

CHAPITRE 2.3.1

APPLICATION DES BIOTECHNOLOGIES AU DÉVELOPPEMENT DES VACCINS À USAGE VÉTÉRINAIRE

INTRODUCTION

La pratique de la vaccination pour la prévention des maladies animales est utilisée depuis des siècles et a prouvé son efficacité à la fois pour ce qui est du soulagement de la souffrance animale et du bien-être économique des producteurs de produits d'origine animale. Depuis leur invention par Jenner et Pasteur, les vaccins avaient peu changé. Ces dernières 15 ou 20 années en revanche, les types de vaccins disponibles ont évolué de manière significative, ce qui s'explique par un certain nombre de facteurs, notamment leur compatibilité avec les programmes d'éradication et les politiques en matière d'échanges commerciaux internationaux ou encore la rentabilité de leur production. Les premiers vaccins recombinants ont été lancés à la fin des années 1980 pour lutter contre la maladie d'Aujeszky et la rage dans la faune sauvage (Pastoret et al., 1988) ; il s'agissait de précurseurs de produits similaires qui seront disponibles à l'avenir.

Suite à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes qui induisent l'immunité protectrice et à l'explosion des données génomiques concernant aussi bien les agents pathogènes que leurs hôtes, les approches utilisées dans le développement des vaccins se sont rapidement élargies. L'évolution conjointe des nouvelles technologies dans le domaine de la biologie moléculaire et de l'immunologie a en outre largement influencé le développement de nouvelles stratégies vaccinales ainsi que la qualité des produits fabriqués. Elle a permis la conception de vaccins ciblés pour le contrôle et l'éradication d'agents pathogènes spécifiques dans le cadre des exigences régionales, nationales et internationales. Le recours aux techniques de recombinaison va de pair avec la nécessité d'une évaluation bénéfice-risque qui tienne compte des aspects spécifiques à prendre en considération, particulièrement en ce qui concerne la sécurité (voir Annexe 1.1.8.1 Analyse de risque relative aux produits biologiques à usage vétérinaire au Chapitre 1.1.8 Principes de production des vaccins vétérinaires de ce Manuel terrestre).

Le présent chapitre décrit une série de méthodes utilisées pour produire des vaccins conçus dans un but spécifique. La catégorisation doit aider le lecteur à comprendre les techniques employées, mais il faut reconnaître que ces catégories ne s'excluent pas mutuellement (c'est-à-dire que, par exemple, la génétique inverse peut être utilisée pour produire un vaccin chimérique). En principe, ces techniques peuvent être utilisées pour transformer l'agent pathogène lui-même en modifiant ses propriétés par délétion, insertion ou au moyen d'autres modifications génétiques ; elles peuvent également servir à modifier les gènes isolés ou les séquences codantes des agents pathogènes pour produire des immunogènes spécifiques associés à une immunité protectrice.

A. GENETIQUE INVERSE

L'élaboration d'un système de génétique inverse pour toute une série de virus à ARN et à ADN a révolutionné le domaine de la virologie en rendant possible la mise en place de mutations, d'insertions et de délétions dans le génome viral de virus vivants. Cette méthode est désormais employée pour un ensemble d'applications qui comprennent l'atténuation des virus, la modification de la spécificité de l'hôte et la production de virus défectifs pour la réplication. Ces approches servent aussi à mettre au point de nouvelles stratégies vaccinales et sont largement utilisées dans la caractérisation de la structure et de la fonction des séquences codantes et des gènes viraux individuels.

La génétique inverse suppose la création d'une copie clonée d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN par rétrotranscription *in vitro*, la manipulation de l'ADN *in vitro* puis la production du virus vivant modifié par transfection de cellules permissives porteuses de l'ADN cloné. La démonstration de cette technique a été faite pour la première fois au moyen du bactériophage Q bêta, un virus à ARN de polarité positive (Taniguchi, 1978). Par la suite, un grand nombre de virus à ARN de polarité positive et dotés de grands génomes, dont le coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), ont été récupérés, ce qui a contribué à l'étude de la biologie de ces virus et au développement de nouveaux vaccins viraux vivants atténués. Par exemple, la génétique inverse a servi à mettre au point un clone infectieux du virus de la gastroentérite transmissible (VGET), induisant une immunité lactogène chez les porcs immunisés (Sola *et al.*, 2003). Cette nouvelle technique a également été employée pour élaborer un virus modifié du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc, susceptible d'être utilisé comme vaccin DIVA pour différencier les porcs vaccinés des porcs infectés (de Lima *et al.*, 2008).

En raison des caractéristiques intrinsèques des virus à ARN de polarité négative, il a fallu des années de travail avant que cette technique ne parvienne à se développer et soit utilisée pour produire des virus au génome constitué d'ARN de polarité négative. Au départ, la génétique inverse a été développée pour l'influenza, un virus à ARN de polarité négative segmenté. Depuis lors, la technique a été mise en œuvre avec succès pour produire un certain nombre de virus à ARN présentant un génome de polarité négative segmenté ou non segmenté. Par exemple, l'utilisation de cette technique a permis de développer un vaccin contre le virus de l'influenza aviaire, dans lequel le virus fabriqué contenait un gène d'hémagglutinine (HA) du virus H5N1 et un gène de neuraminidase (NA) du virus H2N3, utilisant un squelette de la souche H1N1 (Meeusen *et al.*, 2007). Le vaccin viral inactivé H5N3 ainsi obtenu a induit une protection complète chez les oiseaux contre le sous-type H5N1 hautement pathogène. Une stratégie de génétique inverse a également été utilisée dans le développement de vaccins contre la fièvre aphteuse, la peste porcine classique et la maladie de Newcastle (voir chapitres correspondants 3.1.8., 3.8.3. et 3.3.14.). Plus récemment, des systèmes de génétique inverse ont été développés pour les virus à ARN bicaténaire segmenté, dont celui de la fièvre catarrhale ovine, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies pour le développement de vaccins contre ces virus (Boyce *et al.*, 2008).

