
10

Perspectives vaccinales avec de nouveaux vaccins

Depuis 2001, chaque réunion du G7/G8 a reconnu la tuberculose, le sida et le paludisme comme les trois maladies prioritaires dans la lutte contre la pauvreté. Plusieurs agences internationales ont apporté un soutien financier important pour la recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose. Le congrès de Montréal en septembre 2003, *TB Vaccines for the world*, a permis de faire le point sur l'avancement de ces recherches. Pour la première fois, de nouveaux candidats vaccins ont été décrits comme plus efficaces que le BCG dans des essais pré-cliniques. L'un d'entre eux est déjà en essai clinique de phase I en Europe. Il induit des réponses immunitaires de type Th1 d'un niveau élevé. Grâce à une mobilisation importante de nombreuses équipes, la recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose s'est donc considérablement accélérée au cours des dix dernières années. Un historique des démarches et des découvertes est dressé ci-après.

Vaccination BCG : toujours d'actualité

L'effet protecteur du BCG avait été mis en évidence dans plusieurs modèles animaux par Calmette et Guérin. La vaccination humaine a montré qu'il protège le jeune enfant contre les formes graves de tuberculose, en particulier les formes disséminées et les méningites (Calmette, 1936). C'est cependant plus tard que les réponses immunitaires induites par le BCG ont été étudiées avec des modèles animaux comme la souris, le cobaye et le macaque. En parallèle, le rôle de différents types de réponses immunitaires a été étudié chez la souris et chez l'homme. Il s'est avéré que la réponse humorale à elle seule ne protège pas contre la tuberculose. En revanche, les réponses cellulaires jouent un rôle majeur. La réponse cellulaire de type Th1 restreinte par le CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) est essentielle dans la protection (Orme et Collins, 1984 ; Casanova et Abel, 2002). Les réponses cytotoxiques restreintes par le CMH I jouent aussi un rôle important (Flynn et coll., 1992 ; Cho et coll., 2000). Les autres réponses, appelées jusqu'à présent réponses non conventionnelles, comme les réponses des cellules T gamma delta et les réponses restreintes par les molécules CD1

induites et/ou dirigées contre des composants mycobactériens, existent après infection ou vaccination par le BCG. Leurs rôles dans la protection contre la tuberculose est en cours d'étude (Beckman et coll., 1994 ; Constant et coll., 1994 ; Gilleron et coll., 2004).

Premières recherches de nouveaux vaccins

L'utilisation de la biologie moléculaire pour la recherche d'antigènes vaccinaux a commencé avec la construction de banques d'ADN de *M. leprae* et de *M. tuberculosis* dans *E. coli* (Young et coll., 1985) et la recherche d'antigènes considérés comme dominants parce que reconnus par des sérums d'animaux infectés ou vaccinés. Ce sont les antigènes de la famille des protéines de choc thermique (*heat shock proteins*) qui ont été identifiés. Dans la mesure où il s'agit de protéines conservées chez l'ensemble des organismes vivants, leur utilisation est controversée. Cependant, l'étude de ce type d'antigènes continue. La vaccination ADN avec un vecteur exprimant le gène codant pour la protéine de *heat shock* HSP60 de *M. leprae* a montré une protection chez la souris (Tascon et coll., 1996), en particulier dans un modèle de vaccination thérapeutique (Lowrie et coll., 1999). Ces résultats ont ensuite été à l'origine de problèmes. En effet, la vaccination ADN avec le gène codant pour la protéine de *heat shock* de *M. tuberculosis* aggrave la maladie chez les souris infectées. Des essais cliniques utilisant de telles séquences d'ADN sont cependant envisagés au Brésil.

Nouveaux vaccins sous-unitaires

La deuxième vague de recherches s'est intéressée aux protéines sécrétées par *M. tuberculosis*. D'une part, l'équipe de l'Institut Pasteur de Bruxelles a identifié un groupe de protéines en quantité majoritaire dans les filtrats de cultures (le groupe des antigènes 85) ; d'autre part, l'équipe du *Statens Serum Institut* (Copenhague) a montré que les filtrats de cultures conféraient une protection contre la tuberculose dans un modèle murin (Andersen, 1994). Ensuite, cette équipe a identifié plusieurs antigènes particulièrement bien reconnus au niveau cellulaire par des patients tuberculeux ou des individus contacts non malades. Parmi ces antigènes figurent le complexe 85 précédemment identifié comme groupe d'antigènes intéressants ainsi qu'un groupe de petites protéines comme l'antigène ESAT-6 (Brandt et coll., 2002).

