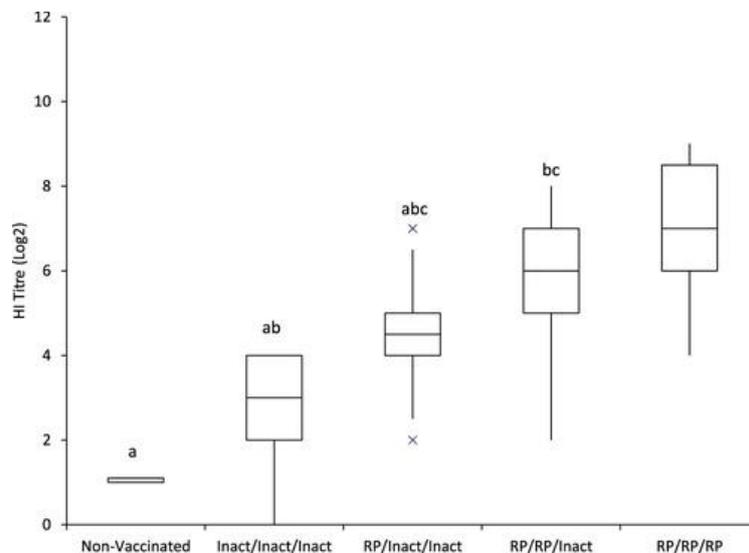


Figure 54 : Effet de la vaccination contre le virus Influenza à l'aide d'injections répétées de vaccin à ARN ou inactivés sur le titre en anticorps selon Ladman *et al.*, 2019

L'hypothèse apportée pour expliquer la supériorité de la vaccination à ARN sur les autres protocoles vaccinaux et notamment la vaccination avec le virus inactivé est l'induction de l'immunité cellulaire en plus de la réponse humorale, contrairement au vaccin inactivé, qui ne permet qu'une réponse humorale. En revanche, l'utilisation de ce vaccin chez les dindes offre des résultats opposés et le vaccin inactivé semble plus intéressant. Il est également important de noter que les poules sont rapidement abattues, et l'administration d'autres injections de rappel est essentielle pour maintenir une protection efficace chez les oiseaux ayant une plus grande espérance de vie. Cependant, ce vaccin a été testé avec une séquence génétique codant pour un antigène homologue à la souche ayant causé l'épizootie et des études supplémentaires sont nécessaires afin de montrer, ou non, la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice contre des souches d'IAHP hétérologues. L'intérêt de ce vaccin est de proposer un vecteur plasmidique dont l'efficacité a été démontrée, qui pourrait servir comme vecteur lors d'une future épizootie en ne modifiant que le gène codant pour l'hémagglutinine (Ladman *et al.*, 2019).

3.2. Vaccin contre la diarrhée épidémique porcine

3.2.1. Présentation de l'agent pathogène

3.2.1.1. Importance

En 1971, des vétérinaires britanniques découvrent une maladie entérique inconnue qui se développe rapidement chez les porcs. Cette nouvelle maladie fut nommée « Diarrhée épidémique porcine » (DEP). Cette maladie se caractérise par une mortalité très élevée chez les porcelets (pouvant atteindre 100%), bien que les porcs de tout âge puissent être infectés, et une contagiosité très importante. L'agent pathogène responsable de la maladie est isolé pour la première fois en Belgique et montre l'implication d'un Coronavirus. La maladie se diffuse ensuite en Europe mais la propagation du virus reste sous contrôle depuis 2000. En revanche, la maladie sévit dans les pays d'Asie, où des pandémies sont observées dans les élevages, causant la mort d'une grande proportion des porcs et porcelets, à l'origine de pertes économiques désastreuses (Gao *et al.*, 2019; Jung & Saif, 2015; C. Lee, 2015; D. Wang *et al.*, 2016). On a également observé en mai 2013 une émergence du virus dans les élevages porcins des Etats-Unis, du Canada et du Mexique, se développant rapidement et affectant grandement l'industrie porcine du pays, avec une perte d'environ 10% de la population totale de porcs d'élevage (près de 7 millions de porcelets au total), au cours d'une épizootie d'une durée d'un an (Jung & Saif, 2015).

3.2.1.2. Epidémiologie

La transmission du virus de la DEP (VDEP) a lieu principalement de manière directe lors de contacts oraux avec la matière fécale provenant de porcs infectés. Une autre voie de contamination directe implique les aérosols contaminés par le virus. Les porcs plus âgés et donc moins sensibles à l'infection, peuvent présenter une infection asymptomatique et transmettre l'agent pathogène aux porcelets, qui sont eux plus sensibles au virus. Une transmission verticale est possible : en effet, l'ARN viral a été retrouvé dans le lait de femelles en lactation, favorisant ainsi la transmission du virus aux porcelets lors de la tétée. Concernant les méthodes de contamination indirectes, les camions de transport des porcs constituent la principale source de transmission du virus entre les porcs, tout comme la nourriture contaminée ou souillée par des matières virulentes (diarrhées et vomitats). Le plasma de porc peut également être utilisé comme additif dans les aliments, or, des études ont montré que 55 à 100% des porcs ayant été infectés par le virus, présentent dans leur plasma des traces du virus. Ce dernier peut donc être transmis indirectement par la nourriture, par le biais d'ajout d'additifs comme le plasma de porcs infectés (Jung & Saif, 2015).

3.2.1.3. Etiologie

Le virus impliqué dans la DEP est un virus de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille des *Coronaviridae* et du genre *Alphacoronavirus*. C'est un virus à ARNs, de polarité positive, dont le génome mesure une taille d'environ 28 000 paires de bases codant pour (Figure 55a et b) (Jung & Saif, 2015; C. Lee, 2015; Z. Li *et al.*, 2020) :

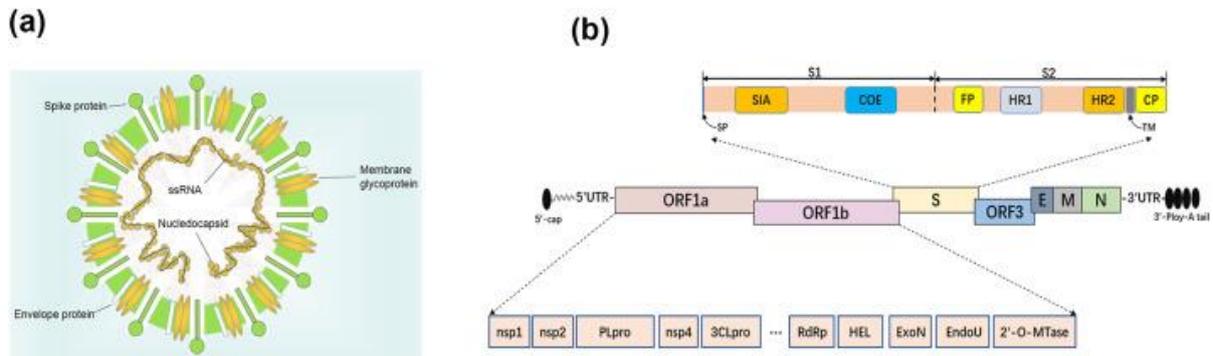


Figure 55 : Schéma du PEDV (a) et organisation génomique du virus (b) selon Z. Li et al., 2020

- ❖ Les séquences ORF1a et ORF1b (ou **ORF1a/b**), pouvant être subdivisés en 16 gènes codant pour 16 protéines non structurales nsP1 à nsP16 et ayant des rôles divers : nsP1 est un facteur de virulence fondamental en inhibant la production d'IFN-I et III et en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires, nsP3 inhibe la production d'IFN-β et d'IFN-λ1, nsP4 stimule la production d'interleukines, nsP5 inhibe la production d'IFN-I, nsP6 induit l'autophagie des cellules, nsP7, 8 et 9 inhibent les activités promotrices d'IFN-β et IRF3 et sont impliquées dans la réplication virale, et nsP13 à 16 sont également impliquées dans la réplication virale, et dans l'inhibition de la production des IFN-I et IFN-III. D'autres séquences sont également présentes sur l'ORF1a/b comme la protéase papaine-like (PLPro, nsP3), impliquée dans le clivage de la polyprotéine ORF1a/b, jouant un rôle dans la synthèse d'ARN viral, la 3C-like protéase (3CLpro, nsP5) jouant un rôle dans la réplication virale, l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp, nsP12), une hélicase (HEL, nsP13), une exoribonucléase (ExoN, nsP14) permettant d'assurer une réplication virale avec une grande fidélité, une endoribonucléase (EndoU, nsP15) jouant un rôle dans l'évasion de la réponse immunitaire, et une 2'-O-méthyltransférase (2'-O-MTase, nsP16) également impliquée dans l'évasion de la réponse immunitaire en limitant la reconnaissance de l'ARN viral par les mécanismes de *sensing* intracellulaires en méthylant la coiffe de l'ARN (C. Lee, 2015; Z. Li et al., 2020).
- ❖ Le **gène S** constituée de nombreuses séquences codant pour différents domaines d'une glycoprotéine de surface du virus (protéine Spike), possédant un haut niveau de diversité génétique et étant impliquée dans l'entrée du virus dans la cellule cible et l'induction de la production d'anticorps neutralisants. Cette protéine est une glycoprotéine homotrimérique reconnue par les récepteurs cellulaires. La sous-unité S1 est formée exclusivement de feuillets β-plissés et se fixe au récepteur cellulaire par le biais de son domaine SIA (Sialic Acid-binding region). La sous-unité S2 est formé d'hélices α regroupés par six, formant ainsi les deux domaines HR1 et HR2. Elle contient également un peptide de fusion (FP), un domaine cytoplasmique et un domaine transmembranaire, impliqués dans la fusion membranaire et favorisant l'endocytose du matériel viral dans la cellule cible (C. Lee, 2015; Z. Li et al., 2020).
- ❖ L'**ORF3** est une protéine accessoire codant pour une protéine ayant une activité de canal ionique, inhibant l'apoptose de la cellule et favorisant l'autophagie du virus par le biais de la production d'IFN-I. Elle favorise également la réplication virale en maintenant les cellules en phase S du cycle cellulaire (phase de synthèse au cours de laquelle la cellule synthétise l'ADN et les protéines qui seront redistribuées dans les deux cellules-filles lors de la mitose), facilitant ainsi la formation de vésicules d'endocytose (C. Lee, 2015; Z. Li et al., 2020).

- ❖ Le **gène E** codant pour la protéine d'enveloppe virale, jouant un rôle important dans l'assemblage des virions. Elle joue également un rôle dans l'induction de l'apoptose en induisant un stress cellulaire à l'origine de la production en grande quantité d'IL-6 et IL-8, à l'origine de l'activation du facteur NF- κ B, entraînant l'apoptose (C. Lee, 2015; Z. Li *et al.*, 2020).
- ❖ Le **gène M** codant pour la protéine membranaire, est impliquée dans le maintien de la cellule en phase S du cycle cellulaire en impliquant la voie des cyclines A. C'est une protéine plutôt conservée entre tous les coronavirus, en faisant une cible idéale pour les méthodes de détection diagnostiques (C. Lee, 2015; Z. Li *et al.*, 2020).
- ❖ Le **gène N** code pour la phosphoprotéine N, extrêmement conservée et impliquée dans la reconnaissance par le système immunitaire avec la présence d'un épitope. Elle est impliquée dans la régulation de la synthèse d'ARN viral, dans la formation de nouveaux virions en enveloppant l'ARN viral néoformé dans les capsides hélicoïdales, dans le maintien des cellules en phase S et dans l'inhibition de la production d'IFN- λ en inhibant la translocation du facteur NF- λ B dans le noyau de la cellule (C. Lee, 2015; Z. Li *et al.*, 2020).

3.2.1.4. Pathogénie et présentation clinique

Le virus, après avoir infecté l'hôte, est retrouvé dans les villosités intestinales, où se trouvent de nombreux récepteurs N aminopeptidase. Ces récepteurs sont reconnus par le virus, favorisant leur entrée dans les entérocytes des villosités intestinales, où ils se répliquent. La réplication virale est un processus rapide dans les entérocytes : en effet, le virus se fixe aux membranes présentes dans le cytoplasme comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le VDEP possède un pouvoir cytolytique important et entraîne une nécrose des entérocytes, induisant alors une atrophie villositaire, uniquement localisée dans l'intestin grêle. Lors d'infections durables, le virus peut migrer jusqu'aux cryptes intestinales et peut parfois infecter les plaques de Peyer. Il peut également atteindre les cellules caliciformes, produisant le mucus intestinal, formant une barrière protectrice contre les bactéries intestinales. De manière anecdotique, le virus a été retrouvé dans les macrophages des pneumocytes, mais semble atteindre uniquement le système digestif (Jung & Saif, 2015).

