

L'ADENOVIRUS AVIAIRE CELO, UN VECTEUR VIRAL VACCINANT POTENTIEL

François Achille, Chevallier Sylvie, Langlois Patrick

AFSSA-Ploufragan, Unité de Génétique Virale et Biosécurité, B.P. 53, Zoopôle Les Croix, 22440 Ploufragan

Résumé

Depuis plus de 5 ans, notre équipe de recherche vise à utiliser l'adénovirus aviaire CELO en vaccinologie aviaire. Pour ce faire des connaissances *in vitro* et *in vivo* de ce virus sont des préalables nécessaires :

- *in vitro* : le virus a été entièrement séquencé, les unités transcriptionnelles le composant soigneusement définies et une méthode originale, propre à notre laboratoire, basée sur l'utilisation de cosmides, nous permettant d'intervenir en n'importe quel point du génome viral (insertions, mutations, etc...), a permis de créer plus de 70 virus recombinants pour la plupart réplcatifs ;
- *in vivo* : le virus est infectant quelque soit la voie d'entrée choisie (aérienne, digestive) et la dose utilisée (10^2 à 10^7 pfu/poussin) ; il est particulièrement invasif (se retrouvant dans pratiquement tous les organes, 3 à 7 jours p.i.) et déclenche l'apparition d'anticorps neutralisants 4 à 6 semaines p.i. Le virus, sauvage ou recombinant, ne provoque aucune pathologie. Plusieurs virus recombinants porteurs de gènes à intérêt vaccinant (protéine VP2 de la maladie de Gumboro) sont en cours d'évaluation.

Introduction

La préservation de la bonne santé des animaux d'élevage est nécessaire, non seulement pour contrôler la qualité sanitaire des aliments, mais aussi pour optimiser les rendements de production, particulièrement importants pour rentabiliser la production en élevage avicole.

La filière avicole est particulièrement sensible à l'apparition d'agents pathogènes (bactéries, virus) en raison de l'importante concentration des animaux et du fréquent renouvellement des troupeaux.

La vaccination des volailles est le meilleur moyen de limiter les risques d'épidémie. Pour cela, le vaccin doit pouvoir être administré efficacement à l'ensemble de l'élevage, mais aussi produit avec un faible coût en raison de la faible valeur individuelle des animaux.

Le CELO, un adénovirus aviaire utilisable comme vecteur viral réplcatif vaccinant

Le but est donc d'utiliser le CELO, adénovirus aviaire de sérotype I (Laver et al., 1971) pour véhiculer des antigènes (protéines) de virus ou de bactéries pathogènes afin d'immuniser les animaux contre ces agents.

Les raisons de ce choix sont les suivantes :

- 1 - Innocuité du virus : connue naturellement et démontrée lors de 4 essais sur poussins EOPS, avec voie et dose d'inoculum variées.
- 2 - Validation du modèle adénovirus comme agent vaccinant avec les adénovirus humains (Xiang et al., 1996) et porcins (Monteil et al., 2000).
- 3 - Possibilité d'une inoculation de masse (aérosols ou eau de boisson) pour l'élevage industriel : faibles coûts et efficacité (vecteur réplcatif).
- 4 - Accord de la CGG (commission de génie génétique).

In vitro

Pour ce faire, il était nécessaire d'avoir une connaissance approfondie du génome de ce virus, d'où :