Les vaccins inactivés à cycle infectieux unique (DISC) supposent la délétion d'un cadre de lecture ouvert codant pour une protéine clé impliquée dans la réplication virale ou la formation de la capsid virale (Widman *et al.*, 2008). Le virus DISC est isolé dans des cellules exprimant cette protéine clé, fournissant ainsi la protéine manquante sous forme de facteur trans. Ce type de virus, lorsqu'il est injecté aux animaux, ne peut effectuer qu'un cycle de réplication et ne produit pas de progéniture. Les vaccins basés sur ces virus ont un effet plus immunogène qu'un vaccin viral inactivé et ne présentent pas les problèmes associés aux vaccins vivants.

B. TECHNOLOGIE DES VECTEURS RECOMBINANTS

Les progrès de la génétique inverse, de la génomique et de la protéomique ont permis l'identification des mécanismes de virulence, des interactions hôte-agent pathogène et des antigènes protecteurs de nombreux micro-organismes pathogènes ainsi que le développement de vecteurs adaptés pour la libération des antigènes chez l'hôte. La disponibilité des séquences génomiques bactériennes et virales a permis l'élaboration rapide de délétions définies dans les génomes d'une grande variété d'agents pathogènes, ce qui permet non seulement l'atténuation, mais crée aussi un espace pour l'insertion de gènes étrangers codant pour des antigènes provenant de microbes hétérologues. En principe, les vecteurs vivants, qu'ils soient bactériens ou viraux, partagent plusieurs caractéristiques, notamment une production facile et économique, une non-intégration dans le génome de l'hôte, une certaine stabilité et une capacité raisonnable à introduire des gènes codant pour des antigènes hétérologues. De plus, comme pour tout vaccin vivant, le vecteur doit être avirulent et l'incidence de l'immunité sur le vecteur doit être évaluée.

1. Vecteurs bactériens

En règle générale, les vecteurs bactériens sont atténués par délétion de gènes nécessaires aux processus métaboliques clés ou de gènes associés à la virulence. Même s'ils ne sont pas utilisés en routine chez les animaux, des progrès rapides sont réalisés en matière de développement et d'évaluation de différentes bactéries comme vecteurs. Cela fait plusieurs années que le BCG (vaccin bilité de Calmette et Guérin) et *Salmonella* ont été développés comme vecteurs pour fournir des antigènes vaccinaux aux animaux et le second est également utilisé pour produire des souches vaccinales vivantes pour les volailles. À l'heure actuelle, il existe un certain nombre d'autres vecteurs bactériens en cours de développement sur la base de micro-organismes commensaux (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Staphylococcus*) ou d'organismes pathogènes atténués (*Shigella*,

Bacillus, *Yersinia*, *Vibrio*, *Cornebacteria* et *Bordetella*), tous étant actuellement soumis à une évaluation de leur capacité à induire une immunité protectrice.

2. Vecteurs viraux

La plupart des vecteurs viraux sont créés en utilisant des virus qui ne sont associés à aucune maladie ou à des maladies bénignes ; ils peuvent aussi être produits au moyen de virus pathogènes, mais atténués par délétion de gènes de virulence. Des vecteurs viraux aptes à la réplication et à produire une progéniture, ainsi que des vecteurs viraux défectifs pour la réplication ne produisant pas de descendance ont été développés et évalués pour servir de vecteurs vaccinaux. Un certain nombre de vaccins commerciaux reposant sur des vecteurs viraux à ADN, dont les poxvirus et les herpèsvirus, ont été autorisés pour être utilisés en médecine vétérinaire (point examiné dans Gerdt et al., 2006). Ceux-ci incluent des vecteurs basés sur le virus de la vaccine, le virus de la variole du canari, le virus de la variole aviaire et l'herpèsvirus du dindon. Un certain nombre de vecteurs viraux ont été mis au point ou sont en cours de développement, d'amélioration et d'évaluation. Ceux-ci comprennent des virus à ARN, tels que le virus de l'encéphalite équine du Venezuela, le virus de la maladie de Newcastle ou encore le virus spumeux félin, ainsi que des virus à ADN, comme les adénovirus, les herpèsvirus ou les poxvirus. Les vecteurs de la variole aviaire et de la variole du canari sont utilisés pour un grand nombre d'applications (MacLachlan et al., 2007 ; Swayne, 2009) ; quant aux vecteurs adénoviraux humains défectifs pour la réplication, ils ont fait leurs preuves dans le développement de vaccins contre le virus de la fièvre aphteuse (Rodriguez et Grubman, 2009). Les vaccins homologués faisant appel à des vecteurs basés sur la variole du canari incluent des vaccins contre la grippe équine et la leucose féline. Parmi les autres vaccins vectorisés homologués, citons l'herpèsvirus du dindon, vectorisé en y insérant la bursite infectieuse.

C. VACCINS DELETES

La connaissance des facteurs de virulence spécifiques à un agent pathogène et l'existence de la technologie de l'ADN recombiné facilitent la création d'agents pathogènes spécifiques délétés d'un ou de plusieurs gènes et destinés à être utilisés comme vaccins vivants. L'approche qui consiste à créer et à analyser des délétions de gènes permet de réduire la pathogénicité/virulence de l'organisme sans en diminuer l'immunogénicité. Ces organismes délétés d'un ou de plusieurs gènes peuvent être utilisés comme vaccins dans la mesure où ils conservent les propriétés immunogènes de l'organisme sauvage mais ne peuvent provoquer la maladie. Cependant, pour être efficaces dans ce rôle, il faut des organismes génétiquement stables et qui soient faciles à cultiver et à administrer. À ce jour, les gènes participant soit à déterminer la virulence ou à réguler les processus métaboliques majeurs du ou des micro-organismes ont été ciblés pour les délétions.

Cette approche a fait ses preuves pour la création de plusieurs souches vaccinales vivantes atténuées d'agents pathogènes bactériens génétiquement stables, dont l'utilisation est sûre et qui induisent une meilleure protection que les vaccins inactivés. Les vaccins délétés contre *Salmonella enterica* sérovar *typhimurium* et sérovar *enteritidis* ont été homologués pour être utilisés chez les volailles (Babu et al., 2004 ; Meesun et al., 2007) ; de la même manière, un vaccin contre *Streptococcus equi* délété du gène *aroA* a été homologué pour être utilisé chez les chevaux (Jakobs et al., 2000 ; Meesun et al., 2007).