Les signes cliniques observés chez les porcs sont la conséquence de cette nécrose des entérocytes et de l'atrophie villositaire : en effet, la diarrhée observée est la conséquence d'une malabsorption induite par la diminution de la surface d'échange intestinale et de la perte du nombre d'entérocytes. Une déshydratation est alors observée, conséquence de la diarrhée importante, favorisant les pertes hydriques et majorée par des vomissements, dont l'origine n'est pas complètement éclaircie (Jung & Saif, 2015). La déshydratation est à l'origine d'une acidose, d'une hyperkaliémie, d'une hypernatrémie et d'une hyperchlorémie (Saif *et al.*, 2019). On observe également des pertes de calcium et de bicarbonates par le biais des diarrhées. Des enzymes favorisant la digestion et l'absorption de nutriments par les entérocytes (lactase, saccharidase et maltase) sont normalement présentes sur la bordure des cellules en brosse. La perte des entérocytes entraîne la perte de ces enzymes favorisant la digestion de macronutriments en nutriments absorbables et entretient le phénomène de diarrhée en favorisant l'apparition de diarrhées par maldigestion (Jung & Saif, 2015).

La désorganisation structurelle de la barrière entérocytaire favorise la perte d'eau dans la lumière intestinale redistribution passive de l'eau dans le milieu hyperosmolaire qu'est l'intestin et est également à l'origine du passage de bactéries intestinales dans la circulation sanguine par translocation bactérienne, causant des phénomènes de sepsis, pouvant être une cause supplémentaire de mortalité pour les porcs infectés (Jung & Saif, 2015).

Il existe deux manifestations cliniques de la maladie :

- ❖ Forme **épidémique** : Cette forme se développe notamment dans les élevages séronégatifs n'ayant jamais rencontré le virus. Elle se traduit par l'apparition brutale d'une épidémie de diarrhée et/ou de vomissements, d'anorexie ou de dysorexie chez les porcs de tout âge. Plus les porcs sont jeunes et plus la mortalité est élevée. Chez les porcelets en fin d'engraissement et les truies gestantes, les signes cliniques durent entre 5 et 10 jours avant de rétrocéder. Les truies gestantes s'immunisent contre le virus et transmettent des anticorps dirigés contre le virus à leur descendance par le colostrum (Jung & Saif, 2015).
- ❖ Forme **endémique** : Cette forme se développe dans les élevages ayant déjà rencontré le virus et se manifeste de manière chronique. Les porcelets sont moins sévèrement atteints que les porcs à l'engraissement et que les truies gestantes. La population la plus touchée par cette forme endémique est constituée des porcelets sevrés et les porcelets en nurserie sont principalement atteints par des co-infections bactériennes (*E.coli*) ou virales (CPV-2) (Jung & Saif, 2015).

Des réponses immunitaires sont mises en place afin de lutter contre l'infection virale. Peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes immunitaires mis en jeu contre le virus, mais l'infection par le VDEP est responsable d'une infiltration de lymphocytes CD8+ (réponse CTL), de lymphocytes CD4+ (réponses Th), de cellules mononucléées (macrophages, monocytes) et de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles dans la lamina propria de l'intestin grêle. Des plasmocytes sont également présents et produisent des anticorps spécifiques, retrouvés dans la circulation sanguine, ainsi que dans le MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) (Jung & Saif, 2015).

3.2.1.5. Traitement et prévention

Il n'existe pas de traitement spécifique de la maladie, hormis la mise en place de traitements symptomatiques. La prévention devient alors un outil majeur de lutte contre la maladie. La prophylaxie sanitaire passe par le respect de mesures de biosécurité strictes à l'introduction de porcs dans un élevage sain, la désinfection des locaux et du matériel d'élevage lors du vide sanitaire est fondamentale et des protocoles de désinfection existent. Cette maladie évolue sous forme d'épidémies traversant les frontières et se propageant aux pays voisins. Il est d'autant plus important de respecter cette période de quarantaine lors d'achats de porcs provenant de l'étranger en raison des statuts sanitaires différents pour chaque pays envers la maladie et de l'absence d'obligation de déclaration de la maladie à l'OMS (C. Lee, 2015).

La prophylaxie médicale constitue une autre méthode de lutte non négligeable contre la maladie. La vaccination des truies gestantes permet de contrôler et d'éradiquer la DEP en s'appuyant sur la transmission d'anticorps neutralisants aux porcelets par le colostrum. Le développement d'un vaccin en Europe est freiné par les faibles répercussions de la maladie sur l'économie européenne, contrairement à l'Asie, qui a massivement investi dans le développement de nombreux vaccins efficaces contre le virus. Des vaccins vivants atténués et inactivés ont été développés et permettent d'augmenter le taux de survie, sans réduire significativement la morbidité et l'excrétion du virus dans les selles, rendant les vaccins actuels peu efficaces dans l'éradication de la maladie. La présence d'une production en grande quantité d'IgA neutralisants par la muqueuse intestinale semble être la clé-de-voûte d'un vaccin conférant une immunité optimale aux porcelets contre le virus. Les vaccins à ARNm ne permettent pas la mise en place d'une immunité muqueuse, mais permettent d'échapper aux mécanismes d'interférence avec l'immunité maternelle, tout en protégeant les animaux, ce qui est très intéressant dans la vaccination des porcelets nouveau-nés (C. Lee, 2015).

3.2.2. Présentation du vaccin

3.2.2.1. Composition du vaccin

Le vaccin à ARN contre la DEP est un vaccin ayant obtenu une autorisation d'utilisation conditionnelle aux Etats-Unis en juin 2014 et a même obtenu une autorisation d'utilisation définitive au Mexique et aux Philippines (Crawford *et al.*, 2016; Gerdtts & Zakhartchouk, 2017; Sawattrakool *et al.*, 2020). Ce vaccin est constitué d'une plateforme d'ARN nommée SirraVax™, formée par le vecteur pVEK dérivé du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne et incapable de se répliquer et sensé cibler les cellules dendritiques, dans lequel est encodé une version tronquée de la protéine Spike du virus de la DEP provenant de la souche du VDEP USA/Colorado/2013. Aucun adjuvant n'est présent dans ce vaccin (Crawford *et al.*, 2016; Gerdtts & Zakhartchouk, 2017).

3.2.2.2. Protocole vaccinal

De nombreux protocoles vaccinaux ont été testés afin d'obtenir une efficacité optimale contre le VDEP. Le premier protocole a été développé par le producteur du vaccin HarrisVaccines™ et consiste en une injection du vaccin aux porcelets à la naissance, puis à 21 jours et a permis de diminuer l'excrétion du virus les premières 72h et de diminuer l'expression des diarrhées (Crawford *et al.*, 2016).

Un autre protocole vaccinal mis au point par HarrisVaccines™ a été développé afin de lutter contre le virus dans un élevage où il s'est précédemment établi. Une injection a été réalisée 6 semaines après le début de l'épidémie, chez des truies gestantes par voie IM, 7 à 10 jours avant la mise-bas afin d'induire une immunisation des porcelets à naître, sans succès (Crawford *et al.*, 2016).

Concernant les truies n'ayant jamais rencontré le virus, HarrisVaccines™ a également mis au point un protocole, consistant en trois injections IM à 8, 5 et 1 semaines avant la mise-bas. Un protocole adapté aux truies ayant déjà rencontré le virus a été mis en point et consiste en deux injections IM à 4 et 1 semaine avant la mise-bas. Ce protocole a difficilement permis de réduire la mortalité des porcelets (69% de mortalité pour les individus naïfs vaccinés contre 91% chez le groupe non vacciné et 45% chez les individus ayant rencontré le VDEP contre 59% chez le groupe non vacciné) mais a permis la production d'anticorps neutralisants dans le colostrum (Crawford *et al.*, 2016).

3.2.2.3. Efficacité vaccinale

Les différents protocoles mis au point par le fabricant permettent d'améliorer le taux de survie des porcelets, sans drastiquement réduire le risque de mortalité lié à l'infection par le virus. Un autre protocole a été mis en place et consiste à injecter le vaccin aux truies par voie IM, 7 jours après la mise-bas et constitue le protocole le plus prometteur (Sawattrakool *et al.*, 2020).

Le dernier protocole semble obtenir de meilleurs résultats que ceux obtenus par les autres. En effet, l'injection unique du vaccin par voie IM à des truies ayant été exposées ou non au VPED, 7 jours après la mise-bas permet une production importante d'IgG et d'IgA et d'anticorps neutralisants chez les truies non exposées et déjà exposées au virus, qui ne seront pas présents dans le sérum des truies, mais qu'on retrouve abondamment dans le colostrum, permettant l'immunisation des porcelets. En revanche, dans le groupe des truies naïves, les titres en IgG, en IgA et en anticorps neutralisants dans le sérum des porcelets n'augmentent pas par rapport au groupe contrôle. Cependant, il est constaté que chez les porcelets issus d'une mère vaccinée et non naïve, les titres en IgA et IgG étaient similaires au groupe contrôle, mais les titres en anticorps neutralisants étaient bien supérieurs au groupe contrôle, suggérant la mise en place d'une immunisation. L'hypothèse suggérée permettant d'expliquer ce phénomène est la mise en place d'une immunité muqueuse chez la truie lors de la première rencontre avec le virus ou de la rencontre avec un virus ayant une pathogénie similaire au VPED comme les rotavirus, qui pourrait favoriser la production de lymphocytes B mémoire. L'injection du vaccin agirait alors comme un booster d'immunité muqueuse et permettrait la production d'immunoglobulines spécifiques au VPED. Ce vaccin constitue donc un candidat idéal dans le but de diminuer la mortalité et l'expression clinique de la forme endémique de la maladie (*Tableau IX*) (Sawattrakool *et al.*, 2020).

Tableau IX : Influence de la vaccination des truies sur la mortalité des porcelets avant le sevrage selon Sawattrakool et al., 2020

Table 1 Pre-weaning mortality of PED-RP-vaccinated sows following a PED outbreak

Parameters	PED-RP vaccination		p value
	Vaccination	Non-vaccination	
Total pigs reared	19,576	19,843	–
Number of pre-weaning death	850	3366	0.001
Pre-weaning mortality (%)	4.34	16.96	0.001

4. Etat des recherches en cours sur d'autres applications des vaccins à ARN

4.1. Vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses

Historiquement, les vaccins conventionnels étaient et sont toujours produits par le biais de procédés longs et coûteux, limitant la capacité à répondre rapidement à la menace que sont les agents pathogènes émergents. Les vaccins à ARN, tout comme les vaccins à ADN, sont des technologies susceptibles d'être produits à faible coût et beaucoup plus rapidement que les vaccins conventionnels. En effet, les vaccins à acides nucléiques ne sont pas limités par les procédés de fermentation ou de culture cellulaire et par le rendement de production, mais sont basés sur des procédés de synthèse simples (Erasmus & Fuller, 2020; Sehrawat *et al.*, 2023). L'apport des vaccins à ARNm dans le domaine des maladies émergentes ou ré-émergentes est immense en raison de leur rapidité de développement et leur faible coût de production : en effet, lors de pandémies, une réponse immédiate est fondamentale afin de contrôler la progression de la maladie et ces vaccins, grâce à leurs délais de production, permettent d'apporter cette réponse et ont le potentiel d'enrayer la progression d'un agent pathogène. Dans le cas de la pandémie de COVID-19, qui sévit depuis un peu plus de 3 ans, une douzaine de vaccins à ARNm sont à différentes étapes d'essais cliniques, tandis que la mise au point d'un vaccin conventionnel aurait nécessité plusieurs années à quelques décennies, laissant tout le temps au coronavirus de sévir partout dans le monde (Sehrawat *et al.*, 2023).

Il existe encore certaines maladies infectieuses pour lesquelles il n'existe aucun vaccin suffisamment efficace pour induire la mise en place d'une immunité protectrice chez les animaux de compagnie, comme la péritonite infectieuse féline (PIF) ou les animaux de rente, comme le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB). Concernant le VRSB des vaccins à ARNm exprimant la protéine de fusion F ou la glycoprotéine G contenues sur l'enveloppe du virus sont des candidats potentiels. Concernant la PIF, les travaux effectués sur le coronavirus humain pourraient être transposés et des vaccins à ARNm exprimant la protéine Spike du virus sont prometteurs. Certains vaccins conventionnels sont disponibles chez les animaux de rente, mais possèdent des adjuvants à l'origine d'effets indésirables et peuvent être à l'origine d'une défiance des consommateurs. En effet, les adjuvants ont longtemps été suspectés d'être liés à l'apparition de fibrosarcomes chez le chat après injection répétée du même vaccin, favorisant la mise en place d'une défiance des propriétaires vis-à-vis de la vaccination, bien que cela ait été infirmé par la suite. Les vaccins à ARNm et notamment les nouveaux systèmes de délivrance sous forme de nanoparticules associés à ces vaccins permettent de s'affranchir de l'usage d'adjuvants. D'autres vaccins conventionnels sont disponibles contre les maladies infectieuses mais ne sont pas suffisamment efficaces, c'est notamment le cas des Herpesvirus équin (EHV-1 et 4). Ils présentent même l'inconvénient de pouvoir entraîner une réactivation du virus à l'origine d'éruptions cutanées similaires au zona humain. Les vaccins à ARNm pourraient constituer des candidats idéaux comme vaccins de rappels car ils ne sont pas bloqués par une immunité préexistante mise en place par la primo-vaccination (Sehrawat *et al.*, 2023).

