

VACCINS A ADN ET A ARN : DES TECHNOLOGIES EGALEMENT UTILISEES EN VACCINOLOGIE VETERINAIRE

DNA AND RNA VACCINES: TECHNOLOGIES ALSO USED IN VETERINARY VACCINOLOGY

Par Daniel DORY et André JESTIN

(Note acceptée le 2 Janvier 2021)

Mots-clés : ADN, ARN, vaccin, Covid-19.

Key words : DNA, RNA, vaccines, Covid-19.

INTRODUCTION

Les circonstances particulières de la pandémie actuelle de SARS-CoV-2 pour laquelle il est nécessaire de disposer rapidement d'un ou de plusieurs vaccins pour enrayer la propagation du virus mettent en avant des stratégies vaccinales innovantes qui, de par la nature nucléique du vaccin, permettent de proposer en un temps record des candidats vaccins. En effet, avec les outils de séquençage haut-débit, il est possible de déterminer en peu de temps la séquence du génome d'un virus émergent, d'identifier sur celle-ci des gènes codant potentiellement des protéines vaccinales et de synthétiser ou de cloner ces gènes, et tout cela sans avoir besoin de cultiver ces agents pathogènes. Les premiers candidats vaccins peuvent donc être rapidement proposés et évalués. S'ils donnent satisfaction, les étapes suivantes de la production du vaccin à ADN ou à ARN à l'échelle industrielle sont parfaitement standardisées et maîtrisées. Tous ces avantages font que la campagne de vaccination à l'échelle mondiale vient de démarrer, alors que le virus de la COVID19 a été identifié il y a un an. Outre le fait de disposer rapidement d'un candidat vaccin à évaluer, cette technologie présente également l'avantage d'être flexible car le candidat vaccin peut à tout moment être modifié en fonction des mutations observées sur les virus pathogènes en circulation. Pour cela il suffit simplement de modifier le gène ou l'ARN messenger correspondant, d'évaluer l'efficacité et la sécurité de ces vaccins avant de lancer, le cas échéant, de nouvelles productions à grande échelle.

Cette démarche de développement de vaccins est bien différente de celle utilisée plus classiquement dans le cadre de vaccins atténués ou inactivés pour lesquels il faut au préalable aussi bien établir les conditions de culture des virus sur cellules ou œufs et les conditions d'inactivation ou d'atténuation. Chacune de ces étapes nécessite beaucoup de temps et n'est pas systématiquement couronnée de succès. C'est seulement ensuite que les premières évaluations de l'efficacité et de la sécurité vaccinales pourront être réalisées. Ceci illustre donc parfaitement pourquoi des vaccins contre le SARS-CoV-2 obtenus par des voies plus classiques n'entreront que dans un second temps dans le panel de vaccins qui seront à notre disposition pour combattre ce virus.

LES VACCINS A ADN

Cette nouvelle stratégie vaccinale basée sur les acides nucléiques n'est dans la réalité pas si nouvelle que ça et a bénéficié des efforts et progrès obtenus dans le domaine depuis près de 30 ans. En 1990, l'équipe de Wolff a montré qu'il était possible d'induire l'expression d'une protéine marqueur (par exemple la luciférase) chez la souris à la suite de l'injection d'un plasmide d'expression eucaryote portant le gène codant cette protéine (Wolff et al. 1990). Par la suite, l'équipe de Jeffrey Ulmer a montré toujours chez la souris que l'inoculation d'un plasmide codant la nucléoprotéine du virus de l'influenza A conférait une réponse immunitaire protectrice (Ulmer et al. 1993). Le

(1) Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale et Biosécurité, 22440 Ploufragan. Courriel : daniel.dory@anses.fr