Cette technique est également efficace pour créer des souches vaccinales vivantes atténuées d'agents pathogènes viraux génétiquement stables qu'il est possible d'utiliser comme vaccins marqueurs pour différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. Un vaccin marqueur délété de deux gènes (gE et TK) contre le virus de la pseudorabie a été homologué pour être utilisé chez les porcs (Ferrari et al., 2000 ; Meesun et al., 2007) ; de même, un vaccin marqueur délété du gène gE contre l'herpèsvirus bovin de type 1 a été homologué pour être utilisé chez les bovins (Meesun et al., 2007 ; Van Oirschot et al., 1996).

D. VIRUS CHIMERIQUES

Les virus chimériques se définissent comme des virus recombinants qui peuvent contenir des parties de deux génomes viraux étroitement apparentés. Par exemple, un virus chimérique peut contenir des gènes structuraux d'un sérotype viral et des gènes non structuraux d'un autre sérotype du même virus. Il se peut aussi qu'un virus chimérique contienne une partie du génome de différents membres de la même famille de virus. En principe, les virus chimériques présentent les caractéristiques biologiques des deux virus parents. L'un des avantages majeurs de cette approche réside dans le fait qu'une dose unique de virus chimérique fournit le répertoire complet des

antigènes qui ressemblent étroitement à l'agent pathogène, ce qui peut induire une réponse immune protectrice contre de multiples agents pathogènes viraux appartenant à un ou plusieurs sérotypes du même agent pathogène viral.

L'existence de clones d'ADN complémentaire (ADNc) pleine longueur infectieux provenant de différents virus à ARN grâce à la génétique inverse a permis de nouvelles stratégies pour le développement des vaccins. Les pestivirus chimériques ont été créés en utilisant un clone d'ADNc infectieux contenant les squelettes du génome du virus de la peste porcine classique (VPPC) ou du génome du virus de la diarrhée virale bovine (VDVB). Un pestivirus chimérique a ainsi été créé en remplaçant la séquence codante E2 du VDVB dans la copie d'ADN infectieux de la souche CP7 du VDVB par la séquence codante E2 correspondante de la souche Alfort 187 du VPPC (Reimann *et al.*, 2004). Un autre virus chimérique a été mis au point en remplaçant la séquence codante E2 du VPPC dans la copie d'ADN infectieux de la souche vaccinale C du VPPC par la séquence codante E2 correspondante du VDVB (van Gennip *et al.*, 2000). Ces virus chimériques se sont avérés atténués chez les porcs, tout en induisant une protection complète contre le VPPC et en permettant de faire la distinction entre les porcs vaccinés et les porcs infectés (Reimann *et al.*, 2004 ; van Gennip *et al.*, 2000).

Dans une autre application, des circovirus porcins (CVP) chimériques ont été isolés au moyen de clones d'ADNc infectieux du circovirus porcin CVP1 où la protéine de capsid du CVP2 pathogène était utilisée pour remplacer le gène correspondant dans la souche CVP1 non pathogène (CVP1-2). De même, le gène de la capsid de CVP2 a été remplacé par le gène de CVP1 (CVP2-1). Le virus chimérique CVP1-2 s'est révélé atténué chez les porcs, tout en induisant une immunité protectrice contre la forme sauvage du CVP2 chez les porcs (Fenaux *et al.*, 2004).

Cette plateforme technologique a également été employée pour produire des flavivirus chimériques. Un virus chimérique a par exemple été obtenu en remplaçant les séquences codantes pour les protéines structurales de la souche 17D du virus de la fièvre jaune par celles du virus du Nil occidental (VNO). Une dose unique de ce vaccin à base de flavivirus chimérique a induit à la fois des réponses immunitaires humorales et par médiation cellulaire chez les chevaux, les protégeant du VNO sans entraîner de maladie clinique (Meeusen *et al.*, 2007). La même plateforme technologique a servi à développer des vaccins humains contre le virus de l'encéphalite japonaise, le VNO et le virus de la dengue. Même si les vaccins à base de flavivirus chimériques ont démontré un profil de tolérance satisfaisant et une protection efficace, il convient de rester prudent au moment d'évaluer les variations de virulence des virus chimériques.

E. VACCINS SOUS-UNITAIRES

Les vaccins sous-unitaires composés de protéines purifiées ou semi-purifiées sont sur le marché depuis le début des années 1980 ; les sous-unités produites grâce à la technologie de l'ADN recombiné existent depuis les années 1990 (Cohen, 1993 ; Rhodes *et al.*, 1994 ; Ulmer *et al.*, 1993 ; 1995). Ces dernières suscitent un intérêt grandissant et une activité croissante depuis cette période. Les vaccins sous-unitaires n'incluent pas les techniques basées sur les vecteurs recombinants vivants, qui produisent des protéines recombinantes *in vivo*. La génomique et les domaines connexes ont révolutionné la manière d'identifier les antigènes microbiens. Depuis le séquençage du premier génome bactérien en 1995, le nombre de génomes bactériens, viraux et parasitaires dont les séquences génomiques sont disponibles a considérablement augmenté. En effet, presque tous les agents pathogènes des animaux sont représentés et ceux qui ne le sont pas peuvent être aisément obtenus en moins d'une journée. Qui plus est, les ressources et outils de bioinformatique nécessaires à l'analyse de ces génomes se sont développés en parallèle et il est désormais relativement simple d'identifier les antigènes exposés en surface, les épitopes spécifiques des lymphocytes B et T, etc. Il n'y a pas d'exigence en matière de capacité à cultiver l'organisme en culture : par exemple, des vaccins sous-unitaires pour *Piscirickettsia salmonis*, un agent pathogène des salmonidés, ont été mis au point, bien que l'organisme ne soit pas facile à cultiver (Kuzyk *et al.*, 2001).