- Séquençage de la totalité du génome (43.804 pb) et définition des principaux cadres de lecture ouverts (ORF) : en plus des gènes codant pour les fonctions de réplcation et les protéines de structure communs à tous les adénovirus (Horwitz, 1996), existence de 22 cadres de lecture spécifiques du CELO (Fig. 1).
- Détermination de la réalité transcriptionnelle du virus (Payet et al., 1998), au moins *in vitro* sur le modèle de la cellule LMH, et définition de "zones inertes transcriptionnellement", favorables *a priori* pour l'insertion de gènes exogènes.
- Création de virus recombinants par une méthode propre à notre laboratoire basée sur les cosmides. Très brièvement, le génome du CELO (ADN double brin) peut être scindé en 4 sous-unités : fragment A (7430 pb), B (9956 pb), C (18.298 pb) et D (8116 pb), chacune d'entre elles étant bordée par des sites de restriction uniques (naturels ou apportés par le clonage), permettant leur isolement et leur manipulation subséquente (Fig. 1 et 2). Ce sont essentiellement les sous-unités A et D, porteuses des ORFs spécifiques du CELO, qui sont travaillées ainsi et permettent la construction de recombinants. A ce jour plus de 70 virus recombinants ont été créés par cette méthode : à part 2 d'entre eux (volontairement rendus non réplcatifs par délétion de la séquence d'encapsulation), ils se sont tous montrés réplcatifs (au moins *in vitro* sur cellules LMH), avec des titres de l'ordre de 10^8 pfu/ml, tout à fait comparables à ceux obtenus avec le virus sauvage non modifié.

L'utilisation de la GFP (green fluorescent protein) comme gène rapporteur a permis de contrôler l'efficacité du positionnement du gène exogène inséré (par sa

fonctionnalité), sa stabilité (au cours d'au moins 3 passages, voir 10), l'expression d'un effet cytopathique sur cellules LMH (comparable à celui provoqué par le virus sauvage), et l'obtention d'un titre viral autorisant une application à l'échelle industrielle. Le tableau 1 donne quelques exemples de recombinants CELO-GFP et de leurs propriétés, et la fig. 3 illustre l'obtention de ces recombinants "fluorescents" (examen microscopique non destructeur pour les cellules).

La démonstration de la plasticité de ce génome viral (au moins in vitro) apportée par ces divers recombinants CELO-GFP a permis d'entreprendre la construction de vecteurs à intérêt vaccinant (voir tableau 2). Ce sont essentiellement des constructions porteuses d'antigènes du virus de la maladie de Gumboro (soit la totalité du segment A, codant pour la polyprotéine VP2-VP4-VP3, soit la partie VP2 seule, antigène majeur de la capsid du virus) ou de cytokines aviaires intervenant dans la réponse immunitaire (Interferon γ , Myelomonocytic Growth Factor, ...).

TABEAU 1. Vecteurs CELO réplcatifs portant le gène reporter GFP sous contrôle du promoteur précoce du cytomégalovirus humain (CMV).

Site d'insertion de la cassette PCMV-GFP	ORFs viraux inactivés	Apparition de foyers fluorescents après transfection de cellules LMH
insertion <i>SphI</i> (2681)	ORF 2	5 jours
délétion 329 pb <i>XbaI</i> (1660)- <i>XbaI</i> (1989)	ORF 1 (3'NT)	5 jours
délétion 1446 pb <i>XbaI</i> (1660)- <i>NdeI</i> (3106)	ORFs 2 et 14	5 jours
délétion 1666 pb <i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (41731)	ORFs 9 et 10	10 jours
délétion 404 pb <i>MfeI</i> (736)- <i>SacI</i> (1140)	ORF 1	13 jours
délétion 1427 pb <i>MfeI</i> (41754)- <i>MfeI</i> (43181)	ORFs 10 et 11	6 jours
délétion 1953 pb <i>EcoRV</i> (41731)- <i>EcoRV</i> (43685)	ORFs 10 et 11	6 jours
délétion 3620 pb <i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)	ORFs 9, 10 et 11	9 jours

TABEAU 2. Vecteurs CELO réplcatifs portant des gènes d'intérêt vaccinant : antigènes du virus de la maladie de Gumboro (IBDV) ou cytokines aviaires.

