

210001584

1784

1

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES  
AGRICOLES (I.S.R.A.)

-----  
ISRA-UNITE DE PRODUCTION DE VACCINS  
m-w---

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE  
ET DES RECHERCHES VETERINAIRES  
BP 2057 - DAKAR-HANN

## TECHNOLOGIES DES VACCINS EN SANTE ANIMALE

Par Dr. Mamady KONTE  
Chef de l'Unité de Production de Vaccins

COMMUNICATION AU SEMINAIRE NATIONAL  
SUR LES BIOTECHNOLOGIES  
04-06 octobre, Saly Portudal

Réf. ISRA/UPV/LNERV  
Octobre 1999

Ref. 012/Patho. Ani.

# SEMINAIRE NATIONAL SUR LES BIOTECHNOLOGIES

(Saly Portudal, du 4 au 6 octobre 1999)

\*\*\*\*\*

## TECHNOLOGIES DES VACCINS EN SANTE ANIMALE

Par Dr. Mamady KONTE  
ISRA/UPV - LNERV  
BP 2057 - DAKAR-HANN  
Tél. : 832 27 62 - Fax : 832 21 18  
E.mail : [konte@elsmail.com](mailto:konte@elsmail.com)

\*\*\*\*\*

### RESUME

Une bonne vaccination à effet durable nécessite la sélection de souches vaccinales adaptées, la mise au point de vaccins efficaces et leur **amélioration** constante.

La technologie de fabrication des vaccins dits classiques utilise encore l'agent infectieux total, soit vivant et atténué dans **son** pouvoir pathogène (vaccins vivants, lyophilisés) soit **inactivé** (vaccins tués, adjuvés), ou son produit d'excrétion traité à la chaleur et au formol (anatoxines).

Avec l'avènement du génie génétique, les vaccins sont de plus en plus du type recombinant, faisant appel à l'ADN et à son expression ; ainsi sont mis au point des vaccins recombinants (VR) sub-unitaires, des VR -ADN, des VR vivants, sur la base d'un choix judicieux des déterminants antigéniques d'intérêt, des vecteurs et de l'hôte.

### MOTS CLES

Vaccin vivant - vaccin **inactivé** - vaccination - souche vaccinale - génie génétique - vaccin recombinant - ADN - déterminant antigénique - vecteur - hôte d'expression.

## TECHNOLOGIES DES VACCINS EN SANTE ANIMALE

\*\*\*\*\*

### INTRODUCTION

Les premières structures de gestion de l'élevage mises en place au Sénégal au début des années 1930 ont eu pour mission essentielle la production de vaccins contre la peste et la péripneumonie contagieuse qui décimaient alors le cheptel bovin. La gamme produite s'est depuis élargie à d'autres types de vaccins pour en compter, aujourd'hui, 25 au total.

Autant que la gamme, la technologie de fabrication de ces vaccins dits classiques a elle aussi connu une évolution et une amélioration constantes.

'Une nouvelle génération de vaccins dits recombinants voient le jour à la faveur du développement des techniques de biologie moléculaire et de génie génétique.

## I -TECHNOLOGIES DE FABRICATION DES VACCINS CLASSIQUES

### **1.1. Rappel historique**

La mise au point des vaccins est partie de conception purement empirique avant de reposer sur un processus scientifique rigoureux.

Les exemples qui ont été à l'origine du développement scientifique des technologies de fabrication sont les vaccins contre la peste bovine (.PB) et la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB).