Concernant les vaccins conventionnels, l'injection répétée du même vaccin peut être à l'origine d'une diminution de l'efficacité vaccinale en raison d'un phénomène d'interférence avec des anticorps neutralisants préexistants et produits en réponses aux précédentes injections. Ces anticorps neutralisants n'agissent que dans le secteur extracellulaire. Les vaccins à ARNm ne sont pas la cible de ces anticorps, contrairement aux antigènes contenus dans les vaccins conventionnels, et échappent à ce phénomène d'interférence. Cependant, les protéines obtenues après traduction de l'ARNm vaccinal sont susceptibles d'être la cible de ces anticorps neutralisants (Sehrawat *et al.*, 2023).

Les vaccins à ARNm sont donc des candidats potentiels permettant d'échapper aux phénomènes d'interférence avec l'immunité maternelle, permettant de vacciner les nouveau-nés durant la période critique au cours de laquelle leur système immunitaire est immature mais les anticorps maternels transmis par le colostrum peuvent interférer avec les vaccins, mais nécessitent d'être améliorés dans le but de protéger les antigènes traduits à partir de l'ARNm (Sehrawat *et al.*, 2023).

4.2. Vaccins à ARNm modulateurs de la réponse inflammatoire

Certains agents pathogènes, dont notamment certains virus, peuvent persister dans l'organisme dans un état de dormance et se réactiver lors d'un stress ou d'un stimulus exogène. C'est le cas du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez la souris. L'étude de ce virus a permis de mettre en évidence que la persistance du virus dans l'organisme de la souris était responsable de la mise en place d'une réponse immunitaire à l'origine d'une inflammation chronique des tissus dans lesquels se trouve le virus dormant, créant des lésions dans ces tissus (Oldstone, 2013; Sehrawat *et al.*, 2023; Zinkernagel *et al.*, 2009). La majeure partie du temps, le système immunitaire est à l'origine de l'activation de facteurs pro-inflammatoires, mais il est également à l'origine de l'activation de mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire. Les lymphocytes Treg, les cellules myéloïdes suppressives, certains sous-types de macrophages et les cytokines IL-10, TGF- β ainsi que les molécules nommées résolvines, protectines et galectines sont des effecteurs de la réponse régulatrice de l'inflammation. Les vaccins à ARNm constituent un candidat idéal dans l'optique d'activer cette réponse régulatrice car ils sont capables d'encoder plusieurs épitopes reconnus par différents types de cellules régulatrices, permettant de cibler de nombreuses cellules effectrices, maximisant ainsi l'effet anti-inflammatoire et limitant les lésions tissulaires. Une limite reste la nécessité d'administrer le vaccin localement pour obtenir un résultat optimal. Cette action modulatrice de la réponse inflammatoire offre de nouvelles perspectives quant à la gestion des maladies inflammatoires chroniques (Sehrawat *et al.*, 2023).

4.3. Vaccins à ARNm contre les néoplasies

Les vaccins à ARNm contre les néoplasies visent à stimuler ou activer le système immunitaire de l'hôte et de le diriger contre la tumeur. Les ARNm vaccinaux encodent des antigènes associés à un type de tumeur (TAA pour Tumor-Associated Antigen) ou des antigènes spécifiques d'un type de tumeur (TSA pour Tumor-Specific Antigen), qui sont reconnus par le système immunitaire, les dirigeant contre les cellules tumorales afin de les détruire. Les vaccins à ARNm sont une technologie de choix pour plusieurs raisons : ils sont capables d'encoder plusieurs antigènes tumoraux dans le même brin d'ARN, permettant d'activer à la fois une réponse immunitaire humorale et cellulaire, ils sont également capables d'encoder un antigène complet, contrairement à d'autres types de vaccins comme les vaccins à sous-unité peptidique, permettant aux CPA de présenter différents épitopes simultanément par leurs molécules du CMH-I et II, favorisant ainsi la mise en place d'une multitude de réponses effectrices par les lymphocytes T, et enfin, ils sont sûrs d'utilisation et n'entraînent pas d'effets secondaires importants comme les vaccins vivants atténués (Miao *et al.*, 2021).

Les vaccins à ARNm encodent des TAA exprimés majoritairement par les cellules tumorales. Par exemple, les mélanomes expriment les tyrosinases, la gp100, le MAGE-A3 et le MAGE-C2, qui constituent des TAA intéressants dans le développement des vaccins thérapeutiques contre les mélanomes (Miao *et al.*, 2021; Shemesh *et al.*, 2021).

Cependant, certaines limites s'opposent au développement de ces vaccins encodant des TAA : en effet, seul un nombre limité de TAA ont été identifiés, il existe également chez certains individus une grande variabilité pour le même TAA, favorisant les échecs vaccinaux, et certains TAA sont également présents dans les tissus sains. Pour contourner ces problèmes, la recherche se focalise sur le développement de vaccins ciblant des antigènes tumoraux spécifiques (TSA), aussi appelés néoantigènes, qui sont des antigènes exprimés uniquement par les cellules tumorales à la suite de l'apparition de mutations somatiques et sont reconnus comme faisant partie du « non-soi » par les cellules immunitaires. Il est aujourd'hui également possible de développer des vaccins avec des TSA personnalisés pour chaque patient : tout d'abord, il convient d'identifier les TSA ayant subi des mutations somatiques uniques chez un patient, puis d'exciser la tumeur et d'en séquencer le génome. Les séquences ayant une plus grande immunogénicité sont testées par des algorithmes bio-informatiques et sont sélectionnées afin de produire le vaccin à TSA personnalisé (Miao *et al.*, 2021; Shemesh *et al.*, 2021).

Les vaccins à ARNm ciblant les néoplasies sont des vaccins thérapeutiques. Une perspective d'amélioration de cette technologie consiste à produire des vaccins anti-cancéreux prophylactiques permettant d'empêcher la formation de la tumeur. Produire des vaccins prophylactiques contre les néoplasies s'avère délicat en raison de la difficulté à cibler des antigènes spécifiques conservés chez tous les individus et à obtenir une réponse immunitaire optimale. La mise en place d'une réponse immunitaire durable repose sur la production d'anticorps neutralisants par la reconnaissance par les lymphocytes T CD4+ d'un antigène exogène présenté par les molécules du CMH-II d'une CPA. Or, la lutte contre les cellules tumorales nécessite la mise en place d'une réponse cytotoxique par le biais de la reconnaissance des antigènes endogènes présentés par les molécules du CMH-I des CPA par les lymphocytes T CD8+. Le vaccin anticancer prophylactique optimal doit donc être capable d'induire une forte réponse effectrice CD4+ (réponses Th) mais également une forte réponse effectrice CD8+ (réponse CTL), ajoutant une contrainte supplémentaire dans le choix d'un antigène d'intérêt. Bien qu'un tel antigène n'ait pas été identifié à l'heure actuelle, il n'est pas exclu qu'avec le développement des vaccins à ARNm, un antigène tumoral induisant les deux types de réponses effectrices soit identifié et permet le développement de vaccins prophylactiques contre les néoplasies (Miao *et al.*, 2021).

4.4. Amélioration des vaccins à ARNm

4.4.1. Vaccins à ARNm et vaccination hétérologue

La vaccination hétérologue consiste à induire la production d'anticorps neutralisants permettant d'assurer la protection croisée d'un animal contre plusieurs virus similaires appartenant à la même famille (exemple du vaccin contre la variole avec l'agent pathogène responsable de la vaccine) ou contre différents sous-types ou variants d'un même agent pathogène. Cette protection croisée est un objectif fondamental dans la lutte contre certains agents pathogènes, bien souvent des virus. Chez l'Homme, le Flavivirus responsable de la Dengue possède quatre sérotypes. L'infection par un sous-type donné de ce virus, puis une seconde infection par un autre sous-type peut provoquer la dengue hémorragique (DHF pour Dengue Hemorrhagic Fever) ou la dengue avec syndrome de choc (DSS pour Dengue Shock Syndrome), formes observées principalement chez l'enfant. Cela est entraîné par un phénomène de facilitation de l'infection par les anticorps (ou ADE pour Antibody-Dependent Enhancement) : les anticorps neutralisants produits lors de la primo-infection par un sous-type du virus de la dengue possèdent une faible affinité pour le sous-type infectant l'enfant lors de la seconde infection et sont donc incapables de le neutraliser (Sehrawat *et al.*, 2023).

En revanche, ils vont faciliter l'infection des macrophages, qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance des endothélium vasculaires (VEGF), tous deux responsables d'hémorragies. Des vaccins ont été développés et se heurtent à différentes problématiques : les vaccins monovalents ne permettent pas de protéger les enfants du phénomène d'ADE et ne protègent donc pas contre les formes DHF et DSS et le vaccin Dengvaxia (vaccin viral recombinant) a été commercialisé aux Etats-Unis et permet de protéger contre les 4 sous-types du virus mais a été retiré de la vente car 15% des enfants vaccinés développaient des DHF et des DSS lorsqu'ils étaient en contact avec le virus. Les vaccins à ARNm peuvent apporter des solutions à ces problématiques car ils sont capables d'induire une réponse immunitaire plus complète et importante que les vaccins conventionnels. En effet, ils permettent la mise en place d'une réponse effectrice T helper robuste ainsi qu'une production d'IFN de type I (IFN- α et β notamment) capables de stimuler la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgG avec une haute affinité pour les quatre sous-types. Le virus Zika possède 50% d'homologie avec le virus de la dengue et peut également entraîner une ADE (phénomène cependant inconstant) et nécessite l'utilisation d'un antigène vaccinal n'entraînant pas d'ADE. La versatilité des vaccins à ARNm est un atout supplémentaire dans la formulation d'un vaccin contre la dengue car ils permettent de créer un antigène répondant à ces critères (Sehrawat *et al.*, 2023).

Le virus Influenza est un agent pathogène possédant un important pouvoir mutagène freinant grandement la mise au point d'un vaccin. La mise au point d'un vaccin universel protégeant contre tous les virus Influenza passe par l'utilisation d'antigènes hautement conservés. Les vaccins à ARNm présentent l'avantage d'être rapides à mettre au point et à produire, ce qui permet d'apporter une réponse thérapeutique rapide lors de mutation du virus. Un vaccin expérimental à ARNm encapsulé dans une nanoparticule lipidique (vaccin ARNm-LNP) encodant la séquence d'une hémagglutinine conservée (H1c) a été testé et permet d'induire une protection contre un grand nombre de souches hétérologues de virus H1N1 au cours d'une même saison, sans toutefois induire une protection croisée avec les autres souches virales (Ma *et al.*, 2023). Un autre vaccin expérimental à ARNm modifié encodant les hémagglutinines H1 et H2, ainsi que la protéine de membrane M2 a été testé sur les souris. La séquence de l'ARN vaccinal a été modifiée : les nucléosides uridines ont été remplacés par des pseudouridines, non reconnues par le système immunitaire inné et stabilisant l'ARNm, mais limitant la traduction. Ce vaccin a permis d'induire une protection croisée contre les souches hétérologues A/California/4/2009 (H1N1) et A/Aichi/2/68 (H3N2). L'ARNm est un outil de choix dans la confection d'un vaccin contre les souches hétérologues d'un virus en raison de sa plasticité permettant l'inclusion de plusieurs séquences d'intérêt, ainsi que la modification de sa structure primaire et secondaire (Starostina *et al.*, 2021).

4.4.2. Vaccins à ARNm et interférence avec les anticorps maternels

Chez les nouveau-nés, possédant un système immunitaire immature, l'immunité est assurée par les anticorps neutralisants maternels (MDA pour Maternal Derived Antibodies). Ces anticorps assurent la protection du jeune animal contre les infections bactériennes et virales notamment lors de leurs premières semaines de vie. Cependant, ces anticorps peuvent poser un problème lors de la vaccination et interférer avec les antigènes vaccinaux et compromettre l'efficacité de ce vaccin (Willis *et al.*, 2020).