(2) Académie Vétérinaire de France.
Courriel : andre.jestin1@orange.fr

principe de la vaccination à ADN est né à ce moment-là et des premiers résultats très prometteurs ont été obtenus chez la souris. Les premiers travaux chez des mammifères plus grands vers la fin des années 1990 ont donné des résultats plus mitigés et il a fallu développer de nouveaux outils et/ou de nouvelles stratégies vaccinales afin de contrecarrer toutes ces difficultés. De nombreuses études sur les adjuvants génétiques, les vecteurs plasmidiques, l'adressage et/ou la protection de l'ADN ou encore la combinaison des vaccins à ADN avec des vaccins classiques ont été réalisées. Ces études ont porté sur de nombreux animaux de rente dont les porcs, les bovins, les volailles et les poissons (Collins et al. 2019; Dhama et al. 2008; Meunier et al. 2016). Les progrès successifs en vaccination à ADN ont permis en 2005 la mise sur le marché aux Etats-Unis ou au Canada de trois vaccins à ADN à usage vétérinaire. Dans ces trois cas, le vaccin à ADN a été le premier type de vaccin, voire le seul, efficace contre le pathogène ou la maladie ciblée. Le tout premier vaccin à ADN autorisé était destiné à vacciner les chevaux contre le virus de la fièvre du Nil (West Nile Innovator®) (Dalmo, 2018) (tableau 1). Ce vaccin a permis d'induire la production d'anticorps neutralisants contre ce virus (Davis et al. 2001). Puis il y a eu le vaccin à ADN contre le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse du saumon (Apex-IHN®). Ce vaccin induit une immunité protectrice permettant d'augmenter drastiquement la survie des saumons à 83-98% et de bloquer la transmission du virus suite à une infection expérimentale (Long et al. 2017). Et enfin, il y a eu une autorisation de mise sur le marché d'un vaccin à ADN thérapeutique cette fois-ci, contre le mélanome canin (Canine Melanoma Vaccine). Lorsqu'il est associé à des thérapeutiques anti-cancéreuses classiques, permet de prolonger la vie des chiens malades de quelques semaines à plusieurs mois (Bergman et al. 2006).

Puis en 2017 un vaccin à ADN a obtenu son autorisation d'utilisation en Europe, le vaccin contre la maladie pancréatique du saumon (Clynav®) (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/clynav>). Tout comme les trois autres vaccins à ADN autorisés, ce dernier vaccin est le seul vaccin efficace contre la maladie ciblée. Il permet de limiter les séquelles pancréatiques et la perte de poids liées à la maladie virale.

LES VACCINS A ARN

De manière théorique l'immunité par vaccination à ARN messenger devrait être acquise plus simplement que celle induite par vaccination à ADN. En effet, la vaccination à ARN messenger ne nécessite que, après inoculation du vaccin dans l'organisme, l'entrée de l'ARN messenger dans le cytoplasme de la cellule, cet ARN messenger étant par la suite traduit en protéines vaccinales. En revanche, pour la vaccination à ADN, il faut que l'ADN plasmidique atteigne en plus le noyau de la cellule après son entrée dans le cytoplasme. Dans le noyau, le gène porté par le plasmide sera transcrit en ARN messenger qui sera par la suite traduit en protéine vaccinale dans le cytoplasme. A peu près en même temps que la découverte du principe de la vaccination à ADN, des premiers essais de vaccination à ARN messenger ont été réalisés, mais sans succès car la molécule d'ARN était trop instable (Erasmus & Fuller, 2020). Pour augmenter l'efficacité de la vaccination à ADN, des vecteurs plasmidiques dérivés des alphavirus ont été développés. Ce type de plasmide possède une cassette d'auto-amplification de la transcription du gène codant la protéine vaccinale en ARN messagers, ce qui résulte au final à la présence de plus de copies d'ARN messagers dans chaque cellule transfectée par le plasmide.