## EVOLUTION TECHNOLOGIQUE DES VACCINS VETERINAIRES

VACCINS CONTRE LA PESTE BOVINE		VACCINS CONTRE LA PPCB	
TYPES DE VACCINS	MOTIFS D'ABANDON	TYPES DE VACCINS	MOTIFS D'ABANDON
<p>1. <u>Pestisation</u> : inoculation de bile fraîche d'animaux morts, sang de malades</p> <p>2. <u>Brovat d'organes</u> : amygdales, ganglions, rate, poumon de veau inoculé expérimentalement, inactivés au formol, au toluène ou acide phénique</p> <p>3. <u>Vaccins atténués sur animaux, liquides</u> :</p> <p>a- <u>V. caprinisé</u> : 1930 : souche Kabete 0 fixée après 600 passages sur caprins. Immunité solide et durable</p> <p>b- <u>V. lapinisé</u> : 1938 : souche Nakamura III fixée après 800 passages sur lapin. Immunité solide et durable</p> <p>c- <u>V. avianisé</u> : 1946 : VBP sur œuf embryonné. Bon rendement : 100 doses, par œuf, immunité solide et durable</p> <p>d- <u>V. lapinisé-avianisé</u> 1953 : bon vaccin</p> <p>4. <u>V. de culture tissulaire</u> : 1957 : 500 000 doses/2 reins de veau. Immunité précoce, solide, dure 2 ans, puis sur cellule Ver0</p>	<p>1. Dissémination du VPB</p> <p>2. Rendement faible par veau ; immunité courte</p> <p>3. a- Pouvoir pathogène résiduel</p> <p>3. b- Virulence résiduelle</p> <p>3. c- Virulence résiduelle</p> <p>3. d- Technologie lourde</p>	<p>1. <u>Méthode de Willems</u> : lymphé ou organe dans le tissu conjonctif dense de la queue ou chanfrein</p> <p>1. <u>V. à mvcoulasmes inactivés</u></p> <p>1. <u>V. liquide de culture en bouillon</u> : souche DK : Perized, Peritor et souche KH3J</p> <p>1. <u>V. lyophilisés</u></p> <p>1- <u>V. avianisés</u> = vaccins vivants d'ovoculture : atténuation sur œuf, broyat du jaune d'œuf + diluant de lyophilisation (=sérum de cheval. Souches T2 et T4 (Aviper du LNERV)</p> <p>2- <u>V. atténués sur œuf puis cultivés en bouillon</u> souches : KH3J/86, T1/44, T1-SR. Remplacement du sérum par le lait écrémé stérile au LNERV</p> <p>5. <u>V. Bisec</u> : V. bivalent contre PB et PPCB : souches KabeteO/T1-SR</p>	<p>1. Dangers locaux, généraux ; dissémination</p> <p>2. Le germe tué donne un mauvais vaccin</p> <p>3. <u>Acidification</u> en 3 semaines tuant les germes = perte pouvoir antigénique=absence de protection</p> <p>4. a- Production industrielle difficile, innocuité irrégulière</p>

## 1.2. Schémas généraux de fabrication des vaccins

### 1.2.1. Vaccins vivants atténués

a)- Choix de la souche vaccinale :

- Soit souche locale isolée de cadavre ou d'animaux morts, passages sur animaux différents ou sur cultures cellulaires accompagnées de tests de pathogénicité à différentes étapes jusqu'à stabilisation puis caractérisation complète.

- Soit acquisition de souches atténuées universelles à caractéristiques connues auprès de laboratoires de référence fournisseurs.

b)- Ultime passage pour préparer les banques mères et les banques de travail

c)- Préparation d'un lot de production par culture en masse sur cellules (vaccins viraux) ou en bouillon (vaccins bactériens, mycoplasmaux)

d)- Adjonction d'un support de lyophilisation (sérum ou lait écrémé)

e)- Répartition en flacons puis lyophilisation

f)- Sur souches vaccinales et en cours de production il est procédé à des contrôles d'identité et de pureté ; le contrôle interne de qualité est complet pour le produit fini (lyophilisat), intégrant le test d'efficacité.

g)- Le produit fini est soumis à un contrôle externe de qualité avant autorisation pour la vente.

**N.B.** : Le vaccin contre le charbon bactérien est un vaccin bactérien vivant en ce qu'il est constitué par une suspension de spores viables en eau glycinée éliminant les formes végétatives à bonne température. C'est un vaccin liquide non lyophilisé.