Un vaccin expérimental à ARNm encapsulé dans un LNP et encodant une séquence avec nucléoside modifié (remplacement de l'uridine par la pseudouridine) codant pour l'hémagglutinine H1 de la souche A/California/07/2009 du virus Influenza a été testé pour mesurer son efficacité dans la mise en place d'une réponse immunitaire chez des souris âgées de 6 à 8 semaines. Dans le cadre d'une infection par ce virus chez un jeune individu, ce sont les IgG maternelles qui exercent leur effet neutralisant dans l'épithélium respiratoire. Ce vaccin à ARNm a permis la mise en place d'une production d'anticorps post-vaccinaux en grande quantité, même en présence de MDA. L'hypothèse apportée permettant d'expliquer ce phénomène est l'induction par le vaccin d'une importante réaction dans les centres germinaux (CG), durable dans le temps, qui pourrait être en lien avec une expression prolongée de l'antigène vaccinal à partir de l'ARNm. Un autre mécanisme pourrait potentialiser la mise en place d'une réponse germinative importante : en effet, certaines études ont montré que les lymphocytes B présentant un antigène à leur surface entraient plus efficacement dans les CG que les lymphocytes B naïfs. Le complexe MDA et antigène vaccinal présenté par les lymphocytes B pourraient alors faciliter l'entrée du lymphocyte dans le CG, potentialisant la réaction germinative. C'est cette réaction germinative prolongée qui semble conférer aux vaccins à ARNm la capacité à échapper à ce phénomène d'interférence avec les MDA, car des vaccins inactivés ont également été testés et ont montré une décroissance rapide du nombre de lymphocytes B dans le CG, contrairement au vaccin ARNm-LNP qui maintient un nombre constant de lymphocytes B dans le CG. Cette réponse germinative est fondamentale car les CG sont le lieu de maturation de l'affinité des anticorps, de la commutation isotypique des anticorps et de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et en lymphocytes B mémoires (Willis *et al.*, 2020).

Cependant ce vaccin à ARNm possède encore quelques limites, comme la difficulté à échapper au phénomène d'interférence à distance de la vaccination et la cinétique lente de production d'anticorps post-vaccinaux (avec une faible production d'anticorps post-vaccinaux peu de temps après la vaccination, laissant une période critique au cours de laquelle le jeune animal risque de développer la maladie). Néanmoins, la vaccination contre le virus Influenza avec un vaccin à ARNm semble plus prometteuse que la vaccination avec un vaccin à ADN, qui donne des réponses inconstantes, en raison de l'expression plus durable de l'antigène. Ce vaccin est donc un candidat intéressant dans la vaccination des jeunes individus en raison de leur bonne innocuité, de leur bonne tolérance, de l'absence d'intégration au génome de l'individu vacciné, facteurs très importants dans la vaccination de cette population à risque, tout en conservant une bonne efficacité (Willis *et al.*, 2020).

4.4.3. Vaccins à ARNm et induction de l'immunité muqueuse

La plupart des agents pathogènes entrent dans l'organisme d'un animal par la voie muqueuse, qui pourrait alors constituer une voie intéressante pour la vaccination. On retrouve au sein de ces muqueuses des tissus lymphoïdes organisés qui diffèrent selon l'organe et qui permettent d'induire la réponse immunitaire muqueuse. Ces tissus lymphoïdes sont nommés MALT (Mucosal-Associated Lymphoid Tissue) et sont composés de couches épithéliales ainsi que de follicules lymphoïdes abritant des cellules dendritiques, des macrophages résidents et des lymphocytes B et T naïfs et mémoires. Chaque MALT possède un nom différent selon l'organe : on trouve ainsi le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) pour l'intestin, dont les follicules lymphoïdes sont les plaques de Peyer et le NALT (Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue) pour l'épithélium respiratoire. On retrouve également des MALT dans la cavité orale, la muqueuse sublinguale et la muqueuse vaginale (Hameed *et al.*, 2022).

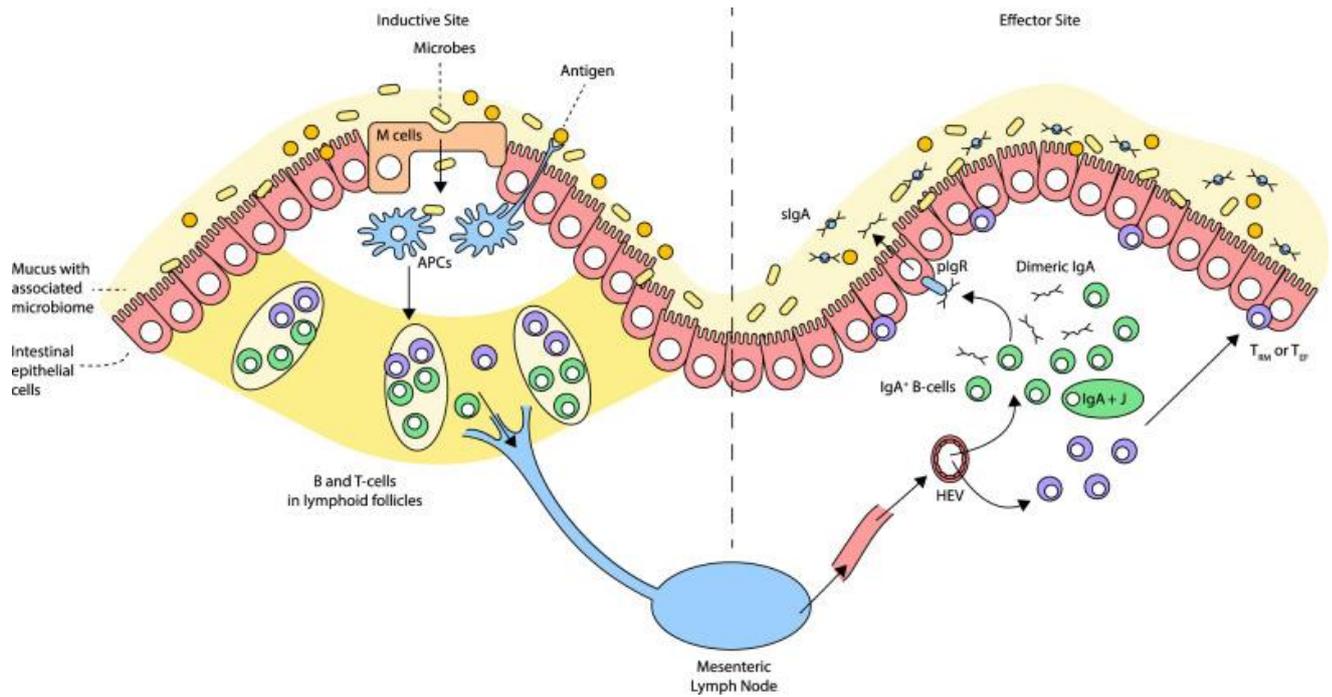


Figure 56 : MALT et réponse immunitaire muqueuse selon Hameed et al., 2022

La plupart des vaccins sont administrés de manière systémique et n'ont que peu d'effets sur l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse, ce qui peut limiter la destruction complète de l'agent pathogène, présent dans les muqueuses et qui peut parfois y persister. Un vaccin idéal doit être en mesure d'induire une réponse immunitaire systémique mais également muqueuse. Chez l'Homme, de nombreux vaccins expérimentaux ont été développés mais peu d'entre eux ont été commercialisés et la majorité d'entre eux sont des vaccins vivants atténués, capables de revenir au phénotype virulent, comme les vaccins contre les sous-types 1 et 3 du Poliovirus (voie orale), contre *Vibrio cholerae* (voie orale), contre les Rotavirus (voie orale) et le virus Influenza (voie nasale) (Hameed et al., 2022). Chez le chien, le vaccin vivant atténué Nobivac KC est un vaccin contre deux agents pathogènes responsables de la toux de chenil (*Bordetella bronchiseptica* et le virus Parainfluenza Canin) administré par voie intranasale (Mitchell & Brownlie, 2015). Un obstacle à l'efficacité des vaccins est la barrière épithéliale, notamment concernant les épithéliums respiratoires, qui sécrètent un mucus limitant le passage des antigènes vaccinaux. Le choix des adjuvants et notamment des systèmes d'amélioration de la délivrance est fondamental et doit permettre de cibler des cellules-clé dans la capture de l'antigène, comme les DC et les cellules M. Il est également important de noter que les cellules M des épithéliums des MALT capturent l'antigène vaccinal et pourraient constituer la cible principale des vaccins à ARNm, dans lesquelles la traduction en antigènes vaccinaux pourrait avoir lieu (Hameed et al., 2022). Les vaccins vivants atténués administrés par voie muqueuse permettent d'induire une meilleure réponse immunitaire muqueuse et systémique que les vaccins inactivés administrés par voie systémique, mais possèdent une faible innocuité. Les vaccins à ARNm sont une alternative intéressante aux vaccins vivants atténués en raison de leur bonne innocuité et leur bonne immunogénicité, mais il est encore trop tôt pour savoir si ces vaccins sont capables d'induire une immunité muqueuse protectrice (Sehrawat et al., 2023).

Néanmoins, de nombreuses études sont en cours et montrent des résultats prometteurs : une étude sur la vaccination contre le SARS-CoV2 chez l'Homme utilisant la technique du « prime-boost » (primo-vaccination avec un vaccin à ARNm encodant la protéine Spike du virus administré par voie parentérale, puis rappel avec un vaccin viral recombinant utilisant un Adénovirus comme vecteur encodant la protéine Spike du virus, administré par voie intranasale) a permis l'induction d'une réponse immunitaire muqueuse robuste chez l'Homme et constitue une perspective intéressante dans la conception de vaccins induisant une réponse immunitaire muqueuse (Sehrawat *et al.*, 2023).

Conclusion

La création des premiers vaccins fut une découverte fondamentale ayant permis la lutte contre de nombreux agents pathogènes, permettant ainsi d'améliorer l'espérance de vie des Hommes et des animaux (Canouï & Launay, 2019). Des premiers vaccins vivants atténués mis au point par Jenner afin de lutter contre la variole, aux vaccins à acides nucléiques développés de nos jours offrant de nouveaux outils thérapeutiques de lutte contre certains cancers (tels que le vaccin à ADN contre les mélanomes oraux canins de stade II et III), la vaccination a connu de grandes avancées ayant contribué à son évolution constante (Dory & Jestin, 2021).

Les vaccins à acides nucléiques, développés au cours des années 90 sont des outils prophylactiques et thérapeutiques prometteurs dans la lutte contre des maladies infectieuses réfractaires aux vaccins conventionnels, et offrent même de nouvelles perspectives dans la lutte contre les cancers, certaines maladies auto-immunes et parfois même contre certains parasites. Les vaccins à ADN furent les premiers vaccins à acides nucléiques étudiés et les premiers favorisés par la communauté scientifiques, ce qui a contribué à la commercialisation de plusieurs vaccins à ADN (contre la maladie du West-Nile chez les chevaux par exemple) (Dory & Jestin, 2021). Par la suite, les vaccins à ARNm ont été préférés aux vaccins à ADN, et ont pris de l'ampleur à la suite de la pandémie de COVID-19 ayant sévi dans le monde (Sehrawat *et al.*, 2023). Ces deux technologies possèdent des caractéristiques intéressantes ayant contribué à leur développement (coût de production faible et développement rapide, bonne immunogénicité théorique, versatiles, bonne innocuité) mais sont encore à ce jour limitées par des défauts importants (défaut d'immunogénicité *in vivo* et défaut de stabilité pour les vaccins à ARNm) (Bouazzaoui *et al.*, 2021; West, 2022; Sehrawat *et al.*, 2023).

En résumé les vaccins à acides nucléiques constituent une perspective intéressante, mais ils ne sont encore qu'à leurs débuts, la technologie ayant un peu plus de 30 ans. Les progrès effectués à la suite de la pandémie de COVID-19 ont permis une avancée significative de la technologie des vaccins à acides nucléiques grâce aux investissements dans la recherche pour le développement de ces vaccins et offrent de nouvelles applications utiles dans le futur. Les avancées effectuées dans les domaines de la biotechnologie, de l'immunologie et de la protéomique permettent d'améliorer l'état des connaissances sur la vaccination, favorisant une meilleure compréhension du mode de fonctionnement des vaccins et les découvertes de demain seront les bases fondamentales permettant de produire de nouveaux vaccins fiables et efficaces (Edwards, 2007).