Vecteur	Cassette(s) d'expression insérée(s)	Site(s) d'insertion dans le génome viral
CELO/D-(IBDA)	PRSV-seg. A IBDV-pA (4013 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/A-(VP2)	PCMV-VP2-pA (2268 pb)	<i>XbaI</i> (1660)- <i>XbaI</i> (1989)
CELO/D-(VP2)	Porf22 + PCMV-VP2-pA (2948 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/A-(orf9)/D-(VP2)	PCMV-orf9-pA (1868 pb)	<i>XbaI</i> (1660)- <i>XbaI</i> (1989)
	Porf22 + PCMV-VP2-pA (2948 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/A-(orf11)/D-(VP2)	PCMV-orf11-pA (1263 pb)	<i>XbaI</i> (1660)- <i>XbaI</i> (1989)
	Porf22 + PCMV-VP2-pA (2948 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/A-(orf9+orf11)/D-(VP2)	PCMV-orf9-IRES-ORF11-pA (3136 pb)	<i>XbaI</i> (1660)- <i>XbaI</i> (1989)
	Porf22 + PCMV-VP2-pA (2948 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/D-(MGF-IRES-GFP)	PCMV-MGF-IRES-GFP-pA (2874 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)
CELO/D-(IFN γ -IRES-GFP)	PCMV-IFN γ -IRES-GFP-pA (2773 pb)	<i>KpnI</i> (40065)- <i>EcoRV</i> (43685)

In vivo

Après avoir fabriqué le virus recombinant et avoir vérifié sa fonctionnalité et sa stabilité in vitro, il faut tester cette fonctionnalité in vivo (protection ou non face au virus d'épreuve, maladie de Gumboro par exemple).

Actuellement nous savons que :

- 1 - le virus sauvage, qui ne provoque aucune pathologie particulière et/ou visible chez le poussin EOPS (dépouillé de tout anticorps maternel), se multiplie très rapidement dans tout l'organisme du poussin qu'il infecte (foie, trachée, intestin, bourse de Fabricius) entre 2 et 7 jours post-inoculation, même à des doses très faibles (10^2 pfu/poussin) ;
- 2 - que les anticorps neutralisants (séroneutralisation) n'apparaissent que 4 à 6 semaines post-infection ;

3 - que la clearance du virus est de 4 à 6 semaines, probablement liée à l'apparition des anticorps neutralisants.

Il reste à démontrer l'efficacité des vecteurs recombinants *in vivo*, sur poussins EOPS et conventionnels, en terme de multiplication : le vecteur doit rester répliatif pour une vaccination de masse efficace, en terme d'épreuve : le vecteur, en produisant un "antigène viral exogène", doit pouvoir protéger l'animal contre une infection ultérieure par ce type viral (test d'épreuve), et enfin en terme de durée de la protection induite par cette forme de vaccination, autant de critères qui définiront globalement l'efficacité ou non de ce type de système viral vaccinant.

Conclusions

Le CELO est un virus non pathogène. Il pourrait donc être utilisé comme vaccin vivant sans poser les problèmes de sécurité liés à l'utilisation de microorganismes pathogènes atténués ou inactivés.

L'utilisation d'un virus vaccinant capable de se multiplier (répliatif) permet d'assurer une vaccination efficace, les animaux qui échappent à l'administration du vaccin étant inoculés par contact avec les autres.

Il est suffisamment résistant pour être administré aux poussins par voie aérienne (aérosol) ou digestive (eau de boisson).

Son génome (ADN linéaire double brin) se manipule facilement et reste stable, même après modification (très grande plasticité de ce génome, au moins *in vitro*) : il nous faut moins d'un mois pour obtenir un virus recombinant donné et pour le caractériser.

Un seul vecteur ou un cocktail de plusieurs recombinants pourrait être utilisé pour vacciner les élevages contre plusieurs agents infectieux, et le vaccin pourrait facilement être modifié en fonction de l'apparition de nouveaux pathogènes.

Il pourrait même dépasser la seule utilisation à l'espèce poulet et s'étendre à d'autres espèces : des essais préliminaires avec un recombinant CELO-GFP ont montré que les cellules de porc (lignée PK15) sont infectables (50 à 60 % de cellules infectées pour une MOI de 10). Il pourrait aussi être utilisé comme vecteur pour la production de protéines d'intérêt (anticorps, cytokines,...).