Tableau 1 : Les 4 vaccins à ADN à usage vétérinaire autorisés. Tous ces vaccins sont inoculés par la voie intramusculaire

Nom du vaccin (laboratoire)	Pathogène ciblé & Espèce vaccinée	Composition / Dose / Nombre d'inoculations	Efficacité vaccinale	Remarques
West Nile Innovator® (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
Apex-IHN® (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
Oncept™ – Canine Melanoma vaccine (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
Clynav® (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

Ainsi, il a été possible par exemple de réduire au moins 25 fois la quantité de vaccin à ADN nécessaire pour induire une immunité protectrice contre l'herpesvirus de la pseudorange porcine en utilisant ce type de plasmide dérivé du virus Sindbis (Dory et al. 2005). Cette même stratégie a été utilisée par la société HarrisVaccines (rachetée par Merck Animal Health en 2015). Cette société a mis au point une plateforme appelée SirraVaxSM destinée à développer en un temps record des vaccins à ARN immédiatement adaptés à de nouvelles souches virales émergentes. Dans ce cas, le vecteur permettant d'amplifier la répllication de l'ARN est dérivé de l'alphavirus de l'encéphalite équine vénézuélienne. Ainsi, un vaccin à ARN contre l'influenza aviaire hautement pathogène a été développé dans un premier temps. Une licence conditionnelle d'exploitation pour ce vaccin a été accordée par le département de l'agriculture des Etats-Unis en 2015 (<https://www.merck-animal-health.com/blog/2015/09/21/harrisvaccines-receives-usda-conditional-license-for-avian-influenza-vaccine-rna/>). Ce vaccin administré de 1 à 3 reprises à des poules pondeuses de race Leghorn s'est montré protecteur vis-à-vis d'une infection expérimentale virale homologue et a permis de réduire drastiquement le portage viral cloacal (Ladman et al. 2019). Par la suite un vaccin à ARN contre le coronavirus de la diarrhée épidémique porcine a été autorisé également (https://www.sbir.gov/sites/default/files/SBAsuccess_Harrisvaccines_Final.pdf). Pour ce dernier, des résultats de l'efficacité de ce vaccin utilisé dans 2 élevages aux Philippines viennent d'être publiés (Sawattrakool et al. 2020). Ils montrent qu'une immunité maternelle à base d'anticorps de type IgG et IgA et d'anticorps neutralisants induite par ce vaccin est transmise aux porcelets via le colostrum et le lait. La vaccination à ARN messagers *stricto sensu* a nécessité des mises au point particulières en raison de la très grande instabilité de ces molécules. La stabilité de la molécule a été augmentée en incorporant certains éléments structurant (par exemple rajout d'une structure Cap du côté 5', optimisation de la longueur de la queue poly-A ou encore tout en gardant la même information génétique, utilisation de codons plus riches en nucléotides G ou C (Pardi et al. 2018). De plus, l'ARN est associé à des nanoparticules lipidiques qui augmentent la stabilité, la résistance face aux nucléases et la délivrance intracellulaire de celui-ci. La vaccination à ARN a surtout été utilisée comme thérapie anti-tumorale, mais de nombreuses études ont été réalisées pour la vaccination contre agents pathogènes infectieux (Pardi et al. 2018) (tableau 2).

DISCUSSION

Sans rien enlever aux mérites des chercheurs des sociétés BioNTech et Pfizer, le succès rencontré aujourd'hui dans le développement et la validation en un temps record d'un vaccin contre le virus SARS-CoV-2 à usage humain est lié aux efforts consentis depuis près de 30 ans dans la recherche en vaccinologie humaine et vétérinaire. Ces chercheurs ont su développer une plateforme vaccinale à visée humaine dans laquelle ils n'avaient plus qu'à intégrer les ARN messagers codant la protéine spike du virus. Ces ARN sont stabilisés et formulés avec des nanoparticules lipidiques.

Tableau 2 : Deux vaccins ARN produits par HarrisVaccines (rachetée par Merck Animal Health en 2015) et autorisés de manière conditionnelle aux Etats-Unis

Pathogène ciblé Espèce vaccinée	Efficacité vaccinale
Influenza aviaire Poules pondeuses	- Survie des poules suite à une infection expérimentale après 1, 2 ou 3 inoculations du vaccin - Réduction du portage viral cloacal (D'après Ladman et al., 2019)
Coronavirus diarrhée épidémique porcine Porc	- Vaccination des truies - Immunité maternelle à base d'anticorps de type IgG et IgA et d'anticorps neutralisants transmise aux porcelets via le colostrum et le lait (D'après Sawattrakool et al., 2020)