Bibliographie

- Abraham, S. N., & St John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), p.440-452.
- Ada, G. (2005). Overview of vaccines and vaccination. *Molecular Biotechnology*, 29 (3), p255-272.
- Adler, B. (2015). Vaccines Against Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology (Springer), Leptospira and Leptospirosis* (p. 251-272).
- Agence Nationale de la sécurité du Médicament. Dossier thématique : Procédure d'autorisation de mise sur le marché des vaccins (2021). Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/covid-19-vaccins/covid-19-mise-en-place-et-surveillance-des-essais-cliniques-portant-sur-les-vaccins>
- Agence Régionale de la Santé (2022). *Surveillance épidémiologique des infections à virus West-Nile*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.paca.ars.sante.fr/surveillance-epidemiologique-des-infections-virus-west-nile>
- Aida, V., Pliasis, V. C., Neasham, P. J., North, J. F., McWhorter, K. L., Glover, S. R., & Kyriakis, C. S. (2021). Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine : A Herald to Human Medicine Vaccines. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
- Akashalo (2015). *Harrisvaccines Receives USDA Conditional License for Avian Influenza Vaccine, RNA*, Harrisvaccines [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.merck-animal-health.com/blog/2015/09/21/harrisvaccines-receives-usda-conditional-license-for-avian-influenza-vaccine-rna/>
- Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Cantley, W. L., Dorkin, J. R., Butler, J. S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M. J., Zerial, M., Sah, D. W.,

- Fitzgerald, K., Tracy, M.A., Manoharan, M., Koteliansky, V., de Fougerolles, A., Maier, M. A. (2010). Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Molecular Therapy*, 18(7), p.1357-1364.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), p.783-801.
- Aldrin, M., Storvik, B., Frigessi, A., Viljugrein, H., & Jansen, P. A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(1), p.51-61.
- Almeida, A. M., Queiroz, J. A., Sousa, F., & Sousa, Â. (2020). Minicircle DNA : The Future for DNA-Based Vectors? *Trends in Biotechnology*, 38(10), p.1047-1051.
- Alonso, M., Johnson, M., Simon, B., & Leong, J.-A. (2003). A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A (IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine*, 21(15), p.1591-1600.
- Amanna, I. J., & Slifka, M. K. (2014). Current Trends in West Nile Virus Vaccine Development. *Expert review of vaccines*, 13(5), p.589-608.
- Ashby, B., & Best, A. (2021). Herd immunity. *Current Biology*, 31(4), p.174-177.
- Barnett, K. M., & Civitello, D. J. (2020). Ecological and Evolutionary Challenges for Wildlife Vaccination. *Trends in Parasitology*, 36(12), p.970-978.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), p.3613-3634.
- Bartee, E., Mohamed, M. R., & McFadden, G. (2008). Tumor necrosis factor and interferon : Cytokines in harmony. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), p.378-383.

- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y., & Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants : Smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), p.1238-1248.
- Beissert, T., Perkovic, M., Vogel, A., Erbar, S., Walzer, K. C., Hempel, T., Brill, S., Haefner, E., Becker, R., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2020). A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Molecular Therapy*, 28(1), p.119-128.
- Beláková, J., Horynová, M., Krupka, M., Weigl, E., & Raska, M. (2007). DNA vaccines : Are they still just a powerful tool for the future? *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 55(6), p.387-398.
- Benitez-Cantos, M. S., Yordanova, M. M., O'Connor, P. B. F., Zhdanov, A. V., Kovalchuk, S. I., Papkovsky, D. B., Andreev, D. E., & Baranov, P. V. (2020). Translation initiation downstream from annotated start codons in human mRNAs coevolves with the Kozak context. *Genome Research*, 30(7), p.974-984.
- Bergman, P. J. (2007). Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 22(2), p.55-60.
- Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Ghosh, P., Patra, P., Patra, B. C., Lee, S.-S., & Chakraborty, C. (2022). Bioengineering of Novel Non-Replicating mRNA (NRM) and Self-Amplifying mRNA (SAM) Vaccine Candidates Against SARS-CoV-2 Using Immunoinformatics Approach. *Molecular Biotechnology*, 64(5), p.510-525.
- Birdsall, H. H. (2015). Chapter 5 — Adaptive Immunity : Antibodies and Immunodeficiencies. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* (p. 34-49.e2). W.B. Saunders.

- Bolo, P. & Fournier, C. (Assemblée Nationale) (2023). *Rapport d'information déposé en application de l'article 145 du règlement, par la commission des affaires économiques sur la grippe aviaire et son impact sur les élevages (M. Philippe Bolo et M. Charles Fournier)*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023, à l'adresse : https://www.assemblee-nationale.fr/dyn/16/rapports/cion-eco/116b1069_rapport-information
- Bosco-Lauth, A. M., & Bowen, R. A. (2019). West Nile Virus : Veterinary Health and Vaccine Development. *Journal of Medical Entomology*, 56(6), p.1463-1466.
- Bouazzaoui, A., Abdellatif, A. A. H., Al-Allaf, F. A., Bogari, N. M., Al-Dehlawi, S., & Qari, S. H. (2021). Strategies for Vaccination : Conventional Vaccine Approaches Versus New-Generation Strategies in Combination with Adjuvants. *Pharmaceutics*, 13(2), p.140.
- Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The Biology of Influenza Viruses. *Vaccine*, 26(Suppl 4), p.49-53.
- Brandler, S., & Tangy, F. (2013). Vaccines in Development against West Nile Virus. *Viruses*, 5(10), Art. 10.
- Brisse, M., Vrba, S. M., Kirk, N., Liang, Y., & Ly, H. (2020). Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Brito, L. A., Chan, M., Shaw, C. A., Hekele, A., Carsillo, T., Schaefer, M., Archer, J., Seubert, A., Otten, G. R., Beard, C. W., Dey, A. K., Lilja, A., Valiante, N. M., Mason, P. W., Mandl, C. W., Barnett, S. W., Dormitzer, P. R., Ulmer, J. B., Singh, M., O'Hagan, D.T., Geall, A. J. (2014). A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. *Molecular Therapy*, 22(12), p.2118-2129.
- Bull, J. J., Nuismer, S. L., & Antia, R. (2019). Recombinant vector vaccine evolution. *PLoS Computational Biology*, 15(7).

- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., & Shi, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*, 31(1), p.11-22.
- Canoui, E., & Launay, O. (2019). History and principles of vaccination. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 36(1), p.74-81.
- Capecchi, M. R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22(2 Pt 2), p.479-488.
- Capua, I., Cattoli, G., & Marangon, S. (2004). DIVA--a vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza. *Developments in Biologicals*, 119, p.229-233.
- Causey, D., & Edwards, S. V. (2008). Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(Suppl 1), p.29-33.
- Center for Biologics Evaluation and Research (U.S. Food and Drugs Administration) (2007). *Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications>
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International*.
- Chatenoud, L. (2007). Une étape vers la restauration de la tolérance immunitaire au soi dans les maladies auto-immunes humaines. *médecine/sciences*, 23(2), p.167-172.
- Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases : Principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(11), p.817-838.

- Chen, Y.-Z., Ruan, G.-X., Yao, X.-L., Li, L.-M., Hu, Y., Tabata, Y., & Gao, J.-Q. (2013). Co-transfection gene delivery of dendritic cells induced effective lymph node targeting and anti-tumor vaccination. *Pharmaceutical Research*, 30(6), p.1502-1512.
- Chmielewski, R., & Swayne, D. E. (2011). Avian Influenza : Public Health and Food Safety Concerns. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), p.37-57.
- Clark, G. G., Dein, F. J., Crabbs, C. L., Carpenter, J. W., & Watts, D. M. (1987). Antibody response of sandhill and whooping cranes to an eastern equine encephalitis virus vaccine. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(4), p.539-544.
- Cliff, A., & Smallman-Raynor, M. (2013). Chapter 4 - Vaccination : Interrupting Spatial Disease Transmission. In A. Cliff & M. Smallman-Raynor (Éds.), *Oxford Textbook of Infectious Disease Control : A Geographical Analysis from Medieval Quarantine to Global Eradication* (p. 0). Oxford University Press.
- College of Physicians of Philadelphia (2022). *Different Types of Vaccines*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://cpp-hov.netlify.app/vaccines-101/what-do-vaccines-do/different-types-vaccines>
- Conlan, J. W., Krishnan, L., Willick, G. E., Patel, G. B., & Sprott, G. D. (2001). Immunization of mice with lipopeptide antigens encapsulated in novel liposomes prepared from the polar lipids of various Archaeobacteria elicits rapid and prolonged specific protective immunity against infection with the facultative intracellular pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Vaccine*, 19(25), p.3509-3517.
- Crawford, K., Lager, K. M., Kulshreshtha, V., Miller, L. C., & Faaberg, K. S. (2016). Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada. *Virus Research*, 226, p.108-116.

- Da Silva, A. J., Zangirolami, T. C., Novo-Mansur, M. T. M., Giordano, R. de C., & Martins, E. A. L. (2015). Live bacterial vaccine vectors : An overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), p.1117-1129.
- Dauphin, G., & Zientara, S. (2007). West Nile virus : Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, 25(30), p.5563-5576.
- Davis, B. S., Chang, G.-J. J., Cropp, B., Roehrig, J. T., Martin, D. A., Mitchell, C. J., Bowen, R., & Bunning, M. L. (2001). West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Virology*, 75(9), p.4040-4047.
- De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M. S., & Sanders, N. N. (2012). Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research*, 43(1), p.16.
- Deperasińska, I., Schulz, P., & Siwicki, A. K. (2018). Salmonid Alphavirus (SAV). *Journal of Veterinary Research*, 62(1), p.1-6.
- De Wit, E., Kawaoka, Y., de Jong, M. D., & Fouchier, R. A. M. (2008). Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus in mammals. *Vaccine*, 26, p54-58.
- Dey, S., Chellappa, M. M., Pathak, D. C., Gaikwad, S., Yadav, K., Ramakrishnan, S., & Vakharia, V. N. (2017). Newcastle Disease Virus Vectored Bivalent Vaccine against Virulent Infectious Bursal Disease and Newcastle Disease of Chickens. *Vaccines*, 5(4), p.31.
- Dhama, K., Mahendran, M., Gupta, P. K., & Rai, A. (2008). DNA vaccines and their applications in veterinary practice : Current perspectives. *Veterinary Research Communications*, 32(5), p.341-356.

- Dhar, A. K., Allnutt, F. T., & LaPatra, S. E. (2013). Chapter 20 - Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. In Munir, M. (Ed.), *Mononegaviruses of Veterinary Importance, Volume 1: Pathobiology and Molecular Diagnosis, 1*, p.308-322. CABI International.
- Dixon, P., Paley, R., Alegria-Moran, R., & Oidtmann, B. (2016). Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) : A review. *Veterinary Research, 47*, p.63.
- Dory, D., & Jestin, A. (2021). Vaccins à ADN et à ARN : Des technologies également utilisées en vaccinologie vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 174*.
- Drugs.com (2023). Apex-IHN for Animal Use, [site web] . Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.drugs.com/vet/apex-ihn.html>
- Drugs.com (2023). *Oncept for Dogs*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.drugs.com/vet/oncept.html>
- Dunham, S. P. (2002). The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science, 73*(1), p.9-16.
- Dupuis, M., McDonald, D. M., & Ott, G. (1999). Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine, 18*(5-6), p.434-439.
- Edwards, S. (2007). OIE standards for vaccines and future trends. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics), 26*(2), p.373-378.
- Ellis, J., Marziani, E., Aziz, C., Brown, C. M., Cohn, L. A., Lea, C., Moore, G. E., & Taneja, N. (2022). 2022 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association, 58*(5), p.213-230.
- Entrican, G., & Francis, M. J. (2022). Applications of platform technologies in veterinary vaccinology and the benefits for one health. *Vaccine, 40*(20), p.2833-2840.

- Erasmus, J. H., & Fuller, D. H. (2020). Preparing for Pandemics : RNA Vaccines at the Forefront. *Molecular Therapy*, 28(7), p.1559-1560.
- Esposito, S., Montinaro, V., Groppali, E., Tenconi, R., Semino, M., & Principi, N. (2012). Live attenuated intranasal influenza vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(1), p.76-80.
- EUR-lex (2021). *Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health (Animal Health Law)*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/2021-04-21/eng>
- European Medicines Agency (2018). *Clynav* [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/clynav>
- Fehér, O. E., Fehérvári, P., Tolnai, C. H., Forgách, P., Malik, P., Jerzsele, Á., Wagenhoffer, Z., Szenci, O., & Korbacska-Kutasi, O. (2022). Epidemiology and Clinical Manifestation of West Nile Virus Infections of Equines in Hungary, 2007–2020. *Viruses*, 14(11), p2551.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., Ladnyi, I. D., & Organization, W. H. (1988). Smallpox and its eradication. In World Health Organization, *History of International public health*, 6, p.1371-1409. Consulté le 05 juin 2023 à l'adresse : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39485>
- Fiacre, L., Pagès, N., Albina, E., Richardson, J., Lecollinet, S., & Gonzalez, G. (2020). Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), Art.9117.
- Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Morris, S. C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K. B., Schopf, L., & Urban Jr, J. F. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host

- protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews*, 201(1), p.139-155.
- França, M. S., & Brown, J. D. (2014). Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 385, p.221-242.
- Francis, M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(2), p.231-241.
- Freitas, E. B., Henriques, A. M., Fevereiro, M., Prazeres, D. M., & Monteiro, G. A. (2014). Enhancement of DNA vaccine efficacy by intracellular targeting strategies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1143, p.33-59.
- Gandon, S., Mackinnon, M. J., Nee, S., & Read, A. F. (2001). Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature*, 414(6865), Art. 6865. Consulté le 05 juin 2023 à l'adresse : <https://doi.org/10.1038/414751a>
- Gao, X., Zhang, L., Jiang, X., Mehmood, K., Wang, L., Tong, X., Wang, M., Zhang, H., & Li, J. (2019). Porcine epidemic diarrhea : An emerging disease in Tibetan pigs in Tibet, China. *Tropical Animal Health and Production*, 51(2), p.491-494.
- Garbuglia, A. R., Lapa, D., Sias, C., Capobianchi, M. R., & Del Porto, P. (2020). The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Garren, H. (2009). DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Review of Vaccines*, 8(9), p.1195-1203.
- Garvin, D., Stecha, P., Gilden, J., Wang, J., Grailer, J., Hartnett, J., Fan, F., Cong, M., & Cheng, Z. J. (2021). Determining ADCC Activity of Antibody-Based Therapeutic Molecules using Two Bioluminescent Reporter-Based Bioassays. *Current Protocols*, 1(11).