### 1.2.2. Vaccins inactivés

a)- Souches vaccinales : En général il s'agit d'une souche sauvage pleinement virulente isolées de cas pathologiques locaux.

b)- Culture en masse du germe purifié sur un milieu de culture approprié (liquide ou cellulaire).

c)- Inactivation de la culture par adjonction de formol (plus communément) en proportion adéquate

d)- Adjonction d'un adjuvant de l'immunité (salin ou huileux)

e)- Répartition en ampoules ou flacons

f)- Comme pour les vaccins vivants atténués des contrôles internes pré-, per- et post-production sont effectués avant le contrôle final externe.

### 1.2.3. Anatoxines vaccinales

- a)- Souches vaccinales : souches locales virulentes
- b)- Culture en sac de cellophane pour l'obtention d'une toxine pure par dialyse
- c)- Traitement de la toxine par action **combinée** du formol et de la chaleur donnant l'anatoxine
- d)- La DMM est déterminée et la dilution de l'anatoxine faite en conséquence avant répartition.
- e)- Les tests de pureté et d'innocuité sont essentiels, la toxine étant un bon immunogène.

## II - LES VACCINS RECOMBINANTS

### 2.1. Généralités

Les vaccins classiques pèchent souvent par leur manque de spécificité, les interférences antigéniques, d'efficacité incomplète et irrégulière et, **pour** les vaccins vivants de garder une pathogénicité résiduelle.

A ces insuffisances intrinsèques liées au vaccin lui-même s'ajoute des difficultés de conservation et de respect de la chaîne de froid en **milieu** tropical, de reconstitution (s'il y a lieu) et d'administration du vaccin à l'animal au niveau des troupeaux.

Ces défauts sont évités, pour les plus importants, avec l'avènement des vaccins dits recombinants. Ces vaccins ne font plus appel à l'agent infectieux dans sa totalité mais uniquement à son ADN et un fragment précis de l'ADN codant pour l'épitope spécifique qui donne lieu à la production de l'anticorps protecteur et seulement celui-là. Ainsi sont écartés toute pathogénicité résiduelle, toute interférence antigénique et le manque de spécificité. De plus, n'étant plus question de germe, toute thermosensibilité peut être exclue. La mise au point de vaccins polyvalents devient aisée.

La technologie générale de mise au point des vaccins recombinants fait intervenir différents éléments : la source de l'ADN codant pour un antigène ou un **épitope** d'intérêt, un véhicule pour transporter le fragment d'ADN ou vecteur pouvant servir seulement au transfert de gène mais aussi pour certains d'assurer l'expression de ce gène dans un hôte adéquat, le dernier élément, qui est soit une cellule **procaryote** soit une cellule eucaryote et dont il sera possible d'identifier le clone recombinant recherché.

### 2.2. Construction d'une souche vaccinale recombinante

#### 2.2.1. L'antigène d'intérêt et la source d'ADN spécifique

Le pouvoir antigénique du vaccin est fondamentale, celui qui suscite la synthèse d'anticorps protecteur. Les meilleurs antigènes sont de nature protéinique. Toute protéine est codée par un gène spécifique et un seul.

La première étape consiste à identifier (par **clonage/séquençage**) et à isoler ce fragment de génome, si la séquence est connue au préalable, sinon la synthétiser par voie chimique ou à partir de l'ARNm.

Exemple : la toxine botulinique induit la production d'antitoxine assurant une protection hautement spécifique de l'animal producteur. Le gène codant pour la toxine sera identifié (par voie descendante ou ascendante) et isolé grâce à des **enzymes de restriction**.

### **2.2.2. Le vecteur de transfert et/ou d'expression**

L'ADN synthétisé ou les fragments d'ADN génomique doivent être portés par un vecteur (plasmide, bactériophage, cosmide) capable de se répliquer et d'être transféré dans une cellule (l'hôte adéquat). Cette recombinaison *in vitro* demande une préparation complémentaire de l'ADN vecteur et du fragment d'ADN à insérer. La stratégie la plus simple et la plus commune est la coupure par la même enzyme de restriction des deux ADN.