La production d'antigènes sous-unitaires peut passer soit par les techniques classiques de la biochimie soit par la technologie de l'ADN recombiné. Cette dernière fait intervenir un ensemble de systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes, notamment les levures, les cellules d'insectes et les végétaux (Chichester et Yusibov, 2007) au moyen de diverses stratégies d'expression intégrées ou transitoires. Les techniques biochimiques demeurent utiles dans certains cas où l'expression recombinante n'est pas appropriée, notamment lorsque les antigènes nécessitent un assemblage complexe (ex. : fimbriae) ou lorsqu'une modification post-traductionnelle est nécessaire. Ainsi, *Campylobacter jejuni*, une espèce bactérienne dont la réaction de glycosylation concerne de nombreuses protéines de surface, reste le meilleur moyen de produire ces dernières plutôt que de passer par des systèmes d'expression hétérologues, même si des souches d'*Escherichia coli* ont été conçues pour remplir la même fonction (Wacker *et al.*, 2002). Le vaccin original contre la diarrhée du veau dirigé contre l'antigène K99

d'*E. coli*, testé il y a une trentaine d'années (Acres *et al.*, 1979), constitue un excellent exemple de vaccin sous-unitaire composé d'un antigène authentique ayant conservé sa structure tridimensionnelle. Ce produit était basé sur l'antigène fimbrial K99, facile à extraire des cellules par traitement thermique, ce qui permettait de conserver la structure fimbriale tridimensionnelle. Citons également un vaccin exprimé par un baculovirus contre le circovirus porcin de type 2 (Fachinger *et al.*, 2008). Dans un certain nombre de cas, la protéine du vaccin sous-unitaire exprimée s'assemble spontanément et forme des particules bien définies qui ressemblent à des particules virales. Ces particules pseudo-virales (VLP) constituent une sous-catégorie de vaccins sous-unitaires (Roy et Noad, 2008), dont l'application dans le développement des vaccins est examinée à la section F. Des vaccins contenant la protéine ORF2 du CVP2 exprimé par baculovirus ont été mis sur le marché.

Les vaccins sous-unitaires peuvent présenter des avantages par rapport aux vaccins inactivés ou aux vaccins vivants atténués, notamment leur capacité à induire une réponse immunitaire humorale et par médiation cellulaire forte. Ces vaccins disposent en outre d'un excellent profil d'innocuité et peuvent être utilisés en association avec d'autres vaccins sous-unitaires. Cependant, leur efficacité dépend de l'immunité protectrice induite par inoculation d'une seule ou d'une série de protéines recombinantes définies. L'expérience a montré que cet élément pouvait être altéré par le système d'expression génétique utilisé. Par ailleurs, les vaccins sous-unitaires peuvent être onéreux à produire pour certaines glycoprotéines et nécessiter le recours à des adjuvants pour améliorer les réponses immunitaires.

L'un des principaux avantages des vaccins sous-unitaires réside dans le fait qu'ils sont généralement compatibles avec les stratégies DIVA à partir du moment où l'antigène ne sert pas de marqueur. Dans le cas de l'herpèsvirus bovin, la glycoprotéine gD a été utilisée avec succès dans des formulations de vaccins sous-unitaires. Toutefois, même si l'immunisation par gD a démontré qu'elle protégeait les animaux individuellement (Harland *et al.*, 1992 ; van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1994), elle n'a pas réduit la prévalence du virus sur le terrain, ce qui a limité son utilisation. Des vaccins sous-unitaires contre divers autres virus respiratoires et entériques, dont le VDVB, le VRSB, le virus PI3, le rotavirus et le coronavirus, ont été testés avec succès, même si aucun d'entre eux n'est commercialisé. Les sous-unités bactériennes ont incontestablement montré qu'elles étaient plus efficaces que leurs équivalents viraux. Cela est dû au rapport coût-efficacité de la culture aussi bien des organismes conventionnels que recombinants et à l'exigence générale d'une réponse immunitaire biaisée en faveur de la voie Th₂ dans de nombreux cas. Des vaccins recombinants sont commercialisés pour des agents pathogènes respiratoires tels que *Mannheimia haemolytica* et *Actinobacillus pleuropneumoniae*, fabriqués sur la base des leucotoxines produites par ces organismes ainsi que des protéines de liaison à la transferrine. *Actinobacillus pleuropneumoniae* est un excellent exemple de vaccin composé de sous-unités sélectionnées en fonction des réactions sérologiques croisées entre les sérotypes, offrant ainsi une protection à large spectre contre la maladie. De même, un vaccin contre la rhinite atrophique a été mis sur le marché ; il contient un dérivé non toxique de la toxine dermonécrotique de *Pasteurella multocida* que produit une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli* associée à une bactérine classique de *B. bronchiseptica*.

Les vaccins contre la PPC montrent bien la nécessité de choisir la technique de recombinaison en fonction d'un objectif précis. Les vaccins vivants atténués conventionnels contre la PPC permettent à l'immunité de s'installer rapidement et sont efficaces pour prévenir la transmission de l'infection (Van Oirschot, 2003) ; ils présentent néanmoins l'inconvénient de ne pas permettre de différencier les porcs infectés de ceux qui ont été vaccinés. Avec les vaccins sous-unitaires commerciaux E₂, l'installation de l'immunité est plus lente et ils ne font que réduire l'excrétion virale sans l'empêcher. Cependant, ils permettent de suivre une stratégie DIVA, ce qui facilite la « vaccination de survie ». Leur utilisation pourrait ainsi présenter un intérêt particulier chez les porcs reproducteurs de grande valeur, où le vaccin pourrait servir à limiter les conséquences cliniques de la maladie tout en permettant d'identifier et d'éliminer les porcs infectés individuellement.

F. PARTICULES PSEUDO-VIRALES

Les particules pseudo-virales (VLP) sont des structures supramoléculaires composées d'une ou de plusieurs protéines recombinantes. Ces particules se forment en s'auto-assemblant et leur taille va généralement de 20 à 100 nm. En fonction de leur origine, elles peuvent être de structure icosaédrique ou en forme de baguette (point examiné dans Jennings et Bachmann, 2008). Les VLP présentent l'avantage de formuler l'antigène vaccinal sous forme de structure particulière, ce qui accroît l'immunogénicité du vaccin. Les VLP s'utilisent soit comme vaccin soit comme porteur d'antigènes génétiquement fusionnés (chimériques), incorporés ou liés par covalence. Les VLP ont été étudiées de manière approfondie ces 20 dernières années ; des vaccins humains contre le virus de l'hépatite B (Zuckerman, 2006) et le papillomavirus humain (Stanley, 2008) sont commercialisés et plusieurs

vaccins destinés à un usage vétérinaire sont en cours de développement, notamment contre la fièvre catarrhale ovine, le rotavirus et le parvovirus.