- Gerdts, V., & Zakhartchouk, A. (2017). Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 206, p.45-51.
- Germeraad, E. A., Sanders, P., Hagenaars, T. J., de Jong, M. C. M., Beerens, N., & Gonzales, J. L. (2019). Virus Shedding of Avian Influenza in Poultry : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses*, 11(9), Art 812.
- Geyer, J., & Janko, C. (2012). Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), p.969-986.
- Ghaffarifar, F. (2018). Plasmid DNA vaccines : Where are we now ? *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 54(5), p.315-333.
- Gote, V., Bolla, P. K., Kommineni, N., Butreddy, A., Nukala, P. K., Palakurthi, S. S., & Khan, W. (2023). A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), Art 2700.
- Grosenbaugh, D. A., Frances-Duvert, V., Abedi, S., Feilmeier, B., Ru, H., & Poulet, H. (2017). Efficacy of a nonadjuvanted recombinant FeLV vaccine and two inactivated FeLV vaccines when subject to consistent virulent FeLV challenge conditions. *Biologicals*, 49, p.76-80.
- Grosenbaugh, D. A., Leard, A. T., Bergman, P. J., Klein, M. K., Meleo, K., Susaneck, S., Hess, P. R., Jankowski, M. K., Jones, P. D., Leibman, N. F., Johnson, M. H., Kurzman, I. D., & Wolchok, J. D. (2011). Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research*, 72(12), p.1631-1638.
- Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X.-Y. (2013). Chapter Seven - Therapeutic Cancer Vaccines : Past, Present, and Future. In K. D.

- Tew & P. B. Fisher (Éds.), *Advances in Cancer Research*, 119, p. 421-475). Academic Press.
- Gupta, S., Leutenegger, C. M., Dean, G. A., Steckbeck, J. D., Cole, K. S., & Sparger, E. E. (2007). Vaccination of Cats with Attenuated Feline Immunodeficiency Virus Proviral DNA Vaccine Expressing Gamma Interferon. *Journal of Virology*, 81(2), p.465-473.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., & Seder, R. A. (2000). DNA Vaccines : Immunology, Application, and Optimization. *Annual Review of Immunology*, 18(1), p.927-974.
- Guy, B., Pascal, N., Françon, A., Bonnin, A., Gimenez, S., Lafay-Vialon, E., Trannoy, E., & Haensler, J. (2001). Design, characterization and preclinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza split vaccine. *Vaccine*, 19(13), p.1794-1805.
- Haig, D. M., Hutchison, G. I., Green, I., Sargan, D., & Reid, H. W. (1995). The Effect of Intradermal Injection of GM-CSF and TNF- α on the Accumulation of Dendritic Cells in Ovine Skin. *Veterinary Dermatology*, 6(4), p.211-220.
- Haiyong, H. (2018). RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1706, p.293-302.
- Hameed, S. A., Paul, S., Dellosa, G. K. Y., Jaraquemada, D., & Bello, M. B. (2022). Towards the future exploration of mucosal mRNA vaccines against emerging viral diseases; lessons from existing next-generation mucosal vaccine strategies. *NPJ Vaccines*, 7, Art 71.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M., & Slifka, M. K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 9(9), p.1131-1137.
- Hanley, K. A. (2011). The double-edged sword : How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution*, 4(4), p.635-643.

- Hearnden, C., & Lavelle, E. C. (2013). Chapter 21 - Adjuvant Strategies for Vaccines : The Use of Adjuvants within the Cancer Vaccine Setting. In G. C. Prendergast & E. M. Jaffee (Éds.), *Cancer Immunotherapy (Second Edition)*, p. 333-349. Academic Press.
- Hedegaard, C. J., & Heegaard, P. M. H. (2016). Passive immunisation, an old idea revisited : Basic principles and application to modern animal production systems. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 174, p.50-63.
- Heffernan, J. M., & Keeling, M. J. (2009). Implications of vaccination and waning immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1664), p.2071-2080.
- Heininger, U., Bachtiar, N. S., Bahri, P., Dana, A., Dodoo, A., Gidudu, J., & Santos, E. M. dos. (2012). The concept of vaccination failure. *Vaccine*, 30(7), p.1265-1268.
- Henderson, L. M. (2005). Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals*, 33(4), p.203-209.
- Herath, T. K., Ferguson, H. W., Weidmann, M. W., Bron, J. E., Thompson, K. D., Adams, A., Muir, K. F., & Richards, R. H. (2016). Pathogenesis of experimental salmonid alphavirus infection in vivo : An ultrastructural insight. *Veterinary Research*, 47(1), Art 7.
- Hiemstra, P. S., & Daha, M. R. (1998). Opsonization. In P. J. Delves (Éd.), *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, p. 1885-1888. Elsevier.
- Ho, N. I., Huis in't Veld, L. G. M., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells : The Key to More Effective Vaccines? *Frontiers in Immunology*, 9.
- Hobernik, D., & Bros, M. (2018). DNA Vaccines - How Far From Clinical Use ? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), Art 3605.

- Horohov, D. W., Dunham, J., Liu, C., Betancourt, A., Stewart, J. C., Page, A. E., & Chambers, T. M. (2015). Characterization of the in situ immunological responses to vaccine adjuvants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *164*(1), p.24-29.
- Horwitz, D. A., Zheng, S. G., & Gray, J. D. (2008). Natural and TGF- β -induced Foxp3⁺CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in Immunology*, *29*(9), p.429-435.
- Hosie, M. J., Osborne, R., Yamamoto, J. K., Neil, J. C., & Jarrett, O. (1995). Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccines. *Journal of Virology*, *69*(2), p.1253-1255.
- Huang, D., Zhao, D., Wang, X., Li, C., Yang, T., Du, L., Wei, Z., Cheng, Q., Cao, H., Liang, Z., Huang, Y., & Li, Z. (2018). Efficient delivery of nucleic acid molecules into skin by combined use of microneedle roller and flexible interdigitated electroporation array. *Theranostics*, *8*(9), p.2361-2376.
- Inaba, K., & Inaba, M. (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *International Journal of Hematology*, *81*(3), p.181-187.
- Ito, Y. (1960). A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. *Virology*, *12*(4), p.596-601.
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology*, *14*(1), p.36-49.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, *16*(4), p.343-353.
- Izac, J. R., O'Bier, N. S., Oliver, L. D., Camire, A. C., Earnhart, C. G., LeBlanc Rhodes, D. V., Young, B. F., Parnham, S. R., Davies, C., & Marconi, R. T. (2020). Development and optimization of OspC chimeritope vaccinogens for Lyme disease. *Vaccine*, *38*(8), p.1915-1924.

- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M., B-cell activation by armed helper T cells (2001). In Janeway, CA Jr, Travers, P., Walport, M., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (5th edition)*. New York: Garland Science; 2001.
- Jansen, M. D., Bang Jensen, B., McLoughlin, M. F., Rodger, H. D., Taksdal, T., Sindre, H., Graham, D. A., & Lillehaug, A. (2017). The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture : A summary of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 40(1), p.141-155.
- Jiménez de Oya, N., Escribano-Romero, E., Blázquez, A.-B., Martín-Acebes, M. A., & Saiz, J.-C. (2019). Current Progress of Avian Vaccines Against West Nile Virus. *Vaccines*, 7(4), Art. 4.
- Johansson, D. X., Ljungberg, K., Kakoulidou, M., & Liljeström, P. (2012). Intradermal Electroporation of Naked Replicon RNA Elicits Strong Immune Responses. *PLoS ONE*, 7(1).
- Jorge, S., & Dellagostin, O. A. (2017). The development of veterinary vaccines : A review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), p.6-13.
- Jose, J., Snyder, J. E., & Kuhn, R. J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4, Art.837.
- Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection : Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal*, 204(2), p.134-143.
- Kallen, K.-J., Heidenreich, R., Schnee, M., Petsch, B., Schlake, T., Thess, A., Baumhof, P., Scheel, B., Koch, S. D., & Fotin-Mleczek, M. (2013). A novel, disruptive vaccination technology. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(10), p.2263-2276.

- Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies : From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, *120*, p.1-14.
- Khatibzadeh, S. M., Gold, C. B., Keggan, A. E., Perkins, G. A., Glaser, A. L., Dubovi, E. J., & Wagner, B. (2015). West Nile virus-specific immunoglobulin isotype responses in vaccinated and infected horses. *American Journal of Veterinary Research*, *76*(1), p.92-100.
- Kibenge, F. S. (2019). Emerging viruses in aquaculture. *Current Opinion in Virology*, *34*, p.97-103.
- Knickelbein, J. E., Khanna, K. M., Yee, M. B., Baty, C. J., Kinchington, P. R., & Hendricks, R. L. (2008). Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8+ T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. *Science*, *322*(5899), p.268-271.
- Kotsias, F., Cebrian, I., & Alloatti, A. (2019). Antigen processing and presentation. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *348*, p.69-121.
- Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B., & Sprott, G. D. (2000). Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses : Comparison to Conventional Liposomes and Alum. *Infection and Immunity*, *68*(1), p.54-63.
- Kumar, R., & Kumar, P. (2019). Yeast-based vaccines : New perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Research*, *19*(2).
- Kurath, G., Garver, K. A., Troyer, R. M., Emmenegger, E. J., Einer-Jensen, K., & Anderson, E. D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *The Journal of General Virology*, *84*(Pt 4), p.803-814.
- Kusakabe, K., Xin, K.-Q., Katoh, H., Sumino, K., Hagiwara, E., Kawamoto, S., Okuda, K., Miyagi, Y., Aoki, I., Nishioka, K., Klinman, D., & Okuda, K. (2000). The Timing of GM-CSF Expression Plasmid Administration Influences the Th1/Th2 Response

- Induced by an HIV-1-Specific DNA Vaccine¹. *The Journal of Immunology*, 164(6), p.3102-3111.
- Ladman, B. S., Gelb, J., Sauble, L. A., Murphy, M. V., & Spackman, E. (2019). Protection afforded by avian influenza vaccination programmes consisting of a novel RNA particle and an inactivated avian influenza vaccine against a highly pathogenic avian influenza virus challenge in layer chickens up to 18 weeks post-vaccination. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 48(4), p.371-381.
- Le, T., Sun, C., Chang, J., Zhang, G., & Yin, X. (2022). mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases. *Viruses*, 14(2), Art.401.
- Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus : An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal*, 12, Art.193.
- Lee, J., Arun Kumar, S., Jhan, Y. Y., & Bishop, C. J. (2018). Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomaterialia*, 80, p.31-47.
- Lee, M. Y., Jeon, J. W., Sievers, C., & Allen, C. T. (2020). Antigen processing and presentation in cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2).
- Légifrance (2018). *Arrêté du 27 juin 2018 relatif à la préparation et à la mise en œuvre d'un programme national d'éradication et de surveillance de la septicémie hémorragique virale et la nécrose hématopoïétique infectieuse*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000037116751>
- Les Producteurs de poulet du Canada (2022). *Vaccination contre l'entérite nécrotique due à Clostridium perfringens de type A au Canada*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.producteursdepoulet.ca/portail/vaccination-contre-lenterite-necrotique/>
- Li, L., & Petrovsky, N. (2016). Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert review of vaccines*, 15(3), p.313-329.

- Li, Z., Ma, Z., Li, Y., Gao, S., & Xiao, S. (2020). Porcine epidemic diarrhea virus : Molecular mechanisms of attenuation and vaccines. *Microbial Pathogenesis*, 149.
- Linares-Fernandez, S., L.-F., Lacroix, C., Exposito, J.-Y., Verrier, B. (2020). Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. *Trends in Molecular Medicine*, 26(3).
- Lindblad, E. B. (2004). Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology and Cell Biology*, 82(5), p.497-505.
- Little, T. J., Hultmark, D., & Read, A. F. (2005). Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology*, 6(7), Art. 7.
- Liu, F., Ge, S., Li, L., Wu, X., Liu, Z., & Wang, Z. (2012). Virus-like particles : Potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 93(2), p.553-559.
- Liu, M. A. (2003). DNA vaccines : A review. *Journal of Internal Medicine*, 253(4), p.402-410.
- Long, A., Richard, J., Hawley, L., LaPatra, S. E., & Garver, K. A. (2017). Transmission potential of infectious hematopoietic necrosis virus in APEX-IHN®-vaccinated Atlantic salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(3), p.213-221.
- Lycett, S. J., Duchatel, F., & Digard, P. (2019). A brief history of bird flu. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1775).
- Ma, N., Xia, Z.-W., Zhang, Z.-G., Nian, X.-X., Li, X.-D., Gong, Z., Zhang, G.-M., Le, Y., Zhou, R., Zhang, J.-Y., & Yang, X.-M. (2023). Development of an mRNA vaccine against a panel of heterologous H1N1 seasonal influenza viruses using a consensus hemagglutinin sequence. *Emerging Microbes & Infections*, 12(1).
- Macnalty, A. S. (1966). A History of Immunization, by H. J. Parish, Edinburgh and London, E. and S. Livingstone, 1965, pp. Xi, 356, 50s. *Medical History*, 10(1), p.101-102.

