

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français :

Développement de l'adénovirus humain de type 5 recombinant comme vecteur vaccinal contre la rhinotrachéite infectieuse bovine

Titre de la thèse en anglais :

Development of human recombinant adenovirus type 5 as a vaccine vector against infectious bovine rhinotracheitis

Candidat : Sacha Gogev

Promoteur : Prof. E. Thiry

Co-promoteur : -

Département et Service : département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, secteur de Virologie

Date de la défense publique : le 8 avril 2003

Composition du Jury : E. Thiry, C. Dessy-Doizé, J. Mainil, F. Rollin, B. Losson, L. Grobet, B. Mignon, A. Vanderplasschen, M.-F. Versali, H. Nauwynck

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), une maladie du bétail bien connue induite par l'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), est maintenant éradiquée dans plusieurs pays européens. Dans d'autres états européens, particulièrement ceux à prévalence élevée de l'infection, des programmes de contrôle ont été lancés en utilisant des vaccins marqués délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine gE. Un vaccin idéal contre le BoHV-1 devrait protéger le bétail contre les signes cliniques associés au BoHV-1 et conférer une protection virologique (empêcher l'excrétion virale après infection primaire et l'installation du virus en état latent ou, au moins, prévenir le risque de réexcrétion virale après réactivation du virus latent). A ce jour, les vaccins marqués, qu'ils soient atténués ou inactivés, ne confèrent pas une protection virologique au bovin, mais le protègent contre les signes cliniques de l'infection. Par conséquent, ils doivent être non seulement améliorés, mais également compatibles avec un programme d'éradication.

L'objectif principal dans le cadre de cette thèse est de rechercher et de développer une nouvelle stratégie de vaccination contre l'IBR par l'utilisation de vecteurs viraux non-répliquatifs exprimant les immunogènes majeurs du BoHV-1. Il faut préciser que l'utilisation de tels vecteurs rend toujours possible la présence d'un marqueur sérologique chez les animaux vaccinés.

L'approche envisagée ici consiste en l'utilisation chez le bovin d'un nouveau vaccin recombinant de nouvelle génération basé sur l'HAdV-5 non-répliquatif délété en E1 et E3 exprimant la glycoprotéine gC ou gD du BoHV-1 (HAdV-5gC ou HAdV-5gD), lequel sera associé ultérieurement à des formulations solubles de chitosane afin d'étudier leur effet « adjuvant ». Ce vaccin sera administré par voie intranasale, car les voies respiratoires sont la porte d'entrée du virus sauvage.

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont:

1. Elaborer une analyse objective de la faisabilité de l'utilisation de l'adénovirus humain de type 5 comme vecteur vaccinal dans l'espèce bovine;
2. Etudier la capacité de l'adénovirus humain de type 5 non répliquatif d'infecter et d'exprimer les immunogènes majeurs du BoHV-1 dans les cellules bovines *in vitro*, ainsi que dans la muqueuse des voies respiratoires antérieures bovines *in vivo*. Cela permettra d'évaluer, par conséquent, la capacité de l'adénovirus à être utilisé comme vecteur vaccinal chez le bovin;
3. Déterminer l'aptitude de l'adénovirus humain de type 5 non répliquatif exprimant la glycoprotéine gC ou gD du BoHV-1 à induire une réponse immune et de protéger les bovins contre l'épreuve virulente avec le BoHV-1 sauvage;

4. Evaluer la capacité de deux formulations solubles à base de chitosane, utilisées comme adjuvants intranasaux, à améliorer le potentiel vaccinal du vecteur recombinant HAdV-5 dans l'espèce bovine.

RÉSULTATS

Dans la première étude, nous avons déterminé que la séroprévalence apparente (95 % d'intervalle de confiance) de sérums bovins possédant des anticorps neutralisant l'HAdV-5 dans la Région Wallonne de Belgique était de $5\% \pm 2\%$ ($p \pm 1.96 [p(1-p)/n]^{1/2}$). Bien que la présence de bovins possédant des anticorps neutralisant l'HAdV-5 ait été détectée, les résultats montrent que la séroprévalence est faible et que la majorité de la population bovine n'est pas immunisée contre l'HAdV-5. La vaccination du bétail avec l'HAdV-5 recombinant ne sera pas, en conséquence, compromise par les anticorps préexistants neutralisant l'HAdV-5. Ces résultats ont démontré la faisabilité de l'utilisation de ce virus comme vecteur vaccinal dans l'espèce bovine.