Utilisés comme vaccins, les VLP présentent plusieurs avantages, dont leur très bon profil d'innocuité, leur ressemblance avec les structures virales et bactériennes, leur aptitude à être produits à grande échelle et la possibilité de les associer à des adjuvants. En règle générale, l'immunisation par VLP induit des réponses humorales fortes et rapides. Tout comme pour les virus et les bactéries, de multiples copies des antigènes vaccinaux apparaissent sous forme de structure quasi-cristalline, hautement répétitive et ordonnée, (Bachmann et Zinkernagel, 1996), en mesure de former une liaison réticulée avec le récepteur des lymphocytes B, aboutissant à l'activation du lymphocyte B et à l'induction consécutive de réponses T indépendantes de type IgM (Thyagarajan et al., 2003). De plus, cela permet une interaction avec le système du complément, ce qui augmente la phagocytose. La structure particulaire des VLP augmente également leur capture par les cellules dendritiques ainsi que la présentation croisée subséquente de l'antigène. Lenz et al. (2001) ont démontré que la présentation croisée des antigènes particuliers était plus efficace que les présentations d'antigènes solubles. Dans l'ensemble toutefois, l'induction des réponses des lymphocytes T n'est pas encore aussi efficace que celles induites par les vaccins vivants. Pour surmonter ce problème, des VLP ont été associées avec succès à des adjuvants moléculaires comme les CpG-ODN et l'ARN simple brin. D'autres VLP ont prouvé qu'elles stimulaient directement les cellules dendritiques (CD). Par exemple, la VLP de la protéine L1 du papillomavirus a montré qu'elle activait directement les CD.

Les VLP peuvent s'utiliser soit comme vaccin soit comme porteur d'antigènes recombinants, incorporés directement, génétiquement fusionnés ou liés par covalence. Par exemple, la protéine virale 6 (VP6) du rotavirus bovin forme des VLP hautement immunogènes qui suffisent déjà à protéger contre l'infection (Redmond et al., 1993). Toutefois, en utilisant les protéines VP4 et VP7, d'autres antigènes peuvent se lier par covalence aux particules VP6 et servir à l'immunisation (Redmond et al., 1993). Parmi les autres exemples notables, citons les VLP de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg-VLP), du virus de l'immunodéficience humaine de type 1, du virus de la dengue, du norovirus et de l'influenza A. Parmi les VLP jouant le rôle de transporteurs, il y a celles bien caractérisées de l'antigène capsidique de l'hépatite B (VLP de HBcAg ; [Blanchet & Sureau, 2006 ; Pumpens et Grens, 2001]), de la protéine M2 de l'influenza de type A (M2-HBcAg [Jegerlehner et al., 2002]) ou des épitopes B et T du paludisme (Nardin et al., 2004). Même s'ils sont le plus souvent administrés par voie générale, certains vaccins à base de VLP ont déjà été testés pour une administration par voie muqueuse.

G. VACCINS A ADN

L'immunisation par ADN représente une stratégie de vaccination relativement nouvelle, qui repose sur une conception simple. Les vaccins à ADN se définissent comme des plasmides bactériens codant pour des antigènes, qui sont capables d'induire des réponses immunitaires spécifiques lorsqu'ils sont inoculés chez un hôte adéquat. L'immunisation s'effectue par absorption du plasmide purifié par les cellules hôtes, où il perdure extrachromosomiquement dans le noyau. L'expression protéique subséquente aboutit à la présentation au système immunitaire de formes de la protéine produites normalement ou modifiées. Chez l'hôte, les formes natives des protéines ont accès aux voies de présentation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I en plus de la présentation par le CMH de classe II, ce qui donne une réponse immunitaire équilibrée. Le recours à un ADN plasmidique pur offre de nombreux avantages par rapport aux autres vecteurs vaccinaux, l'un des principaux résidant dans la capacité que possèdent les vaccins à ADN d'induire à la fois des réponses humorales et par médiation cellulaire, ce qui est essentiel pour la protection contre de nombreuses maladies. Il est également prouvé que les vaccins à ADN peuvent induire une immunité à long terme, ce qui est une autre exigence en matière d'efficacité. Le vecteur lui-même n'induisant pas de réponses immunitaires, les vaccins à ADN peuvent être administrés de manière répétée sans interférence des anticorps. D'un point de vue technique, ces vaccins sont faciles à concevoir, à produire et à purifier, permettant l'élaboration et l'évaluation de nouveaux vaccins à ADN chez des modèles animaux en l'espace de quelques mois. Ces vaccins sont très stables ; partant, ils ont une longue durée de conservation et peuvent être transportés sans chaîne du froid. L'innocuité des vaccins à ADN a été établie par plusieurs essais chez différentes espèces incluant l'homme (Bagarazzi et al., 1998 ; Kim et al., 2001).

Dès que le concept d'immunisation par ADN a commencé à être exploré, cette technologie a été jugée très efficace chez les rongeurs, sans donner initialement d'aussi bons résultats chez des espèces de plus grande taille. Cependant, les progrès récents ont permis de développer des vaccins à ADN pour un certain nombre d'espèces cibles (Carvalho et al., 2009 ; Redding et Weiner, 2009). À l'heure actuelle, quatre vaccins à ADN ont été autorisés pour un usage vétérinaire, contre l'hormone de libération de l'hormone de croissance chez les suidés en Australie,

le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse chez les saumons au Canada, le VNO chez les chevaux et le mélanome chez les chiens aux États-Unis (Kutzler et Weiner, 2008). Pour parvenir à une meilleure efficacité chez les espèces animales de grande taille, une optimisation à différents niveaux s'est avérée nécessaire, incluant les éléments suivants : (i) modifications du vecteur ; (ii) ingénierie des protéines pour modifier la localisation sous-cellulaire ; (iii) améliorations des modes et voies d'administration de l'ADN ; (iv) inclusion d'adjuvants sous forme de gène ou d'agent co-administré ; et (v) ciblage des antigènes vers les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Il est probable que l'efficacité souvent insatisfaisante des vaccins à ADN chez les grands animaux soit due à une transfection inefficace ainsi qu'à la « banalité immunologique » des plasmides administrés. L'emploi d'un dispositif vaccinal sans aiguille s'est montré apte à réduire la dose efficace d'un vaccin à ADN polyvalent expérimental contre l'influenza aviaire ainsi qu'à dispenser rapidement des injections répétées chez les volailles (Rao et al., 2009).