Enfin, il pourrait servir de vecteur pour un second virus recombinant, par exemple un adeno-associated virus (vecteur mosaïque adénovirus-AAV), et être utilisé dans le cadre de la transgénèse chez le poulet.

Références

- Horwitz, M. S., 1996. In: Fields virology 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp 2111-2148.
- Laver, W. G., H. Banfield Younghusband, and N. G. Wrigley, 1971. *Virology*, 45, 598-614.
- Monteil, M., M.F. Le Pottier, A. A. Ristov, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, B. Klonjowski, and M. Eloit, 2000. *Vaccine*, 18, 1738-1742.
- Payet, V., C. Arnauld, J.P. Picault, A. Jestin, and P. Langlois, 1998. *J. Virol.*, 72, 9278-9285.
- Xiang, Z. Q., Y. Yang, J. M. Wilson, and H. C. J. Ertl, 1996. *Virology*, 219, 220-227.

FIGURE 1. Représentation du génome de l'adénovirus aviaire CELO. Il est constitué d'un ADN double brin de 43 804 paires de bases (numérotées de gauche à droite). Les flèches représentent les cadres de lecture ouverts (ORF). Ceux qui codent pour les protéines de structure et de réplication du virus sont situés dans la partie centrale, comme chez les adénovirus humains. Ceux dont la fonction est encore inconnue, numérotés de 1 à 22, sont localisés aux deux extrémités. Le génome possède 3 sites de restriction uniques (plus un à chaque extrémité) qui permettent de le découper en 4 fragments : A, B, C et D.