La recherche d'antigènes induisant une réponse cellulaire de type Th1 a aussi été entreprise par des équipes comme celle des laboratoires Corixa, soutenue par GlaxoSmithKline (GSK) (Skeiky et coll., 2000). Le criblage d'antigènes reconnus par des patients tuberculeux ou des sujets contacts a conduit à l'identification de plusieurs antigènes. C'est une fusion de deux d'entre eux,

Rv1196 et Rv0125, qui a fait l'objet d'études plus approfondies. Avec un adjuvant de GSK, cette fusion confère une protection dans des modèles animaux. Un essai clinique de phase I est envisagé aux États-Unis avec le soutien de la fondation Aeres et de la *Bill and Melinda Gates Foundation*.

Une prédiction d'épitopes reconnus par une majorité d'individus a été entreprise par l'équipe de Anne DeGroot (Sbai et coll., 2001). À partir de la séquence du VIH, il a été possible de prédire des épitopes reconnus par le CMH I. Cette approche est en cours d'étude pour *M. tuberculosis*.

Protocoles de vaccination avec les nouveaux antigènes

Les antigènes identifiés sont testés dans des modèles animaux avec plusieurs approches vaccinales (tableau 10.I).

Tableau 10.I : Vaccins sous-unitaires en cours d'étude et leur effet protecteur chez la souris et le cobaye

Vaccins sous unités	Souris	Cobaye
Ag 85A ou Ag 85B (ADN ou protéine)	++	+
ESAT-6 (protéine)	++	nd
Apa (ADN)	++	nd
PstS3 38 Kd (ADN)	++	nd
72f (protéine)	++	nd
85B-ESAT-6 (protéine)	++	+
PstS3-85A (ADN)	++	nd
HBHA (protéine)	+	nd

nd : non déterminé

Les antigènes du groupe 85 sont des mycolyltransférases impliquées dans la synthèse des acides mycoliques, des lipides de la surface des mycobactéries. Ce sont les antigènes 85A ou 85B qui ont été utilisés comme antigènes vaccinant. Ils possèdent beaucoup de similarités.

L'antigène 85A utilisé sous forme de vaccination ADN a montré un effet protecteur chez la souris C57/B6 lorsqu'il est administré de façon intramusculaire (Huygen et coll., 1996). Cette protection n'a pas été observée chez la souris BALB/C ou après immunisation sous-cutanée par « *gene gun* » (Tanghe et coll., 2000). Une amélioration de la protection conférée après vaccination ADN avec l'antigène 85A a été observée après modification des protocoles de vaccination comme l'usage d'un adjuvant, la vaxfectine, ou l'addition de vecteurs ADN codant pour l'IL-12 (D'Souza et coll., 2002).

Cependant, comme pour beaucoup d'autres pathologies, la vaccination ADN s'avère décevante dès que l'on étudie des modèles animaux plus proches de l'homme comme les primates non humains (Donnelly et coll., 2003). De plus, des problèmes éthiques quant à son utilisation ne sont pas résolus. Plusieurs antigènes ont cependant été testés sous forme de vaccination ADN chez la souris ou le cobaye. Certains d'entre eux seulement confèrent une protection dans un modèle murin ou chez le cobaye. Des protocoles mixtes de vaccination ont été testés. Une vaccination ADN suivie d'une vaccination BCG augmente la protection par rapport à une simple vaccination BCG. Une vaccination ADN administrée après une vaccination BCG n'augmente pas l'efficacité. De plus, une vaccination ADN exacerbe la maladie chez des animaux infectés par *M. tuberculosis* (Taylor et coll., 2003).

La protéine ESAT-6 puis l'antigène 85B se sont avérés protecteurs dans le modèle murin lorsqu'ils sont administrés en présence d'adjuvants DDA (*dioctadecylammonium bromide*) et MPL (*monophosphoryl lipid A*). Une fusion des deux antigènes s'est avérée protectrice dans le modèle murin. De plus, une protection est observée dans des conditions où le BCG n'est pas protecteur. Il s'agit de souris sensibilisées par des mycobactéries de l'environnement (Brandt et coll., 2002). La fusion 85B-ESAT-6 fait l'objet d'études approfondies pour améliorer sa formulation dans le but d'obtenir des réponses protectrices plus efficace que le BCG chez le cobaye et le macaque.

Une autre fusion de deux antigènes est en cours d'étude par Corixa et GSK. Des études sur un petit nombre de macaques ont montré des réponses intéressantes. Cette fusion fera prochainement l'objet d'essais cliniques de phase I aux États-Unis.