H. LARGAGE D'ANTIGENES ET ADJUVANTS MOLECULAIRES

Les adjuvants sont des substances qui améliorent les réponses immunitaires lorsqu'ils sont administrés conjointement avec des antigènes. Il s'agit d'un composant essentiel des vaccins inactivés (recombinants et sous-unitaires), qui sont souvent faiblement immunogènes. Les adjuvants peuvent être classés en deux grandes catégories sur la base de leur mécanisme d'action présumé : i) systèmes de largage et ii) adjuvants immunostimulants. Les systèmes de largage comprennent un grand nombre d'adjuvants conventionnels et d'adjuvants particuliers, qui sont examinés séparément ci-dessous.

Malgré l'importance des adjuvants dans les vaccins, leurs mécanismes d'action restent mal compris. Les progrès récents concernant la compréhension de l'immunité innée ont fourni des indications importantes sur les mécanismes d'action moléculaires des adjuvants immunostimulants. À cet égard, les cellules immunitaires expriment divers récepteurs, appelés collectivement récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptors*, PRR), qui détectent largement les composants microbiens conservés, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Un certain nombre de PRR ont été décrits, notamment les récepteurs de type Toll (TLR) ; par exemple, le TLR9 reconnaît les motifs d'acides nucléiques bactériens CpG, agoniste naturel de TLR7/8 : l'ARN viral simple brin (oligoribonucléotides) active fortement les réponses immunitaires innées chez les souris, chez l'homme et s'avère particulièrement puissant chez les grands animaux ; un agoniste du TLR4 comme le lipopolysaccharide (LPS) est connu pour ses propriétés immunostimulantes et adjuvantes puissantes, mais cette molécule est malheureusement très toxique. Il faut y ajouter les récepteurs de type NOD (domaine d'oligomérisation des nucléotides), les récepteurs de type RIG (gène inductible par l'acide rétinoïque) ainsi que les récepteurs des lectines de type C. Tous détectent les composants microbiens. La mobilisation de ces récepteurs par leurs agonistes entraîne une cascade d'événements moléculaires et cellulaires qui activent l'immunité innée, cette dernière dirigeant l'immunité acquise spécifique de l'antigène. Parmi ces récepteurs, les agonistes des TLR sont les plus explorés et sont très prometteurs comme adjuvants. Il est intéressant de noter que le vaccin vivant atténué 17D contre la fièvre jaune, l'un des meilleurs vaccins disponibles, active les TLR2, 7, 8 et 9 (Querec et al., 2006), laissant penser que le succès d'au moins une partie de ces vaccins vivants pourrait venir de leur aptitude à activer les TLR. Cela suscite un grand intérêt pour l'utilisation des agonistes des TLR comme adjuvants.

Le paradigme existant dans l'industrie des vaccins à usage vétérinaire, à savoir « un adjuvant-un vaccin », est en partie dû aux coûts engendrés par l'ajout de plus d'un adjuvant par vaccin ; toutefois, il peut gravement limiter l'efficacité de candidats vaccins potentiellement sûrs et cela explique peut-être, au moins partiellement, pourquoi certains vaccins ou adjuvants n'ont atteint qu'une efficacité sous-optimale. Des preuves s'accumulent lentement pour indiquer que plusieurs adjuvants pourraient apporter davantage qu'un seul. Par exemple, même si les CpG-ODN constituent un bon adjuvant, ils peuvent avoir une activité adjuvante encore meilleure s'ils sont formulés ou administrés conjointement avec d'autres composés, comme des particules, des sels minéraux, des saponines, des liposomes, des peptides cationiques, des polysaccharides ou des toxines bactériennes ainsi que des polymères synthétiques tels les polyphosphazènes (Wack et al., 2008).

L'effet adjuvant des microparticules est connu depuis un certain temps et a déjà été étudié (Mutwiri et al., 2005). Les systèmes de largage particulière sont pensés pour promouvoir la capture et la rétention des antigènes dans les ganglions lymphatiques locaux. De plus, les microparticules permettent la présentation des antigènes par les CPA à la fois par l'intermédiaire du CMH de classe I et du CMH de classe II, limitant ainsi les voies d'apprêtement et de présentation. L'un des principaux avantages des microparticules pour la délivrance ciblée d'antigènes réside dans leur capacité à jouer le rôle de plateforme de délivrance flexible, utilisable à la fois pour délivrer des antigènes et des molécules immunostimulantes.

Parmi les autres systèmes potentiels de largage d'antigènes se trouvent les polyphosphazènes, une classe de polymères synthétiques possédant un squelette qui présente une alternance d'atomes de phosphore et d'azote ainsi que des groupes organiques latéraux liés à chaque phosphore (Mutwiri *et al.*, 2007). Le complexe immunostimulant (ISCOM) est une nanoparticule de 40 nm composée de saponine (adjuvant), de lipides et d'antigènes, décrite comme un système de largage d'antigènes non seulement en raison de son activité adjuvante, mais aussi de sa capacité à cibler les CPA (Morein *et al.*, 2004). Un vaccin commercial basé sur l'ISCOM contre la grippe équine est homologué depuis des années (Heldens *et al.*, 2009).