Dans la deuxième étude, l'efficacité du transfert du gène gD du BoHV-1 par l'intermédiaire de l'HAdV-5 recombinant non répliatif *in vitro* dans des cultures de cellules bovine, et *in vivo* dans la muqueuse des voies respiratoires antérieures bovines, a été étudiée. Un transfert efficace et une expression durable du gène gD dans chaque lignée cellulaire bovine, ont été observés, alors que le transfert de ce gène via l'HAdV-5 dans les voies respiratoires antérieures bovines, après l'instillation intranasale, a montré une efficacité limitée et une expression de courte durée dans les cellules épithéliales bien différenciées des voies respiratoires. Par conséquent, ce vecteur peut ne pas être approprié pour la thérapie génique dans l'espèce bovine où une expression durable de transgène est souhaitée. En revanche, il est mieux approprié pour l'utilisation en vaccination, auquel cas une expression transitoire de transgène est requise. En

fait, lors de la vaccination, l'expression de protéines immunogènes codées par le transgène sur les surfaces cellulaires a pour but d'induire une réponse immune et, par conséquent, les cellules infectées sont éliminées par la suite.

Dans la troisième étude, la capacité de l'HAdV-5 recombinant non répliatif exprimant la glycoprotéine gC ou gD du BoHV-1 à induire une réponse immune et de protéger les bovins contre les signes cliniques de l'infection, ainsi que de conférer une protection virologique, a également été étudiée après administration par voie intranasale au bovin. Cependant, l'excrétion du virus d'épreuve n'a pas été prévenue, mais a été significativement réduite, tandis que la durée d'excrétion du virus a été raccourcie. En outre, les taux moyens les plus élevés d'anticorps neutralisant le BoHV-1 ont été détectés chez les veaux immunisés par l'HAdV-5 exprimant la glycoprotéine gD du BoHV-1. Eu égard aux résultats obtenus, l'HAdV-5 recombinant peut être développé comme vecteur vaccinal intranasal chez le bovin, et peut être administré seul ou séquentiellement avec des vecteurs à base d'adénovirus animaux.

Dans la dernière étude, nous avons évalué la capacité de deux formulations solubles, à savoir, le chitosane et le glycol-chitosane, utilisés comme adjuvants intranasaux, à améliorer l'immunogénicité de l'HAdV-5-gD recombinant non répliatif. La meilleure protection virologique a été obtenue chez les veaux immunisés avec l'HAdV-5-gD adjuvé au glycol-chitosane diminuant les titres d'excrétion de virus d'épreuve de 0,5 à 1,5 log par rapport à ceux obtenus avec l'HAdV-5gD administré seul. De surcroît, la durée d'excrétion virale a été également la plus courte chez les veaux immunisés avec l'HAdV-5-gD adjuvé au glycol-chitosane. Les données obtenues suggèrent que les adjuvants intranasaux à base de chitosanes pourraient présenter une nouvelle génération d'adjuvants associés aux vaccins viraux conventionnels ou recombinants contre les maladies respiratoires du bétail.



IBR - la forme respiratoire de l'infection du bétail par le BoHV-1

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Un vaccin vectorisé contre l'IBR a été développé à partir de l'HAdV-5 déficient pour la répliation exprimant la glycoprotéine gD du BoHV-1. Le potentiel vaccinal de ce vecteur destiné à une administration intranasale aux bovins a été démontré au cours des expériences menées dans le cadre de cette thèse. Il s'ensuit que:

L'HAdV-5 non répliatif peut s'inscrire comme un nouveau vecteur vaccinal recombinant hétérologue dans l'espèce bovine, car il est en mesure de développer une réponse immune et de protéger les veaux contre les signes cliniques après une épreuve virulente. Ce vaccin vectorisé confère une protection clinique, et une réduction d'excrétion virale de même nature que celles obtenues avec le vaccin vivant atténué de référence;

L'efficacité de ce vecteur vaccinal a été améliorée en lui associant un adjuvant intranasal à base de chitosane.

A la suite de cette étude, d'autres recherches sont envisageables, afin de répondre aux questions associées à l'utilisation

de l'HAAdV-5 seul ou avec l'adjuvant à base de chitosane pour une vaccination intranasale chez le bovin.

