

## Vers une vaccination contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*

Le paludisme est actuellement dans le monde une cause majeure de morbidité et de mortalité ; un tiers environ de la population mondiale y est exposé, et on lui attribue entre deux et trois millions de morts annuelles. L'Afrique reste le continent le plus exposé, avec un million au moins de morts d'enfants chaque année, dues en majorité au *Plasmodium falciparum*. Après des années d'optimisme, on connaît les limites d'un abord pharmacologique : la résistance du parasite à la chloroquine, et aux autres antipaludéens, diffuse rapidement. Les essais d'impact sur le moustique vecteur, avec des moustiquaires imprégnées de pesticide, s'ils entraînent une diminution temporaire du nombre de cas, pourraient aussi devenir responsables d'une recrudescence de la mortalité à long terme [1]. C'est dire l'importance que pourrait avoir une vaccination efficace. En faveur de sa possibilité, on relève deux types d'arguments : l'acquisition d'une immunité naturelle chez des sujets exposés, des stratégies expérimentales efficaces chez l'animal. Les difficultés sont, cependant, énormes. L'immunité est spécifique pour chaque espèce de *Plasmodium*, et plusieurs sont pathogènes, mais aussi probablement pour chaque souche à l'intérieur d'une espèce. Le *Plasmodium*, extrêmement polymorphe, a une propension très remarquable à l'évasion immunitaire par modification de ses structures antigéniques. Les techniques classiques de vaccination utilisant des organismes atténués étant pratiquement inapplicables, les efforts de ces dernières années se sont orientés vers l'utilisation d'antigènes spécifiques et leur mode de présentation. Cette recherche a été particulièrement développée à Oxford (GB) impliquant les départements de médecine moléculaire et de pédiatrie, en relation avec le *Wellcome Trust*, et des centres de Gambie et du Kenya. Un premier travail rappelle les étapes du cycle de vie du parasite, et les antigènes qui pourraient être utili-

sés pour un vaccin (*figure 1*) [2]. Celui-ci peut être pré-érythrocytaire, et donc interférer avec l'infection avant même sa première manifestation clinique. La cible serait alors les antigènes des sporozoïtes, peu nombreux dans l'organisme (une piqûre de moustique en introduit une vingtaine), ou/et les antigènes des formes intra-hépatocytaires. Libérés dans le sang, les mérozoïtes pénètrent le globe rouge et expriment des antigènes à sa surface ; le principal d'entre eux, la protéine PfEMP-1, produit des gènes *var*, et se caractérise par sa variabilité. L'étape sexuée de la vie du parasite, enfin, a lieu dans l'intestin du moustique. Une immunisation possible par les antigènes du gamétoocyte induirait des anticorps migrant vers l'intestin du vecteur et interférant avec la fécondation du parasite. L'intérêt de cette dernière stratégie serait d'agir au niveau de la communauté et non plus de l'individu.

Dans l'état actuel, les recherches les plus avancées sont en majorité ciblées sur la première étape pré-érythrocytaire. Une perspective intéressante a été présentée par le groupe d'AVS Hill, d'Oxford, pour la construction d'un vaccin synthétique contenant un nombre important d'épitopes antigéniques [3]. Pour en saisir l'intérêt, il faut revenir sur des travaux antérieurs. Une protéine de surface du sporozoïte, CP ou CSP (*circumsporozoïte protein*) a fait l'objet de recherches depuis des années. Les premiers vaccins, qui se sont avérés inefficaces, ont démontré l'insuffisance des anticorps pour créer une immunité, et la nécessité d'une immunité cellulaire, faisant intervenir les lymphocytes cytotoxiques (CTL). Dès 1991, par ailleurs, le groupe d'AVS Hill avait constaté, en Gambie, l'implication de types HLA particuliers dans la protection contre les formes graves du paludisme (*m/s n° 9, vol. 7, p. 981*). Les auteurs en avaient établi la base moléculaire l'année suivante en identifiant, présenté par le HLA-B53,

un peptide nonamère de la protéine LSA-1 (*liver-stage-specific antigen-1*), qui devenait ainsi une cible de lyse pour les CTL CD8<sup>+</sup> [4]. Les auteurs en déduisaient l'importance d'identifier les différents épitopes reconnus par les CTL et un épitope cible pour chaque type HLA pour les incorporer dans un vaccin, qualifiant cette approche d'immunogénétique inverse [5]. Cette recherche, menée chez des adultes bien portants et semi-immunisés, et chez des enfants malades ou convalescents, avait montré un certain degré de conservation, mais aussi l'existence de plusieurs antigènes pré-érythrocytaires dont il convenait d'incorporer les épitopes dans le profil d'un vaccin rationnellement conçu. Les épitopes présentés par les molécules HLA de classe I de 70 % environ des sujets, caucasiens et gambiens, avaient ainsi été identifiés. Chez ces sujets vivant en région endémique, le taux de CTL était, cependant, très variable, souvent faible, démontrant l'intérêt de stimuler leur immunité.