I. ADMINISTRATION DES VACCINS

Il existe un large éventail d'approches en matière d'administration des vaccins, l'objectif d'ensemble étant de permettre la vaccination de masse en cas de foyers de maladies et la vaccination de la faune sauvage. Les vaccins oraux utilisés pour vacciner chez la faune sauvage, tels les renards, contre la rage étaient initialement basés sur des virus vaccinaux atténués de la maladie faisant appel, par exemple, à la souche ERA, mais des inquiétudes quant à la possibilité que ces vaccins puissent occasionnellement provoquer la rage (Fehlner-Gardiner *et al.*, 2008) ont entraîné leur remplacement dans une large mesure (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/rabies_pres_19.pdf). Au Canada, un vaccin antirabique vivant, vectorisé en utilisant un adénovirus et présentant un bon profil d'innocuité (Knowles *et al.*, 2009), est actuellement employé dans les campagnes de vaccination antirabique visant à lutter contre la rage chez les mouffettes et les rats laveurs (Rosatte *et al.*, 2009). Le vaccin vivant oral vaccine-rage exprimant la glycoprotéine rabique est largement utilisé ailleurs et des tentatives d'optimisation des appâts sont faites afin de le rendre efficace pour d'autres espèces, dont les chiens (Cliquet *et al.*, 2008). L'infection rabique chez les chiens errants et dans la faune sauvage représente un problème grave pour l'homme dans le monde entier ; c'est pourquoi la recherche de vaccins antirabiques vivants oraux plus sûrs, plus stables et plus efficaces se poursuit (Faber *et al.*, 2009). D'autres possibilités ont été activement étudiées pour la vaccination de masse au moyen de vaccins faits à partir de plantes comestibles, mais malgré les progrès des biotechnologies en ce qui concerne l'expression végétale des antigènes vaccinaux, aucun produit commercial destiné à un usage oral n'a été identifié à ce jour (Rice *et al.*, 2005).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACRES S.D., ISAACSON R.E., BABIUK L.A. & KAPITANY R.A. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.*, **25**, 121–126.
- BABU U., DALLOUL R.A., OKAMURA M., LILLEHOJ H.S., XIE H., RAYBOURNE R.B., GAINES D. & HECKERT R. (2004). *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet. Immunol. & Immunopathol.*, **101**, 251–257.
- BACHMANN M.F. & ZINKERNAGEL R.M. (1996). The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today*, **17**, 553–558.
- BAGARAZZI M.L., BOYER J.D., UGEN K.E., JAVADIAN M.A., CHATTERGOON M., SHAH A., BENNETT M., CICCARELLI R., CARRANO R., CONEY L. & WEINER D.B. (1998). Safety and immunogenicity of HIV-1 DNA constructs in chimpanzees. *Vaccine*, **16**, 1836–1841.
- BLANCHET M. & SUREAU C. (2006). Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J. Virol.*, **80**, 11935–11945.
- BOYCE M., CELMA C.C. & ROY. P. (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J. Virol.*, **82**, 8339–8348.
- CARVALHO J.A., PRAZERES D.M. & MONTEIRO GA. (2009). Bringing DNA vaccines closer to commercial use. *IDrugs*, **12**, 642–647.
- CHICHESTER J.A. & YUSIBOV V. (2007). Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum. Vaccin.*, **3**, 146–148.

CLIQUET F., BARRAT J., GUIOT A.L., CAËL N., BOUTRAND S., MAKI J. & SCHUMACHER C.L. (2008). Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine*, **26**, 4627–4638.

COHEN J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science*, **259**, 1745–1749.

DE LIMA M., KWON B., ANSARI I.H., PATNAIK A.K., FLORES E.F. & OSORIO F.A. (2008). Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine*, **26**, 3594–3600.

FABER M., DIETZSCHOLD B. & LI J. (2009). Immunogenicity and safety of recombinant rabies viruses used for oral vaccination of stray dogs and wildlife. *Zoonoses Public Health*, **56**, 262–269.

FACHINGER V., BISCHOFF R., JEDIDIA S.B., SAALMÜLLER A. & ELBERS K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, **26**, 1488–1499.

FEHLNER-GARDINER C., NADIN-DAVIS S., ARMSTRONG J., MULDOON F., BACHMANN P. & WANDELER A. (2008). ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.*, **44**, 71–85.

FENAUX M., OPRIESSNIG T., HALBUR P.G., ELVINGER F. & MENG X.J. (2004). A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.*, **78**, 6297–6303.

FERRARI M., BRACK A., ROMANELLI M.G., METTENLEITER T.C., CORRADI A., DAL MAS N., LOSIO M.N., SILINI R., PINONI C. & PRATELLI A. (2000). A study of the ability of a TK-negative and gE/gI negative pseudorabies virus (PRV) mutant inoculated by different routes to protect pigs against PRV infection. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **47**, 753–762.

GERDTS V., MUTWIRI G.K., TIKOO S.K. & BABIUK L.A. (2006). Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Vet. Res.*, **37**, 487–510.

HARLAND R.J., POTTER A.A., VAN DRUNEN-LITTEL-VAN DEN HURK S., VAN DONKERSGOED J., PARKER M.D., ZAMB T.J. & JANZEN E.D. (1992). The effect of subunit or modified live bovine herpesvirus-1 vaccines on the efficacy of a recombinant *Pasteurella haemolytica* vaccine for the prevention of respiratory disease in feedlot calves. *Can. Vet. J.*, **33**, 734–741.

HELDENS J.G., POWELS H.G., DERKS C.G., VAN DE ZANDE S.M. & HOEIJMAKERS M.J. (2009). The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine*, **27**, 5530–5537.

JAKOBS A.A., GOOVAERTS D., NUIJTEN P.J., THEELAN R.P., HARTFORD O.M. & FOSTER T.J. (2000). Investigation towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.*, **147**, 563–567

JEGERLEHNER A., TISSOT A., LECHNER F., SEBBEL P., ERDMANN I., KÜNDIG T., BÄCHI T., STORNI T., JENNINGS G., PUMPENS P., RENNEN W.A. & BACHMANN M.F. (2002). A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*, **20**, 3104–3112.

JENNINGS G.T. & BACHMANN M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.*, **389**, 521–536.

KIM J.J., YANG J.S., NOTTINGHAM L.K., TANG W., DANG K., MANSON K.H., WYAND M.S., WILSON D.M. & WEINER D.B. (2001). Induction of immune responses and safety profiles in rhesus macaques immunized with a DNA vaccine expressing human prostate specific antigen. *Oncogene*, **20**, 4497–4506.

KNOWLES M.K., NADIN-DAVIS S.A., SHEEN M., ROSATTE R., MUELLER R. & BERESFORD A. (2009). Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG13-ONRAB) in target and non-target species. *Vaccine*, **27**, 6619–6626.

KUTZLER M.A. & WEINER D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 776–788.