L'antigène 85B a été cloné dans un vecteur pox, le MVA (*modified vaccinia virus Ankara*), pour donner un vecteur recombinant MVA (85B). De même, un virus pox aviaire a été utilisé, ce qui a donné le FP (85B). Des essais de vaccination avec ces vecteurs viraux ont montré qu'ils étaient capables d'induire des réponses cellulaires chez la souris (Goonetilleke et coll., 2003). Un protocole de vaccination comprenant une première immunisation par le BCG suivie de rappels par MVA (85B) puis FP (85B) a permis d'obtenir une protection meilleure que le BCG dans le modèle cobaye. C'est ce protocole de vaccination qui est en cours d'essai clinique de phase I à Oxford et en Gambie. L'antigène 85B, bien qu'il soit déjà présent dans le BCG, a été cloné dans le BCG sous forme de deuxième copie dans le but d'obtenir un BCG produisant davantage d'antigène 85. Une protection meilleure que le BCG a été observée dans certaines conditions expérimentales (tableau 10.II) (Horwitz et coll., 2000). Un essai de vaccination avec ce BCG recombinant, BCG (85B), est en cours aux États-Unis sous l'égide de la fondation Aeres.

Tableau 10.II : BCG recombinants en cours d'étude et leur effet protecteur chez la souris et le cobaye

rBCG	Souris	Cobaye
BCG	++	+++
BCG ureC, (hly)	+++	+++
BCG (RD1)	+++	+++ (+)
BCG (85B)	+++	nd
BCG (IFN- γ , IL-12)	nd	nd

nd : non déterminé

Vaccins vivants

Les études de protection par le BCG dans des modèles animaux (tableau 10.III) avaient montré que le BCG n'était protecteur que sous forme de bactérie vivante. Le BCG tué (chaleur, radiations...) n'induisait pas de protection. La découverte d'un effet protecteur de filtrats suggérait le rôle important de protéines sécrétées probablement absentes des préparations de BCG tués. Cependant, l'étude des réponses immunitaires induites par différents antigènes a montré une grande variation de réponses d'un individu à l'autre. C'est pourquoi l'approche consistant à immuniser avec un grand nombre d'antigènes à l'aide de vaccins vivants, soit de vaccins recombinants soit de nouveaux pathogènes atténués, a continué de susciter de l'intérêt. Les premières souches auxotrophes de *M. tuberculosis* se sont avérées à la fois très atténuées et moins protectrices que le BCG chez le cobaye (Jackson et coll., 1999). Des doubles mutants auxotrophes de *M. tuberculosis* récemment découverts s'avèrent à la fois très atténués et protecteurs dans les modèles murins et chez le cobaye (Hondalus et coll., 2000). Ces souches atténuées ne sont pas plus virulentes que le BCG dans le modèle de souris SCID (*sever combined immunodeficiency*) utilisé comme modèle d'immunodépression. Il

Tableau 10.III : Vaccins vivants en cours d'étude et leur efficacité protectrice chez la souris et le cobaye

Souche de <i>M. tuberculosis</i> atténué	Protection dans la souris	Protection dans le cobaye
pur C	nd	+
pro C	+	nd
trp D	++	-
leuD/panCD	++	++
phoP/phoR	++	+++
drrC	+++	nd
BCG	++	++

nd : non déterminé

s'agit de doubles mutants de *M. tuberculosis* isolés par l'équipe de W. Jacobs. Ils possèdent une inactivation pour les gènes *leuD* et *panCD*, et sont donc affectés dans la voie de biosynthèse de la leucine et de l'acide pantothénique. De même, des souches inactivées pour le système à deux composants *phoP/phoR*, connu pour réguler positivement des gènes de virulence chez d'autres bactéries, sont atténuées (Perez et coll., 2001) et confèrent une protection dans les deux modèles murin et cobaye. Chez le cobaye, une telle souche atténuée est plus protectrice que le BCG.

Des BCG recombinants exprimant la listériolysine de *L. monocytogenes* et inactivés pour le locus *ureC* se sont avérés plus protecteurs que le BCG dans un modèle murin (Hess et coll., 1998). Des souches recombinantes de BCG exprimant des cytokines spécifiques de la réponse Th1 ont été construites. Aucune efficacité supérieure au BCG n'a été décrite avec de telles souches.

La comparaison des génomes du BCG avec ceux de *M. bovis* et *M. tuberculosis* a fait apparaître chez toutes les souches de BCG ainsi que chez *M. microti*, une espèce non pathogène chez l'homme, une délétion de matériel génétique couvrant la région codant ESAT-6. Les expériences consistant à inactiver cette région chez *M. tuberculosis* conduisent à l'obtention d'une souche atténuée de façon similaire au BCG (Hsu et coll., 2003). Des souches de BCG chez lesquelles cette région est réintroduite sont plus virulentes dans le modèle murin SCID (Pym et coll., 2002). Ces souches ont une efficacité vaccinale supérieure au BCG dans un modèle murin non immunodéprimé (Pym et coll., 2003).