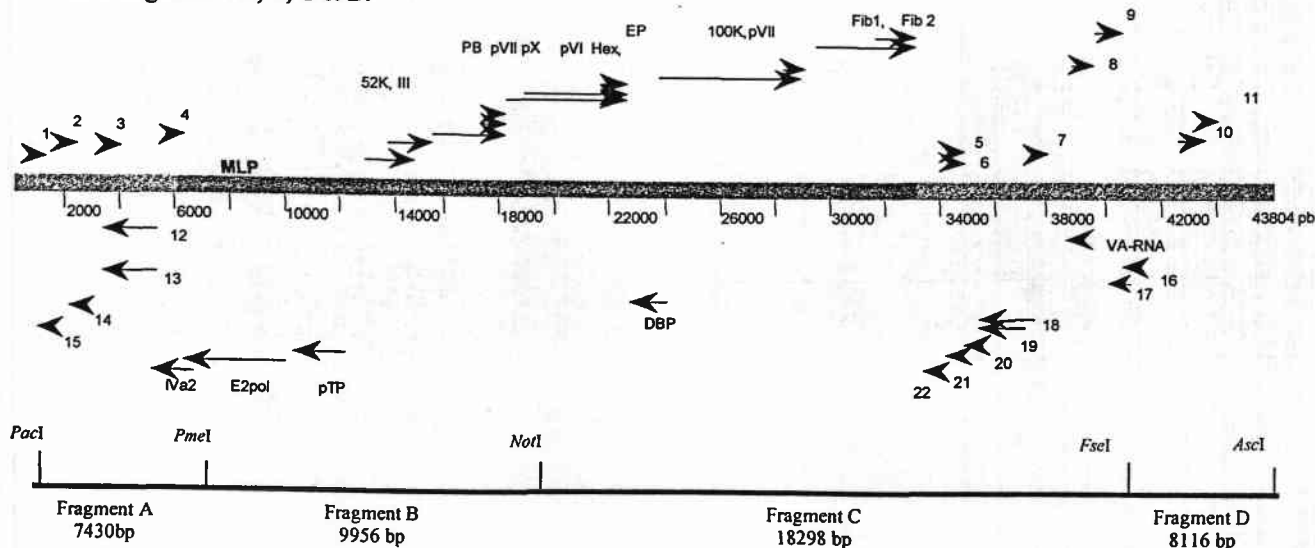


FIGURE 2. Construction d'adénovirus CELO recombinants dans des cosmides. Le génome complet du CELO est cloné dans le cosmide cosΔ1. Le fragment (ici le fragment D) dans lequel on veut insérer un gène est excisé (a) et sous-cloné dans un pasmide (b). On peut alors en déléter une partie et y insérer une cassette d'expression (promoteur + gène) (c). Le fragment modifié (D/cassette) est réintroduit dans le cosmide par ligation (d), le produit de ligation est encapsidé dans des têtes de bactériophage lambda (e) puis amplifié dans *E. coli* (f). L'ADN purifié du cosmide est alors transfecté dans des cellules LMH(g) pour obtenir le virus recombinant (h).

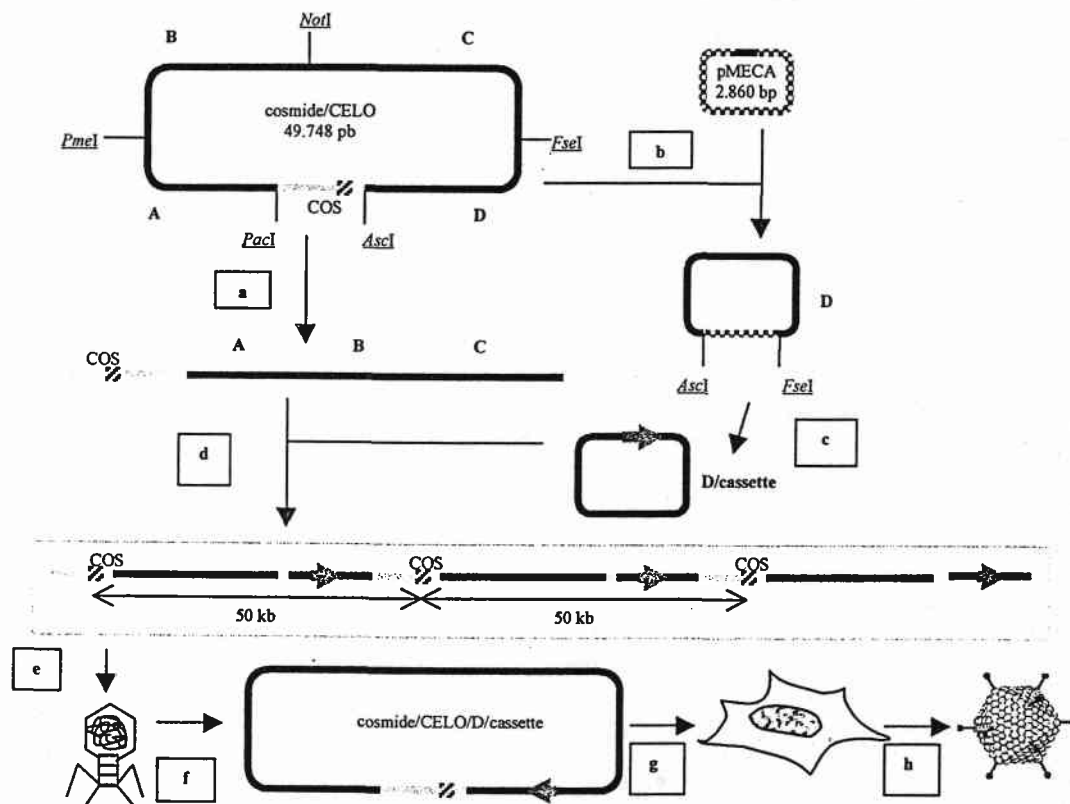


FIGURE 3. Obtention d'un virus CELO recombinant répliquatif portant le gène de la green fluorescent protein (GFP). (a) Observation de quelques cellules LMH exprimant la GFP 20 heures après transfection avec le cosmide portant le génome viral recombinant. (b) Foyers de cellules fluorescentes, observés quelques jours après transfection, dus à la propagation du vecteur vers les cellules voisines. (c) Effet cytopathique observé au niveau d'un foyer de cellules fluorescentes (plage de lyse).