Le dernier travail [3] est donc la réalisation de ce programme et la construction rationnelle d'un vaccin synthétique. La protéine recombinante utilisée est la protéine p1 du rétrotransposon Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae*, à l'extrémité carboxy-terminale de laquelle ont été fusionnés les produits des séquences codant pour une série d'épitopes aptes à induire la réaction CTL. La particule ainsi obtenue, Ty-VLP (*Ty virus-like particle*) provoque, de fait, chez la souris, une induction de CTL. Le choix des épitopes, protecteurs contre l'étape précoce, hépatique, de la vie du parasite, était particulièrement important. Le polymorphisme antigénique du parasite, mais aussi la variabilité des HLA, et donc de la présentation aux cellules CTL de différents épitopes, imposaient, pour stimuler la réaction cellulaire, la présence simultanée des épitopes de plusieurs antigènes différents. Des épitopes ont été identifiés dans les régions conservées des antigènes du *P. falciparum*. Apprêtés

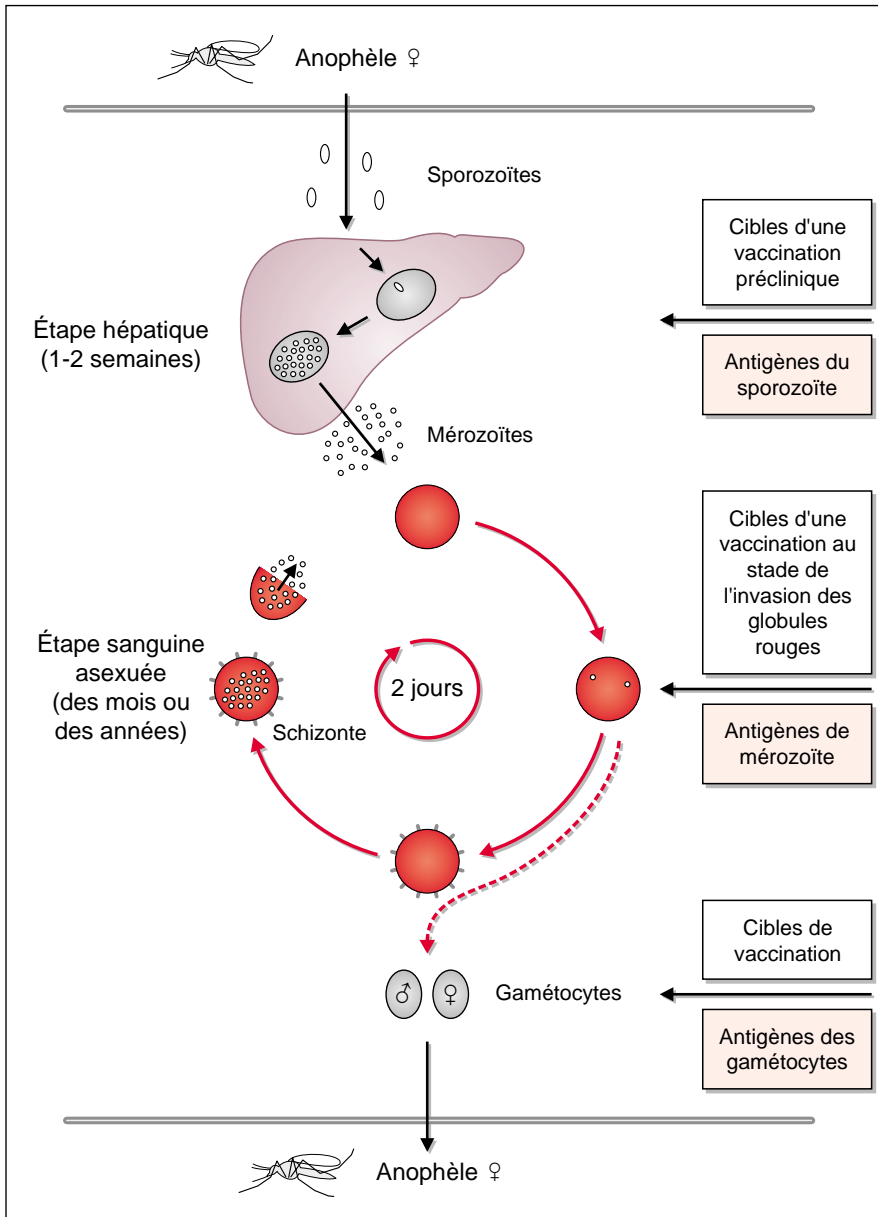


Figure 1. **Les étapes de la vie du *P. falciparum* chez l'homme. Antigènes qui pourraient être la cible de vaccinations.**