L'une des raisons du manque d'efficacité du transfert du gène du vecteur HAAdV-5gD dans les cellules bien différenciées de l'épithélium respiratoire, est sa faible capacité à y pénétrer. Afin de contourner cet obstacle, des recherches pourront viser à améliorer l'efficacité d'infection, en modifiant la surface de l'HAAdV-5 pour qu'il reconnaisse les cellules de l'épithélium de la muqueuse respiratoire bovine. Pour ce faire, deux approches complémentaires sont proposées, soit l'obtention d'un nouveau tropisme, soit le changement du tropisme naturel. Le nouveau tropisme pourrait être obtenu par modification génétique du gène de la fibre de l'HAAdV-5 avec l'addition d'une séquence codant un ligand spécifique (Gonzalez *et al.*, 1999; Mizuguchi *et al.*, 2001). Par exemple, l'addition à l'extrémité C-terminale de la fibre de l'HAAdV-5 de polypeptides contenant des acides aminés chargés positivement, à savoir la lysine ou l'arginine, peut conférer au vecteur un tropisme pour les GAG, tel que l'héparane sulfate qui se trouve également abondamment sur la membrane des cellules de la muqueuse respiratoire. Le changement du tropisme naturel pourrait être effectué par l'échange de la fibre de l'HAAdV-5 contre celles des sérotypes appartenant au sous-groupe B qui semblent conférer aux vecteurs qui les portent des efficacités de transduction supérieures à l'HAAdV-5 (Havenga *et al.*, 2002). En effet, les sérotypes appartenant au sous-groupe B utilisent d'autres récepteurs cellulaires que les CAR, mais qui restent inconnus à l'heure actuelle. De plus, l'insertion de séquences qui codent pour la fibre de différents sérotypes d'adénovirus bovins dans le génome de l'HAAdV-5, pourrait s'avérer également utile dans l'amélioration de l'efficacité de transduction de la muqueuse respiratoire bovine.

L'utilisation de vecteurs HAAdV-5 de nouvelle génération, comme par exemple des vecteurs dits « minimaux », permettrait de réduire de manière significative la réponse immune contre ces vecteurs (Yang *et al.*, 1994b; Amalfitano *et al.*, 1998; Lusky *et al.*, 1998). Cela est important du fait que la réponse immune contre le vecteur vaccinal représente un frein à l'efficacité des vaccinations répétées (Papp *et al.*, 1999a). De plus, l'utilisation de l'HAAdV-5 de troisième génération exclurait tout risque de trans-complémentation ou de recombinaison homologue qui théoriquement pourrait avoir lieu avec un autre adénovirus.

L'HAAdV-5 pourrait être utilisé en vaccination séquentielle en combinaison avec d'autres adénovirus animaux ou d'autres vaccins comme par exemple un vaccin génétique à base d'ADN plasmidique exprimant aussi la glycoprotéine gD. Cela permettrait de surmonter l'induction de la réponse immune contre le vecteur vaccinal utilisé en premier lieu.

Enfin, il faut également envisager l'utilisation de ces vecteurs dans un cadre plus large. Etant donné que l'efficacité a été démontrée après administration nasale, ils pourront être également proposés pour exprimer des antigènes immunogènes d'autres virus respiratoires bovins. Par conséquent, cette nouvelle voie d'approche pourrait être étendue à d'autres virus respiratoires pour lesquels une immunisation locale est souhaitée.

En ce qui concerne l'emploi des formulations solubles à base de chitosane en tant qu'adjuvants intranasaux chez le bovin, des modifications chimiques additionnelles de ces polymères pourraient être envisagées. Cela créerait des réactivités conduisant à l'amélioration des propriétés de ces polymères qui permettraient d'augmenter l'efficacité d'infection du vecteur vaccinal. Ainsi, le glycol-chitosane et le chitosane pourraient être « habillés » chimiquement, afin de modifier certaines de leurs propriétés pour améliorer leur fonction d'adjuvant intranasal. Pour ce faire, des recherches, dans lesquelles le greffage d'un ou de plusieurs groupements sur le carbone ou la substitution des groupes amines par des chaînes hydrocarbonées au niveau des chaînes polymériques, viseraient à augmenter leur solubilité dans l'eau sans affecter leur caractère cationique à pH neutre (Kotzé *et al.*, 1998; Tanou *et al.*, 2000; 2001). De tels dérivés seront alors susceptibles d'établir des interactions de type électrostatique à pH physiologique entre leurs groupes amines chargés positivement et ceux de l'acide sialique chargés négativement du mucus couvrant l'épithélium des muqueuses respiratoire bovine et les membranes cellulaires (Apple *et al.*, 1988; Lehr *et al.*, 1992). De plus, ils pourraient jouer le rôle de pont entre les membranes cellulaires anioniques et le vecteur HAAdV-5 dont la fibre, le penton et l'hexon de la capsid à pH physiologique, sont également légèrement anioniques. En conséquence, le temps de résidence du vecteur vaccinal dans la cavité nasale augmenterait. En outre, les groupes protonisés favoriseraient préférentiellement le transport paracellulaire du vecteur vaccinal par l'ouverture des jonctions serrées (Artursson *et al.*, 1994; Schipper *et al.*, 1997). Enfin, les modifications structurales des chitosanes pourraient être complétées par déacétylation et hydrolyse enzymatiques additionnelles des chaînes polymériques. Cela permettrait d'augmenter le nombre de groupes amines libres en augmentant le degré de déacétylation, ainsi que leur accessibilité, et par conséquent, leur réactivité en diminuant la masse moléculaire (Sabnis *et al.*, 2000).