- Marconi, R. T., Garcia-Tapia, D., Hoevers, J., Honsberger, N., King, V. L., Ritter, D., Schwahn, D. J., Swearingin, L., Weber, A., Winkler, M. T. C., & Millership, J. (2020). VANGUARD@crLyme : A next generation Lyme disease vaccine that prevents *Burgdorferi* infection in dogs. *Vaccine: X*, 6.
- Marsella, A., Pascoli, F., Pretto, T., Buratin, A., Biasini, L., Abbadi, M., Cortinovia, L., Berto, P., Manfrin, A., Vanelli, M., Perulli, S., Rasmussen, J. S., Sepúlveda, D., Vendramin, N., Lorenzen, N., & Toffan, A. (2022). Efficacy of DNA Vaccines in Protecting Rainbow Trout against VHS and IHN under Intensive Farming Conditions. *Vaccines*, 10(12), Art.12.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(2), Art.49.
- Martin, J. E., Pierson, T. C., Hubka, S., Rucker, S., Gordon, I. J., Enama, M. E., Andrews, C. A., Xu, Q., Davis, B. S., Nason, M. C., Fay, M. P., Koup, R. A., Roederer, M., Bailer, R. T., Gomez, P. L., Mascola, J. R., Chang, G.-J. J., Nabel, G. J., Graham, B. S., & Vaccine Research Center 302 Study Team. (2007). A West Nile Virus DNA Vaccine Induces Neutralizing Antibody in Healthy Adults during a Phase 1 Clinical Trial. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(12), p.1732-1740.
- McDougal, V. V., & Guarino, L. A. (2000). The *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus p143 Gene Encodes a DNA Helicase. *Journal of Virology*, 74(11), p.5273-5279.
- McLoughlin, M. F., & Graham, D. A. (2007). Alphavirus infections in salmonids—A review. *Journal of Fish Diseases*, 30(9), p.511-531.
- Meza, E., Becker, J., Bolivar, F., Gosset, G., & Wittmann, C. (2012). Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes

- inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*.
Microbial Cell Factories, 11, Art.127.
- Miao, L., Zhang, Y., & Huang, L. (2021). mRNA vaccine for cancer immunotherapy.
Molecular Cancer, 20, Art.41.
- Miller, I. F., & Metcalf, C. J. (2019). Vaccine-driven virulence evolution : Consequences of unbalanced reductions in mortality and transmission and implications for pertussis vaccines. *Journal of The Royal Society Interface*, 16(161).
- Mitchell, J. A., & Brownlie, J. (2015). The challenges in developing effective canine infectious respiratory disease vaccines. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), p.372-381.
- Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., & Bachmann, M. F. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 34, p.123-132.
- Mor, G., & Eliza, M. (2001). Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Molecular Biotechnology*, 19(3), p.245-250.
- Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, p.2-13.
- Myhr, A. I. (2017). DNA Vaccines : Regulatory Considerations and Safety Aspects. *Current Issues in Molecular Biology*, 22(1), Art. 1.
- National Cancer Institute (2014). *Cancer Staging — NCI*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
- Nevagi, R. J., Toth, I., & Skwarczynski, M. (2018). 12 - Peptide-based vaccines. In S. Koutsopoulos (Éd.), *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, p. 327-358. Woodhead Publishing.

- Niewiesk, S. (2014). Maternal Antibodies : Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies. *Frontiers in Immunology*, 5, Art.446.
- Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles : Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, Art.59.
- Novicki, D. L. (2013). Chapter 8 - Introduction to Vaccines and Adjuvants. In L. M. Plitnick & D. J. Herzyk (Éds.), *Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars, Vaccines and Specialty Biologics*, p. 213-224. Academic Press.
- OIE Terrestrial Manual (WHO). (2018). *Aujeszky disease (Infection with Aujeszky's disease virus)*, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.02_AUJESZKYS.pdf
- Oldstone, M. B. A. (2013). Lessons learned and concepts formed from study of the pathogenesis of the two negative-strand viruses lymphocytic choriomeningitis and influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(11), p.4180-4183.
- Oshop, G. L., Elankumaran, S., & Heckert, R. A. (2002). DNA vaccination in the avian. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89(1-2), p.1-12.
- Ottnod, J. M., Smedley, R. C., Walshaw, R., Hauptman, J. G., Kiupel, M., & Obradovich, J. E. (2013). A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(3), p.219-229.

- Pablos, T. E., Soto, R., Mora, E. M., Le Borgne, S., Ramírez, O. T., Gosset, G., & Lara, A. R. (2012). Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *Journal of Biotechnology*, *158*(4), p.211-214.
- Palma, S. D., McConnell, A., Verganti, S., & Starkey, M. (2021). Review on Canine Oral Melanoma : An Undervalued Authentic Genetic Model of Human Oral Melanoma ? *Veterinary Pathology*, *58*(5), p.881-889.
- Pantin-Jackwood, M. J., & Swayne, D. E. (2009). Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, *28*(1), p.113-136.
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nature reviews. Drug discovery*, *17*(4), p.261-279.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, *6*(11), Art. 11.
- Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., & Bhadana, V. (2022). Codon usage bias. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), p.539-565.
- Passarinha, L. A. (2021). Enhanced Biosynthesis of Plasmid DNA from *Escherichia coli* Applying Experimental Design. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2197*, p.135-150.
- Pastoret, P. P., & Jones, P. (2004). Veterinary vaccines for animal and public health. *Developments in Biologicals*, *119*, p.15-29.
- Pazzi, P., Steenkamp, G., & Rixon, A. J. (2022). Treatment of Canine Oral Melanomas : A Critical Review of the Literature. *Veterinary Sciences*, *9*(5), Art.196.
- Pellin, M. A. (2022). The Use of Oncept Melanoma Vaccine in Veterinary Patients : A Review of the Literature. *Veterinary Sciences*, *9*(11), Art. 11.

- Pikalo, J., Porfiri, L., Akimkin, V., Roszyk, H., Pannhorst, K., Kangethe, R. T., Wijewardana, V., Sehl-Ewert, J., Beer, M., Cattoli, G., & Blome, S. (2022). Vaccination With a Gamma Irradiation-Inactivated African Swine Fever Virus Is Safe But Does Not Protect Against a Challenge. *Frontiers in Immunology*, *13*.
- Platt, R., Vincent, A. L., Gauger, P. C., Loving, C. L., Zanella, E. L., Lager, K. M., Kehrli, M. E., Kimura, K., & Roth, J. A. (2011). Comparison of humoral and cellular immune responses to inactivated swine influenza virus vaccine in weaned pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *142*(3), p.252-257.
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(34), p.12283-12287.
- Plotkin, S. A., & Orenstein, W. A. (2008). *Vaccines (5th edition)*. Elsevier Health Sciences.
- Plotkin, S. A., & Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines : How the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), Art. 12.
- Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology : From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, *21*(2), Art. 2.
- Prouteau, A., Mottier, S., Primot, A., Cadieu, E., Bachelot, L., Botherel, N., Cabillic, F., Houel, A., Cornevin, L., Kergal, C., Corre, S., Abadie, J., Hitte, C., Gilot, D., Lindblad-Toh, K., André, C., Derrien, T., & Hedan, B. (2022). Canine Oral Melanoma Genomic and Transcriptomic Study Defines Two Molecular Subgroups with Different Therapeutical Targets. *Cancers*, *14*(2), Art.276.
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*, *12*(6), Art.6.
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S.-H. (2016). mRNA capping : Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, *44*(16), p.7511-7526.

- Read, A. F., Baigent, S. J., Powers, C., Kgosana, L. B., Blackwell, L., Smith, L. P., Kennedy, D. A., Walkden-Brown, S. W., & Nair, V. K. (2015). Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. *PLOS Biology*, *13*(7).
- Reading, S. A., & Dimmock, N. J. (2007). Neutralization of animal virus infectivity by antibody. *Archives of Virology*, *152*(6), p.1047-1059.
- Ridremont, B. (2022). *Les vaccins aujourd'hui chez les animaux : 2. Adaptation aux enjeux sanitaires et défis sociétaux*, [PDF]. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France sur le sujet : "Louis Pasteur : du vaccin à la santé globale". Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : [academie-veterinaire-defrance.org/fileadmin/user_upload/Publication/Bulletin-AVF/BAVF_2023/Ridremont_vaccins__veterinaires_partie2_bavf_2023.pdf](https://www.academie-veterinaire-defrance.org/fileadmin/user_upload/Publication/Bulletin-AVF/BAVF_2023/Ridremont_vaccins__veterinaires_partie2_bavf_2023.pdf)
- Robinson, H. L., & Torres, C. A. T. (1997). DNA vaccines. *Seminars in Immunology*, *9*(5), p.271-283.
- Roos, A.-K., Eriksson, F., Walters, D. C., Pisa, P., & King, A. D. (2009). Optimization of Skin Electroporation in Mice to Increase Tolerability of DNA Vaccine Delivery to Patients. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, *17*(9), p.1637-1642.
- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M., & Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing : Challenges and bottlenecks. *Vaccine*, *39*(16), p.2190-2200.
- Røsæg, M. V., Thorarinsson, R., & Aunsmo, A. (2021). Effect of vaccines against pancreas disease in farmed Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases*, *44*(12), p.1911-1924.
- Rossi, S. L., Ross, T. M., & Evans, J. D. (2010). West Nile Virus. *Clinics in laboratory medicine*, *30*(1), p.47-65.
- Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L., & Schlossman, S. F. (1988). The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58)

- from human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), p.5190-5194.
- Sabbaghi, A., Miri, S. M., Keshavarz, M., Zargar, M., & Ghaemi, A. (2019). Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Reviews in Medical Virology*, 29(6).
- Saif, L. J., Wang, Q., Vlasova, A. N., Jung, K., & Xiao, S. (2019). Coronaviruses. In *Diseases of Swine*, p. 488-523. John Wiley & Sons, Ltd.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), p.775-787.
- Sandbrink, J. B., & Shattock, R. J. (2020). RNA Vaccines : A Suitable Platform for Tackling Emerging Pandemics? *Frontiers in Immunology*, 11.
- Sawattrakool, K., Stott, C. J., Bandalaria-Marca, R. D., Srijangwad, A., Palabrica, D. J., & Nilubol, D. (2020). Field trials evaluating the efficacy of porcine epidemic diarrhea vaccine, RNA (Harrisevaccine) in the Philippines. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), p.2743-2747.
- Schakowski, F., Gorschlüter, M., Buttgereit, P., Märten, A., Lilienfeld-Toal, M. V., Junghans, C., Schroff, M., König-Merediz, S. A., Ziske, C., Strehl, J., Sauerbruch, T., Wittig, B., & Schmidt-Wolf, I. G. H. (2007). Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression in vivo. *In Vivo (Athens, Greece)*, 21(1), p.17-23.
- Schartz, N. D., & Tenner, A. J. (2020). The good, the bad, and the opportunities of the complement system in neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), Art.354.
- Schat, K. A., & Baranowski, E. (2007). Animal vaccination and the evolution of viral pathogens. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 26(2), p.327-338.

- Scheerlinck, J.-P. Y. (2001). Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, *19*(17), p.2647-2656.
- Schmidt, C., & Schnierle, B. S. (2023). Self-Amplifying RNA Vaccine Candidates : Alternative Platforms for mRNA Vaccine Development. *Pathogens*, *12*(1), Art.138.
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(2 0 2), p.41-52.
- Sehrawat, S., Osterrieder, N., Schmid, D. S., & Rouse, B. T. (2023). Can the triumph of mRNA vaccines against COVID-19 be extended to other viral infections of humans and domesticated animals ? *Microbes and Infection*, *25*(1).
- Sejvar, J. J. (2014). Clinical Manifestations and Outcomes of West Nile Virus Infection. *Viruses*, *6*(2), p.606-623.
- Sela, M., & Hilleman, M. R. (2004). Therapeutic vaccines : Realities of today and hopes for tomorrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(suppl_2), p.14559-14559.
- Shafaati, M., Saidijam, M., Soleimani, M., Hazrati, F., Mirzaei, R., Amirheidari, B., Tanzadehpanah, H., Karampoor, S., Kazemi, S., Yavari, B., Mahaki, H., Safaei, M., Rahbarizadeh, F., Samadi, P., & Ahmadyousefi, Y. (2021). A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virology*, *17*(1).
- Shahar, E., Haddas, R., Goldenberg, D., Lublin, A., Bloch, I., Bachner Hinenzon, N., & Pitcovski, J. (2018). Newcastle disease virus : Is an updated attenuated vaccine needed? *Avian Pathology*, *47*(5), p.467-478.
- Shemesh, C. S., Hsu, J. C., Hosseini, I., Shen, B.-Q., Rotte, A., Twomey, P., Girish, S., & Wu, B. (2021). Personalized Cancer Vaccines : Clinical Landscape, Challenges, and Opportunities. *Molecular Therapy*, *29*(2), p.555-570.