En conclusion, la vaccination classique avec le BCG pourra être maintenue pour éviter les cas graves de tuberculose de l'enfant comme les méningites. Les nouveaux vaccins interviendront en supplément du BCG pour augmenter l'efficacité vaccinale et il serait possible de concevoir des protocoles de stimulation par des protéines recombinantes avec un adjuvant adéquat ou par des virus recombinants comme la vaccine. Pour les populations qui ne sont pas vaccinées par le BCG, une vaccination directe avec des virus recombinants ou des protéines recombinantes pourrait être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSEN P. Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994, **62** : 2536-2544

BECKMAN EM, PORCELLI SA, MORITA CT, BEHAR SM, FURLONG ST, BRENNER MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta + T cells. *Nature* 1994, **372** : 691-694

BRANDT L, FEINO CUNHA J, WEINREICH OLSEN A, CHILIMA B, HIRSCH P et coll. Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine : some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002, **70** : 672-678

CALMETTE A. L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Masson et Cie, Paris 1936 : 1-1005

CASANOVA JL, ABEL L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria : the human model. *Annu Rev Immunol* 2002, **20** : 581-620

CHO S, MEHRA V, THOMA-USZYNSKI S, STENGER S, SERBINA N et coll. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8 + T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97** : 12210-12215

CONSTANT P, DAVODEAU F, PEYRAT MA, POQUET Y, PUZO G. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994, **264** : 267-270

DONNELLY J, BERRY K, ULMER JB. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol* 2003, **33** : 457-467

D'SOUZA S, ROSSEELS V, DENIS O, TANGHE A, DE SMET N et coll. Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect Immun* 2002, **70** : 3681-3638

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, KOLLER B, BLOOM BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89** : 12013-12017

GILLERON M, STENGER S, MAZORRA Z, WITTKE F, MARIOTTI S et coll. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 2004, **199** : 649-659

GOONETILLEKE NP, MCSHANE H, HANNAN CM, ANDERSON RJ, BROOKES RH, HILL AV. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol* 2003, **171** : 1602-1609

HESS J, MIKO D, CATIC A, LEHMENSIEK V, RUSSELL DG, KAUFMANN SH. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95** : 5299-5304

HONDALUS MK, BARDAROV S, RUSSELL R, CHAN J, JACOBS WR Jr, BLOOM BR. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2000, **68** : 2888-2898

HORWITZ MA, HARTH G, DILLON BJ, MASLESA-GALIC S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97** : 13853-13858

HSU T, HINGLEY-WILSON SM, CHEN B, CHEN M, DAI AZ. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100** : 12420-12425

HUYGEN K, CONTENT J, DENIS O, MONTGOMERY DL, YAWMAN AM et coll. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996, **2** : 893-898

JACKSON M, PHALEN SW, LAGRANDERIE M, ENSERGUEIX D, CHAVAROT P et coll. Persistence and protective efficacy of a Mycobacterium tuberculosis auxotroph vaccine. *Infect Immun* 1999, **67** : 2867-2873

LOWRIE DB, TASCAN RE, BONATO VL, LIMA VM, FACCIOLI LH et coll. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999, **400** : 269-271

ORME IM, COLLINS FM. Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immunol* 1984, **84** : 113-120

PEREZ E, SAMPER S, BORDAS Y, GUILHOT C, GICQUEL B, MARTIN C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Mol Microbiol* 2001, **41** : 179-187

PYM AS, BRODIN P, BROSCHE R, HUERRE M, COLE ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. *Mol Microbiol* 2002, **46** : 709-717

PYM AS, BRODIN P, MAJLESSI L, BROSCHE R, DEMANGEL et coll. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003, **9** : 533-539

SBAI H, MEHTA A, DEGROOT AS. Use of T cell epitopes for vaccine development. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001, **1** : 303-313

SKEIKY YA, OVENDALE PJ, JEN S, ALDERSON MR, DILLON DC et coll. T cell expression cloning of a Mycobacterium tuberculosis gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. *J Immunol* 2000, **165** : 7140-7149

TANGHE A, DENIS O, LAMBRECHT B, MOTTE V, VAN DEN BERG T, HUYGEN K. Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. *Infect Immun* 2000, **68** : 3854-3860

TASCAN RE, COLSTON MJ, RAGNO S, STAVROPOULOS E, GREGORY D, LOWRIE DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med* 1996, **2** : 888-292

TAYLOR JL, TURNER OC, BASARABA RJ, BELISLE JT, HUYGEN K, ORME IM. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun* 2003, **71** : 2192-2198

YOUNG RA, BLOOM BR, GROSSKINSKY CM, IVANYI J, THOMAS D, DAVIS RW. Dissection of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82** : 2583-2587