Le développement de nouvelles méthodes de modifications de la structure moléculaire des chitosanes conduit à de nouvelles applications et à une nouvelle valorisation de ces polymères. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse démontrent que l'effet adjuvant des chitosanes promet un large développement dans le domaine des vaccins animaux à administration intranasale contre tous les agents pathogènes utilisant les muqueuses respiratoires comme porte d'entrée.

REMERCIEMENTS

Dans le cadre de l'élaboration de cette thèse, le soutien financier du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture ainsi que de la Communauté Française de Belgique a été essentiel.

RÉFÉRENCES

- AMALFITANO A., HAUSER M.A., HU H., SERRA D., BEGY C.R., CHAMBERLAIN J.S. Production characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.*, 1998, **72**, 926-933.
- APPLE R.J., DOMEN P.L., MUCKERHEIDE A., MICHAEL J.G. Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells. *J. Immunol.*, 1988, **140**, 3290-3295.
- ARTURSSON P., LINDMARK T., DAVIS S.S., ILLUM L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 1994, **11**, 1358-1361.
- GONZALEZ R., VEREECQUE R., WICKHAM T.J., FACON T., HETUIN D., KOVESDI I., BAUTERS F., FENAUX P., QUESNEL B. Transduction of bone marrow cells by the AdZ.F(pK7) modified adenovirus demonstrates preferential gene transfer in myeloma cells. *Hum. Gene Ther.*, 1999, **10**, 2709-2717.
- HAVENGA M.J., LEMCKERT A.A., OPHORST O.J., VAN M.M., GERMERAAD W.T., GRIMBERGEN J., VAN DEN DOEL M.A., VOGELS R., VAN D.J., JANSON A.A., DE B.J., UYTDEHAAG F., QUAX P.H., LOGTENBERG T., MEHTALI M., BOUT A. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J. Virol.*, 2002, **76**, 4612-4620.
- KOTZE A.F., LUESSEN H.L., DE L.B., DE B.B., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 1997, **14**, 1197-1202.
- LEHR C.M., BOUWSTRA J.A., SCHACHT E.H., JUNGINGER H.E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.*, 1992, **78**, 43-48.
- LUSKY M., CHRIST M., RITTNER K., DIETERLE A., DREYER D., MOUROT B., SCHULTZ H., STOECKEL F., PAVIRANI A., MEHTALI M. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J. Virol.*, 1998, **72**, 2022-2032.
- MIZUGUCHI H., KOIZUMI N., HOSONO T., UTOGUCHI N., WATANABE Y., KAY M.A., HAYAKAWA T. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, 2001, **8**, 730-735.
- PAPP Z., BABIUK L.A., BACA-ESTRADA M.E. The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*, 1999, **17**, 933-943.
- SABNIS S. BLOCK L.H. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems. I. Molecular modifications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2000, **27**, 181-186.
- SCHIPPER N.G., OLSSON S., HOOGSTRAATE J.A., DEBOER A.G., VARUM K.M., ARTURSSON P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 1997, **14**, 923-929.
- THANOU M.M., KOTZE A.F., SCHARRINGHAUSEN T., LUESSEN H.L., DE B.A., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers. *J. Control. Release*, 2000, **64**, 15-25.
- THANOU M., VERHOEF J.C., JUNGINGER H.E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **52**, 117-126.
- YANG Y., NUNES F.A., BERENCSI K., FURTH E.E., GONCZOL E., WILSON J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 4407-4411.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- GOGEV S., THIRY E. Les adénovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 323-334.
- GOGEV, S., LEMAIRE, M., THIRY, E. Prevalence of antibodies to human adenovirus type 5 in Belgian cattle. *Vet Rec.*, 2001, **148**, 752-4.
- GOGEV S., VANDERHEIJDEN N., LEMAIRE M., SCHYNTS F., D'OFFAY J., DEPRez I., ADAM M., ELOIT M., THIRY E. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine*, 2002, **10**, 1451-65.
- GOGEV S., SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A., THIRY E. The efficiency of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) glycoprotein gD gene transfer mediated by a human adenovirus 5 vector is higher in bovine cell lines and in bovine upper and medium respiratory tract., Soumis pour publication.
- GOGEV S., VERSALI M.-F., GAUTIER S., THIRY E. Glycol Chitosan improves the efficacy of intranasally administered replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine*, 2003, accepté pour publication.