- Shi, Y., Evans, J. E., & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957), Art.6957.
- Siegrist, C.-A. (2013). 2 - Vaccine immunology. In S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, & P. A. Offit (Éds.), *Vaccines (Sixth Edition)* (p. 14-32). W.B. Saunders.
- Simard, N., & Horne, M. (2014). *Salmonid alphavirus and uses thereof* (World Intellectual Property Organization Patent N° WO2014041189A1).
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2003). Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal for Parasitology*, 33(5), p.469-478.
- Skjold, P., Sommerset, I., Frost, P., & Villoing, S. (2016). Vaccination against pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reduces shedding of salmonid alphavirus. *Veterinary Research*, 47(1), Art.78.
- Snyder, R. E., Feiszli, T., Foss, L., Messenger, S., Fang, Y., Barker, C. M., Reisen, W. K., Vugia, D. J., Padgett, K. A., & Kramer, V. L. (2020). West Nile virus in California, 2003–2018 : A persistent threat. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(11).
- Soto, R., Caspeta, L., Barrón, B., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Lara, A. R. (2011). High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochemical Engineering Journal*, 56(3), p.165-171.
- Spackman, E. (2020). A Brief Introduction to Avian Influenza Virus. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2123, p.83-92.
- Spickler, A. R. (U.S Department of Agriculture) (2007). *Infectious Hematopoietic Necrosis*, [PDF]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse : https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/infectious_hematopoietic_necrosis.pdf
- Starostina, E. V., Sharabrin, S. V., Antropov, D. N., Stepanov, G. A., Shevelev, G. Yu., Lemza, A. E., Rudometov, A. P., Borgoyakova, M. B., Rudometova, N. B.,

- Marchenko, V. Yu., Danilchenko, N. V., Chikaev, A. N., Bazhan, S. I., Ilyichev, A. A., & Karpenko, L. I. (2021). Construction and Immunogenicity of Modified mRNA-Vaccine Variants Encoding Influenza Virus Antigens. *Vaccines*, 9(5), Art.452.
- Su, P., Zhang, L., Zhou, F., & Zhang, L. (2022). Circular RNA vaccine, a novel mRNA vaccine design strategy for SARS-CoV-2 and variants. *MedComm*, 3(3), Art.153.
- Suarez, D. L., & Schultz-Cherry, S. (2000). Immunology of avian influenza virus : A review. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(2), p.269-283.
- Sulaimon, S. S., & Kitchell, B. E. (2003). The Basic Biology of Malignant Melanoma : Molecular Mechanisms of Disease Progression and Comparative Aspects. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), p.760-772.
- Swayne, D. E. (2012). Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza. *Avian Diseases*, 56(4 Suppl), p.818-828.
- Takashima, A., & Kitajima, T. (1998). T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells, a critical transition into fully potent antigen presenting cells. *Pathologie-Biologie*, 46(1), p.53-60.
- Taksdal, T., Olsen, A. B., Bjerkås, I., Hjortaas, M. J., Dannevig, B. H., Graham, D. A., & McLoughlin, M. F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 30(9), p.545-558.
- Thorarinsson, R., Wolf, J. C., Inami, M., Phillips, L., Jones, G., Macdonald, A. M., Rodriguez, J. F., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., & Evensen, Ø. (2021). Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 108, p.116-126.

- Tiberio, L., Del Prete, A., Schioppa, T., Sozio, F., Bosisio, D., & Sozzani, S. (2018). Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(4), p.346-352.
- Treggiari, E., Grant, J. P., & North, S. M. (2016). A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), p.845-850.
- Tregoning, J. S., & Kinnear, E. (2014). Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases. *Microbiology Spectrum*, 2(6).
- Turell, M. J., Bunning, M., Ludwig, G. V., Ortman, B., Chang, J., Speaker, T., Spielman, A., McLean, R., Komar, N., Gates, R., McNamara, T., Creekmore, T., Farley, L., & Mitchell, C. J. (2003). DNA Vaccine for West Nile Virus Infection in Fish Crows (*Corvus ossifragus*). *Emerging Infectious Diseases*, 9(9), p.1077-1081.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., & Friedman, A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), p.1745-1749.
- Unnikrishnan, M., Rappuoli, R., & Serruto, D. (2012). Recombinant bacterial vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 24(3), p.337-342.
- Vajjhala, P. R., Ve, T., Bentham, A., Stacey, K. J., & Kobe, B. (2017). The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Molecular Immunology*, 86, p.23-37.
- Valle, G., Carmignani, M., Stanislao, M., Facciorusso, A., & Volpe, A. R. (2012). Mithridates VI Eupator of Pontus and mithridatism. *Allergy*, 67(1), p.138-139.

- van der Meulen, K. M., Pensaert, M. B., & Nauwynck, H. J. (2005). West Nile virus in the vertebrate world. *Archives of Virology*, *150*(4), p.637-657.
- Verganti, S., Berlato, D., Blackwood, L., Amores-Fuster, I., Polton, G. A., Elders, R., Doyle, R., Taylor, A., & Murphy, S. (2017). Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *The Journal of Small Animal Practice*, *58*(1), p.10-16.
- Viljugrein, H., Staalstrøm, A., Molvaer, J., Urke, H. A., & Jansen, P. A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical model on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, *88*(1), p.35-44.
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy : From T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, *20*(11), p.651-668.
- Wang, D., Fang, L., & Xiao, S. (2016). Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Research*, *226*, p.7-13.
- Wang, S., Farfan-Arribas, D. J., Shen, S., Chou, T. W., Hirsch, A., He, F., & Lu, S. (2006). Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, *24*(21), p.4531-4540.
- Wang, Y., Zhang, Z., Luo, J., Han, X., Wei, Y., & Wei, X. (2021). mRNA vaccine : A potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*, *20*, Art.33.
- Warner, R. C., Chapman, R. C., Davis, B. N., & Davis, P. H. (2021). Review of dna vaccine approaches against the parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, *107*(6), p.882-903.

- West, M. (Medical News Today) (2022). mRNA vaccine vs. traditional vaccine : What to know, [site web]. Consulté le 18 juin 2023 à l'adresse :
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/mrna-vaccine-vs-traditional-vaccine>
- Wicherska-Pawłowska, K., Wróbel, T., & Rybka, J. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), Art.13397.
- Wiedermann, U., Garner-Spitzer, E., & Wagner, A. (2016). Primary vaccine failure to routine vaccines : Why and what to do? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(1), p.239-243.
- Willis, E., Pardi, N., Parkhouse, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., Weissman, D., & Hensley, S. E. (2020). Nucleoside-modified mRNA vaccination partially overcomes maternal antibody inhibition of de novo immune responses in mice. *Science translational medicine*, 12(525).
- 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 (New York, N.Y.)*, 247(4949 Pt 1), p.1465-1468.
- Xu, S., Yang, K., Li, R., & Zhang, L. (2020). mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Propection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Art.6582.
- Yamazaki-Nakashimada, M. A., Unzueta, A., Berenise Gámez-González, L., González-Saldaña, N., & Sorensen, R. U. (2020). BCG : A vaccine with multiple faces. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(8), p.1841-1850.

- Yang, H., Dong, Y., Bian, Y., Xu, N., Wu, Y., Yang, F., Du, Y., Qin, T., Chen, S., Peng, D., & Liu, X. (2022). The influenza virus PB2 protein evades antiviral innate immunity by inhibiting JAK1/STAT signalling. *Nature Communications*, *13*, Art.6288.
- Yong, C. Y., Ong, H. K., Tang, H. C., Yeap, S. K., Omar, A. R., Ho, K. L., & Tan, W. S. (2019). Infectious hematopoietic necrosis virus : Advances in diagnosis and vaccine development. *PeerJ*, *7*.
- Yu, Z., Lu, Y., Cao, W., Aleem, M. T., Liu, J., Luo, J., Yan, R., Xu, L., Song, X., & Li, X. (2021). Nano DNA Vaccine Encoding Toxoplasma gondii Histone Deacetylase SIR2 Enhanced Protective Immunity in Mice. *Pharmaceutics*, *13*(10), Art.1582.
- Zhang, N., & Nandakumar, K. S. (2018). Recent advances in the development of vaccines for chronic inflammatory autoimmune diseases. *Vaccine*, *36*(23), p.3208-3220.
- Zhang, X., Yuan, H., Mahmmud, Y. S., Yang, Z., Zhao, M., Song, Y., Luo, S., Zhang, X.-X., & Yuan, Z.-G. (2023). Insight into the current Toxoplasma gondii DNA vaccine : A review article. *Expert Review of Vaccines*, *22*(1), p.66-89.
- Zhao, H.-G., Huang, F.-Y., Guo, J.-L., & Tan, G.-H. (2013). Evaluation on the immune response induced by DNA vaccine encoding MIC8 co-immunized with IL-12 genetic adjuvant against Toxoplasma gondii infection. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, *31*(4), p.284-289.
- Zhou, Q., Wang, F., Zhang, Y., Yang, F., Wang, Y., & Sun, S. (2011). Down-regulation of Prdx6 contributes to DNA vaccine induced vitiligo in mice. *Molecular BioSystems*, *7*(3), p.809-816.
- Zhugunisso, K., Bulatov, Y., Taranov, D., Yershebulov, Z., Koshemetov, Z., Zhunushov, A., Renukaradhya, G. J., Tabynov, K., & Abduraimov, Y. (2018). Beta-propiolactone inactivated bivalent bluetongue virus vaccine containing Montanide ISA-71VG

adjuvant induces long-term immune response in sheep against serotypes 4 and 16 even after 3 years of controlled vaccine storage. *Veterinary Microbiology*, 226, p.23-30.

Zinkernagel, M. S., Bolinger, B., Krebs, P., Onder, L., Miller, S., & Ludewig, B. (2009).

Immunopathological Basis of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Induced Chorioretinitis and Keratitis. *Journal of Virology*, 83(1), p.159-166.

Clément WEISPECKER

ETAT DES LIEUX DES VACCINS A ACIDES NUCLEIQUES EN MEDECINE VETERINAIRE

OVERVIEW OF NUCLEIC ACID VACCINES IN VETERINARY MEDICINE

Thèse d'état de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 05 septembre 2023

RESUME :

Les vaccins sont une technologie ayant contribué à améliorer grandement l'espérance de vie des Hommes et des animaux. La vaccination consiste à inoculer une préparation antigénique qui sera reconnue par les cellules du système immunitaire, induisant ainsi la mise en place d'une immunité protectrice et durable contre un agent pathogène spécifique. C'est à partir de 1796 et grâce aux travaux d'Edward Jenner sur la variole que la vaccination s'est développée. Les découvertes scientifiques au cours des siècles suivants ont permis l'amélioration des technologies vaccinales : de souches atténuées d'agents pathogènes vivants, les vaccins sont de plus en plus complexes et consistent aujourd'hui à inoculer des acides nucléiques codant pour les antigènes d'intérêt. Les vaccins à acides nucléiques sont une technologie récente, développée depuis les années 1990, et ayant connu une médiatisation importante en raison de la pandémie de COVID-19. Les recherches effectuées sur les vaccins à ADN ont permis la commercialisation de quatre vaccins : le vaccin contre la maladie du West Nile chez les équidés, le vaccin contre la maladie pancréatique du saumon, le vaccin contre la nécrose hématopoïétique infectieuse du saumon et le vaccin contre le mélanome oral canin aux stades II et III. Le développement des vaccins à ADN a longtemps été la priorité des chercheurs, mais ils ont progressivement été mis de côté au profit des vaccins à ARN messenger, qui ont connu un engouement en raison de la pandémie de COVID-19 mais qui ne sont pas encore utilisés en médecine vétérinaire.

La première partie de cette thèse se concentre sur des généralités sur les vaccins et la vaccination, la seconde partie porte sur l'étude des vaccins à ADN et la dernière partie sur l'étude des vaccins à ARN messenger.

MOTS CLES :

- VACCIN
- VACCINATION
- MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
- ACIDES NUCLEIQUES
- IMMUNOLOGIE
- ADN
- ARN
- PREVENTION

DATE DE SOUTENANCE : le 05 septembre 2023