### **2.2.3. Clonage de l'ADN recombiné dans une cellule en culture**

Le mélange d'ADN hybrides recombinés et d'ADN non recombinés (ADN vecteur et fragments d'ADN à insérer) peut être introduit dans une bactérie par transfert (plasmide) ou infection (bactériophage) ou dans une cellule eucaryote en culture par transfection (ADN nu) ou par infection avec un virus à ADN.

Le plasmide recombinant transféré dans une bactérie va s'autorépliquer sans affecter la croissance de la culture bactérienne. En étalant ces bactéries diluées sur de la gélose stérile, il sera possible d'isoler des colonies bactériennes correspondant chacune à une bactérie contenant un plasmide (clone bactérien). A l'inverse, le bactériophage recombinant va se reproduire en provoquant, lors d'un cycle lytique, la lyse des bactéries. Dans ces conditions l'on isolera des plages de lyse sur un tapis de bactéries correspondant à l'infection par un bactériophage recombinant.

### **2.2.4. Identification du clone cellulaire ou du virus contenant l'ADN recombinant**

Il s'agit d'identifier, d'aller « pêcher » le clone bactérien ou cellulaire, la plage de lyse contenant l'ADN recombinant recherché.

A cet effet, il est utilisé des marqueurs de sélection, associés au vecteur ou au fragment d'ADN à détecter (gènes de résistance aux antibiotiques des plasmides, gène normal pour un hôte muté pour ce marqueur). Des sondes moléculaires peuvent aussi être utilisées pour rechercher le bon clone dans une population hétérogène par hybridation *in situ*.

## **2.3.Exemples de vaccins recombinants**

### **2.3.1. Vaccins recombinants subunitaires**

Une partie isolée ou synthétisée de la protéine d'enveloppe d'un virus ou d'une protéine de surface d'une bactérie d'intérêt peuvent être utilisées comme une voie alternative à la place de ces microorganismes. Les clones recombinants de bactéries (ou de levures) produisent ces protéines en grandes quantités en culture et qui sont ensuite purifiées et utilisées comme vaccin.

### **2.3.2. Vaccins vivants recombinants**

Il s'agit de vaccins constitués d'un vecteur vivant, viral ou bactérien, dépourvu de virulence pour l'espèce à vacciner, que l'on a rendu capable par génie génétique d'exprimer un ou plusieurs antigènes hétérologues susceptibles d'induire une immunité protectrice contre le pathogène dont ils proviennent.

## **2.4. Exemples de vaccins recombinants en santé animale**

### **2.4.1. Vaccins recombinants réalisés**

- Vaccin vivant recombinant à partir d'une souche recombinante de *Bacillus anthracis* produisant un épitope immogène de *Clostridium perfringens* (USA, 1997).
- Vaccin vivant recombinant thermostable contre la peste bovine utilisant une souche recombinante du virus de la vaccine (cow-pox) exprimant la protéine d'enveloppe immunogène du virus de la peste bovine (ILMB, UC Davis, CA, USA, 1997).

### **2.4.2. Vaccins recombinants en projet au Sénégal**

- Vaccin vivant recombinant contre, à la fois, le charbon bactérien et le charbon symptomatique utilisant une souche avirulente recombinante de *Bacillus anthracis* (vecteur d'expression) exprimant l'épitope immunogène de *Clostridium chauvei*.
- Vaccin vivant recombinant contre le botulisme dû aux sérotypes C et D de *Clostridium botulinum* par utilisation d'un Baculovirus (virus d'insecte, non pathogène pour l'animal et excellent vecteur d'expression multiple) recombinant, exprimant les épitopes immunogènes toxiques des deux sérotypes d'intérêt.

## **CONCLUSION**

Le Sénégal grâce le LNERV est un pionnier et une référence en matière de technologies des vaccins vétérinaires classiques en Afrique.

Les avancées scientifiques et technologiques que connaît le monde orientent vers de nouveaux produits qui, assurément seront les seuls de demain puisque déjà préférés aujourd'hui. Le Sénégal ne peut être en marge de cette dynamique et c'est à bon escient que le projet de mise au point de ce nouveau type de vaccin figure en bonne place dans le plan stratégique de l'ISRA.