- KUZYK M.A., BURIAN J., MACHANDER D., DOLHAINÉ D., CAMERON S., THORNTON J.C. & KAY W.W. (2001). An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine*, **19**, 2337–2344.
- LENZ P., DAY P.M., PANG Y.Y., FRYE S.A., JENSEN P.N., LOWY D.R. & SCHILLER J.T. (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 5346–5355.
- MACLACHLAN N.J., BALASURIYA U.B., DAVIS N.L., COLLIER M., JOHNSTON R.E., FERRARO G.L. & GUTHRIE A.J. (2007). Experiences with new generation vaccines against equine viral arteritis, West Nile disease and African horse sickness. *Vaccine*, **25**, 5577–5582.
- MEEUSEN E.N., WALKER J., PETERS A., PASTORET P.P. & JUNGENSEN G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 489–510.
- MOREIN B., HU K.F. & ABUSUGRA I. (2004). Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1367–1382.
- MUTWIRI G., BENJAMIN P., SOITA H., TOWNSEND H., YOST R., ROBERTS B., ANDRIANOV A.K. & BABIUK L.A. (2007). Poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine*, **25**, 1204–1213.
- MUTWIRI G., BOWERSOCK T.L. & BABIUK L.A. (2005). Microparticles for oral delivery of vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2**, 791–806.
- NARDIN E.H., OLIVEIRA G.A., CALVO-CALLE J.M., WETZEL K., MAIER C., BIRKETT A.J., SARPOTDAR P., CORADO M.L., THORNTON G.B. & SCHMIDT A. (2004). Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite epitopes. *Infect. Immun.*, **72**, 6519–6527.
- PASTORET P.P., BROCHIER B., LANGUET B., THOMAS I., PAQUOT A., BAUDUIN B., KIENY M.P., LECOQ J.P., DE BRUYN J., COSTY F., ET AL. (1988): First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec.*, **123**, 481–483.
- PUMPENS P. & GRENS E. (2001). HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, **44**, 98–114.
- QUEREC T., BENNOUNA S., ALKAN S., LAOUAR Y., GORDEN K., FLAVELL R., AKIRA S., AHMED R. & PULENDRAN B. (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.*, **203**, 413–424.
- RAO S.S., STYLES D., KONG W., ANDREWS C., GORRES J.P. & NABEL G.J. (2009). A gene-based avian influenza vaccine in poultry. *Poult. Sci.*, **88**, 860–866.
- REDDING L. & WEINER D.B. (2009). DNA vaccines in veterinary use. *Exp. Rev. Vaccines*, **8**, 1251–1276.
- REDMOND M.J., IJAZ M.K., PARKER M.D., SABARA M.I., DENT D., GIBBONS E. & BABIUK L.A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine*, **11**, 273–281.
- REIMANN I., DEPNER K., TRAPP S. & BEER M. (2004). An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, **322**, 143–157.
- RHODES G.H., ABAI A.M., MARGALITH M., KUWAHARA-RUNDELL A., MORROW J., PARKER S.E. & DWARKI V.J. (1994). Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 229–236.
- RICE J., AINLEY W.M. & SHEWEN P. (2005). Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Animal Health Res. Rev.*, **6**, 199–209.
- RODRIGUEZ L.L. & GRUBMAN M.J. (2009). Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, **27**, Suppl 4: D90-4.
- ROSATTE R.C., DONOVAN D., DAVIES J.C., ALLAN M., BACHMANN P., STEVENSON B., SOBEY K., BROWN L., SILVER A., BENNETT K., BUCHANAN T., BRUCE L., GIBSON M., BERESFORD A., BEATH A., FEHLNER-GARDINER C. & LAWSON K. (2009). Aerial

distribution of ONRAB baits as a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. *J. Wildl. Dis.*, **45**, 363–374.

ROY P. & NOAD R. (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum. Vaccin.*, **4**, 5–12.

SOLA I., ALONSO S., ZÚÑIGA S., BALASCH M., PLANA-DURÁN J. & ENJUANES L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.*, **77**, 4357–4369.

STANLEY M. (2008). HPV vaccines: are they the answer? *Br. Med. Bull.*, **88**, 59–74.

SWAYNE D.E. (2009). Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **32**, 351–363.

TANIGUCHI T. (1978). Site-directed mutagenesis on bacteriophage Qbeta RNA (author's transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **23**, 159–169.

THYAGARAJAN R., ARUNKUMAR N. & SONG W. (2003). Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J. Immunol.*, **170**, 6099–6106.

ULMER J.B., DONNELLY J.J., DECK R.R., DEWITT C.M. & LIU M.A. (1995). Immunization against viral proteins with naked DNA. *Ann. NY Acad. Sci.*, **772**, 117–125.

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., ET AL. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259**, 1691–1692.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DONKERSGOED J., KOWALSKI J., VAN DEN HURK J.V., HARLAND R., BABIUK L.A. & ZAMB T.J. (1994). A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine*, **12**, 1295–1302.

VAN GENNIP H.G., VAN RIJN P.A., WIDJOATMODJO M.N., DE SMIT A.J. & MOORMANN R.J. (2000). Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*, **19**, 447–459.

VAN OIRSCHOT J.T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.*, **96**, 367–384.

VAN OIRSCHOT J., KAASHOEK T.M.J. & RIJSEWIJK F.A. (1996). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, **53**, 43–54.

WACK A., BAUDNER B.C., HILBERT A.K., MANINI I., NUTI S., TAVARINI S., SCHEFFCZIK H., UGOZZOLI M., SINGH M., KAZZAZ J., MONTOMOLI E., DEL GIUDICE G., RAPPUOLI R. & O'HAGAN D.T. (2008). Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*, **26**, 552–561.

WACKER M., LINTON D., HITCHEN P.G., NITA-LAZAR M., HASLAM S.M., NORTH S.J., PANICO M., MORRIS H.R., DELL A., WREN B.W. & AEBI M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793.

WIDMAN D.G., FROLOV I. & MASON P.W. (2008). Third-generation flavivirus vaccines based on single-cycle, encapsidation-defective viruses. *Adv. Virus Res.*, **72**, 77–126.

ZUCKERMAN J.N. (2006). Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **19**, 456–459.

*
* *

N. B. : ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 2010.