ensemble, ils permettraient au système immunitaire de se défendre contre presque toutes les souches, et pas seulement celle qui a été utilisée. En pratique, des particules recombinantes Ty-VLP ont été construites, comportant des séries d'épitopes en chapelet, dont l'ordre était déterminé par l'existence de sites de restriction: quatorze épitopes CTL du *P. falciparum*, correspondant à huit types HLA différents devraient empêcher un phénomène d'évasion

immunitaire chez le vacciné. L'épitope étant dans un environnement de séquence différent de son état naturel, on a pu en contrôler la présentation en adjoignant un épitope murin du *P. berghei*, et en vérifiant la réponse CTL chez la souris. La présentation satisfaisante d'épitopes se chevauchant a également été vérifiée sur les cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur exposé et de donneurs « naïfs ». Pour augmenter l'immunogénicité, des

épitopes auxiliaires ont été adjoints, choisis parce qu'ils se lient à différentes molécules de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce sont des épitopes BCG (bacille Calmette-Guérin) et TT (toxine tétanique) pour lesquels on peut supposer l'immunisation d'une partie importante de la population, et un épitope CSP, reconnu par les cellules CD4<sup>+</sup> chez les sujets qui ont été exposés au paludisme. L'ajout d'un motif de liaison à l'héparine est destiné à cibler les particules vaccinales vers le foie en mimant ainsi le trajet naturel de l'infection.

Cet ensemble de 229 acides aminés a été testé chez la souris grâce à l'épitope murin inclus, et son action protectrice vérifiée. On a pu constater que la machine protéolytique de la cellule était apte à apprêter des épitopes reliés entre eux sans séquences intermédiaires, et que ce vaccin, élaboré à partir d'un micro-organisme sans danger, provoquait chez la souris, sans adjuvant, une réponse forte des CTL qui pouvait être réactivée. Il s'agirait peut-être de la préparation vaccinale la plus prometteuse, tant pour les voyageurs que pour les habitants des zones d'endémie palustre.

A côté de cet abord le plus avancé, d'autres approches sont à signaler. Le même groupe d'Oxford en a évoqué une, fondée non plus sur les antigènes du parasite, mais sur les phénomènes toxiques dont il est responsable [2, 6]. Le rôle des cytokines, et en particulier du TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) est important dans la pathogénie du paludisme cérébral (*m/s n° 10, vol. 3, p. 619*). Là aussi, l'association entre un polymorphisme du promoteur et une protection a été constatée. Un mécanisme immunitaire inhiberait peut-être les toxines parasitaires inductrices de TNF. Mais le(s) antigène(s) en est(sont) encore mal identifié(s).

Ce groupe n'est, cependant, pas le seul à rechercher une stratégie vaccinale à l'encontre du *P. falciparum*. Deux travaux récents effectués par le *Walter Reed Army Institute of Research* (Washington, DC, USA), avec diverses collaborations, sont fondés aussi sur la nécessité d'une immunité cellulaire s'ajoutant à la production d'anticorps. Le premier essai est

celui d'un vaccin recombinant, obtenu par fusion de deux épitopes de la protéine de surface du sporozoïte (CSP) à l'antigène de surface de l'hépatite B, HBsAg, très immunogène [7]. Injecté avec des adjuvants puissants chez 46 sujets n'ayant jamais été exposés au paludisme, ce vaccin pré-érythrocytaire s'est avéré immunogène par production d'anticorps IgG et stimulation des CTL dans la majorité des cas par comparaison à une série témoin, mais la variabilité interindividuelle est encore considérable.

Le deuxième essai est différent, puisqu'il a utilisé la potentialité d'une vaccination par l'ADN [8]. Il s'agit d'une immunisation somatique par transgène. L'inoculation faite à la souris est celle d'un ADN de plasmide codant pour une chaîne lourde Ig, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de tissu lymphoïde, plus un élément *enhancer*, et naturellement un antigène spécifique du *P. falciparum*, le térapeptide NANP répété de la protéine CSP du sporozoïte. Ce transgène est transcrit et traduit dans les lymphocytes B de la rate de l'hôte, ce dont témoigne sa mise en évidence par PCR et la sécrétion de chaînes lourdes. La création d'une immunité et d'une réponse

mémorisée vis-à-vis du peptide a été vérifiée. En liant ainsi un antigène à un anticorps, il y a antigénisation de l'anticorps et présentation de l'épitope en conformation tridimensionnelle qui serait proche de la conformation native, les déterminants antigéniques du parasite étant constitutivement exprimés comme partie des Ig endogènes. Dans ce premier essai, la transition de sécrétion des IgM vers les IgG semble encore insuffisante. Les auteurs envisagent d'accroître l'efficacité du vaccin en ajoutant au gène chimère d'autres épitopes, spécifiques des cellules B ou des cellules T, ou spécifiques des cytokines. Si cet abord nécessite encore un approfondissement de la recherche, il paraît, lui aussi, particulièrement prometteur.