Ceci a permis de proposer rapidement un candidat vaccin qui a été favorablement évalué en terme de sécurité et d'efficacité. Les résultats de la phase III ont été publiés moins d'un an après la découverte du virus lui-même (Polack et al. 2020) et ont permis l'homologation mondiale du vaccin. La spécificité du vaccin n'est liée qu'à la séquence de l'ARN messenger, mais pas à la nature de l'ARN. Ainsi le protocole permettant d'associer l'ARN messenger aux nanoparticules lipidiques est parfaitement maîtrisé en amont, ce qui permet de disposer de toute l'infrastructure pour une production à très grande échelle du vaccin. Il suffit en effet de synthétiser l'ARN messenger et de l'inclure dans la chaîne de production. Ceci donne en outre une très grande souplesse au système qui pourra, si nécessaire, s'adapter à la souche du virus en circulation à un moment donné, si la protéine spike de celui-ci s'est modifiée au fur-et-à-mesure des transmissions du virus. Cette plateforme ayant fait ses preuves pour la vaccination contre le SARS-CoV-2 sera vraisemblablement utilisée dans l'avenir pour développer des vaccins contre de nouveaux agents pathogènes émergent affectant l'homme et pourquoi pas les animaux.

CONCLUSION

Les vaccins à ADN destinés aux animaux ont démontré leur efficacité et des vaccins commerciaux sont autorisés chez le cheval, le saumon et le chien. Dans l'objectif d'augmenter l'efficacité de ce type de vaccins à ADN par injection de plasmides, de nombreux travaux de recherche ont porté sur la mise au point de vecteurs capables de produire dans la cellule une grande quantité d'ARN messagers. Les recherches sur la mise au point de vaccins à ARN destinés aux animaux sont plus récentes. Les vaccins destinés à induire une protection des porcs contre le coronavirus de la diarrhée épidémique porcine et les poulets contre l'influenza aviaire HP représentent un des seuls exemples de vaccin à ARN vétérinaires autorisés à ce jour. Ces technologies restent très prometteuses et sont parfaitement adaptées aux situations d'urgences.

CONFLIT D'INTERET

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt dans la rédaction de cette note qui exprime leur opinion personnelle.

BIBLIOGRAPHIE

- Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Craft DM, Leung, C et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine*. 2006; 24: 4582-5.
- Collins C, Lorenzen N, Collet B. DNA vaccination for finfish aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*. 2019; 85: 106-25.
- Dalmo RA. DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *J Fish Dis*. 2018; 41: 1-9.
- Davis BS, Chang GJJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses *in vitro* a non-infectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*. 2001; 75: 4040-7.
- Dhama K, Mahendran M, Gupta PK, Rai A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Vet Res Commun*. 2008; 32: 341-56.
- Dory D, Torché AM, Béven V, Blanchard P, Loizel C, Cariolet R et al. Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. *Vaccine*. 2005; 23: 3483-91.
- Erasmus JH & Fuller DH. Preparing for Pandemics: RNA Vaccines at the Forefront. *Mol Ther*. 2020; 28: 1559-60.
- Ladman BS, Gelb J Jr., Sauble LA, Murphy MV, Spackman E. 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 pathol*. 2019; 48: 371-81.
- Long A, Richard J, Hawley L, LaPatra SE, Garver KA. Transmission potential of infectious hematopoietic necrosis virus in APEX-IHN(R)-vaccinated Atlantic salmon. *Dis Aquat Organ*. 2017; 122: 213-21.
- Meunier M, Chemaly M, Dory D. DNA vaccination of poultry: The current status in 2015. *Vaccine*. 2016; 34: 202-11.
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018; 17: 261-79.
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020; 383: 2603-15.
- Sawattrakool K, Stott CJ, Bandalaria-Marca RD, Srijangwad A, Palabrica DJ, Nilubol D. Field trials evaluating the efficacy of porcine epidemic diarrhea vaccine, RNA (Harrisvaccine) in the Philippines. *Trop Anim Health Prod*. 2020; 52: 2743-7.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993; 259: 1745-9.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990; 247: 1465-8.