L'ensemble de ces travaux semble donc ouvrir des perspectives à la vaccination contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*. Les obstacles étaient, et sont encore énormes. La gravité de la situation impose, cependant, le développement de plusieurs stratégies vaccinales. Nous n'avons rapporté ici que les résultats des travaux les plus avancés. Tous les jours sont publiés de nouveaux articles. Nombreuses sont les autres stratégies, ce qui pourrait signifier

qu'aucune d'entre elles n'a encore emporté la conviction !

D.L.

1. Robert V, Trape J. Lutter contre le paludisme en réduisant sa transmission ? Présentation de la controverse. *Med Sci* 1997; 13: 678-82.
2. Kwiatkowski D, Marsh K. Development of a malaria vaccine. *Lancet* 1997; 350: 1696-701.
3. Gilbert SC, Plebanski M, Harris SJ, Allsopp CEM, Thomas R, Layton GT, Hill AVS. A proteinparticle vaccine containing multiple malaria epitopes. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 1280-4.
4. Hill AVS, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CEM, Gotch FM, Gao M, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend ARM, McMichael AJ, Whittle HC. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992; 360: 434-9.
5. Aidoo M, Lalvani A, Allsopp CEM, Plebanski M, Meisner SJ, Krausa P, Browning M, Morris-Jones S, Gotch F, Fidock DA, Takiguchi M, Robson KJH, Greenwood BM, Druilhe P, Whittle HC, Hill AVS. Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. *Lancet* 1995; 345: 1003-7.
6. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-11.
7. Stoute JA, Slaoui M, Heppner G, Momin P, Kester KE, Desmons P, Welde BT, Garçon N, Krzych U, Marchand M, Ballou R, Cohen JD. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1997; 336: 86-91.
8. Gerloni M, Ballou WR, Billelta R, Zanetti M. Immunity to *Plasmodium falciparum* malaria sporozoites by somatic transgene immunization. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 876-81.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Vaccination ADN: une nouvelle voie d'immunisation.** Une nouvelle voie d'immunisation est aujourd'hui possible pour la vaccination par injection d'ADN [1]. Classiquement, l'ADN codant pour l'antigène d'intérêt vaccinal est administré, sous forme d'un plasmide recombinant, par voie sous-cutanée ou intramusculaire (*m/s n° 1, vol. 11, p. 127*). Récemment, on avait rapporté le transfert, dans le noyau de la cellule hôte, d'ADN inséré dans un plasmide et la synthèse de l'antigène codé par l'ADN ainsi cloné, dans des cellules infectées par des bactéries entériques invasives dont la virulence était atténuée [2, 3]. Il restait à montrer que ce système de vectorisation d'ADN était fonctionnel *in vivo* et qu'il permettait l'induction d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire, lors

de l'administration des bactéries entériques vectrices par leur voie naturelle d'infection, à savoir la voie orale. C'est chose faite! Darji *et al.* (Braunschweig, Allemagne) [1] viennent de montrer que l'administration, par voie orale, d'une souche vivante de virulence atténuée de *Salmonella typhimurium* portant un plasmide recombinant qui permet l'expression d'antigènes de *Listeria*, permet non seulement le transfert efficace de l'ADN dans les cellules hôtes, mais conduit aussi à l'induction d'une réponse cellulaire (auxiliaire et cytotoxique) et humorale (systémique) chez les souris ainsi vaccinées. Cette réponse, essentiellement de type Th1, permet d'induire la protection par au moins l'un des antigènes utilisés. Bien que les mécanismes mis en jeu restent encore hypothétiques, ce système

semble donc idéal non seulement comme nouvelle voie d'immunisation pour délivrer l'ADN codant pour un antigène d'intérêt vaccinal, mais aussi pour identifier les antigènes jouant un rôle dans la protection contre une infection donnée, tout comme pour induire des anticorps contre le produit de n'importe quelle phase de lecture ouverte présente sur un fragment d'ADN. Compte tenu des résultats décevants obtenus jusqu'à présent lors d'essais de vaccination par l'ADN chez l'homme, espérons que cette nouvelle voie sera plus prometteuse !

- [1. Darji A, *et al. Cell* 1997; 91: 765-75.]
- [2. Courvalin P, *et al. CR Acad Sci Paris* 1995; 318: 1207-12.]
- [3. Sizemore DR, *et al. Science* 1995; 270: 299-302.]