

PERSPECTIVES D'UTILISATION DES BIOTECHNOLOGIES DANS LA LUTTE CONTRE LES MALADIES INFECTIEUSES DU PORC

H. LAUDE

*Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie
route de Thiverval, 78850 THIVERVAL-GRIGNON*

INTRODUCTION

Il suffit d'un regard sur l'évolution de la biologie moléculaire au cours de la dernière décennie pour se convaincre que nombreux sont les secteurs d'application qui bénéficient étroitement de ses retombées. La santé animale en est un. L'apport des technologies nouvelles, dérivées principalement de la fusion cellulaire et de la recombinaison d'ADN, sera sans nul doute particulièrement marquant dans le domaine de la pathologie infectieuse.

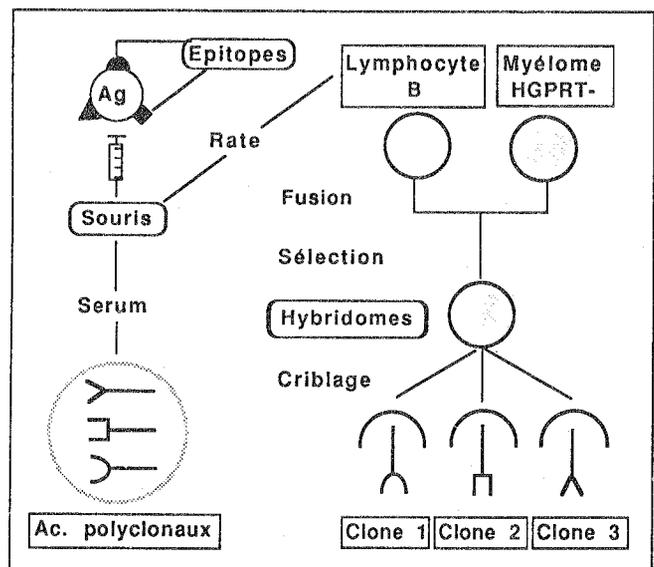
En fait, certaines innovations appartiennent déjà au quotidien, sinon à l'échelon des élevages, du moins à celui des laboratoires. La production porcine n'échappe heureusement pas à cette tendance, comme se propose de l'illustrer cette revue. Après un rappel des diverses techniques mises à contribution dans les domaines du diagnostic et de la vaccination, seront cités, sans prétendre à l'exhaustivité, des exemples ou des perspectives d'application.

1. DES SONDÉS MOLÉCULAIRES AU DIAGNOSTIC

1.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Ac.Mo.) sont des réactifs issus de la technologie des **hybridomes**. Ces lignées, établies surtout dans l'espèce murine pour l'instant, sont issues de la fusion d'un lymphocyte B unique et d'une cellule myélomateuse (Figure 1). Les hybridomes produisent en continu des anticorps d'un seul type et d'une spécificité connue, restreinte à un **déterminant antigénique**, ou **épitope** (revue: BAZIN, 1987). Par rapport à un réactif polyclonal, tel qu'un sérum hyperimmun, les Ac.Mo. offrent l'avantage d'un réactif uniforme au plan de la réactivité et de l'approvisionnement. De plus, grâce à leur étroite spécificité, ils rendent possible l'identification d'un déterminant antigénique au sein d'un mélange très complexe. Les Ac.Mo. se sont de ce fait imposés non seulement comme moyen d'analyser très finement la structure antigénique d'une protéine (mosaïque d'épitopes distincts), mais également comme réactifs de diagnostic. Les incertitudes liées aux réactions croisées peuvent être évitées, les examens sont plus précis, plus fiables, plus

FIGURE 1
PRODUCTION DE LIGNÉES CELLULAIRES SECRÉTANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX



standardisables. Hormis leur obtention, qui reste laborieuse, les quelques inconvénients dont souffrent les Ac.Mo. peuvent généralement être résolus d'une façon simple : choisir un autre Ac.Mo.

Appliqués à la microbiologie, les Ac.Mo. ont grandement facilité l'avancement des connaissances dans de nombreux domaines : caractérisation des polypeptides structuraux et non structuraux, purification d'antigène, études sur le mécanisme de neutralisation du pouvoir infectieux, sur la variabilité antigénique des souches, sur le pouvoir pathogène grâce à la sélection de variants d'épitopes, etc (revue: CARTER & TER MEULEN, 1984). S'agissant du diagnostic virologique ou bactériologique, les Ac.Mo. sont avantageusement utilisés

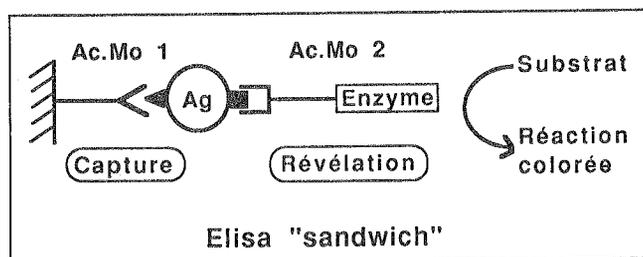
dans l'ensemble des tests de détection immunologiques classiques : test immunoenzymatique Elisa et ses nombreuses variantes, immunofluorescence, immunoélectromicroscopie, etc.

Des sondes monoclonales existent maintenant pour bon nombre d'agents infectieux sévissant chez le porc. En voici quelques exemples d'application :

– Le diagnostic de la **Peste Porcine Classique (PPC)** est compliqué par l'existence de déterminants antigéniques communs entre le virus PPC, BVD (Diarrhée Bovine - Maladie des Muqueuses) et BD (Border Disease), trois agents qui par ailleurs n'ont pas une spécificité d'hôte très stricte. Les Ac.Mo. constituent un réactif idéal pour la mise en œuvre d'un test de détection différentiel entre ces trois pestivirus. L'isolement d'un Ac.Mo. discriminant la majorité des souches de PPC des souches de BVD a été rapporté (WENSVOORT *et al.*, 1986).

– L'obtention d'Ac.Mo. dirigés contre le virus de la **Gastro-Entérite Transmissible (GET)** a permis notamment de montrer que la plupart des sites antigéniques sont hautement conservés d'une souche à l'autre (DELMAS *et al.*, 1986). Le coronavirus respiratoire apparenté récemment isolé peut être différencié du virus GET à l'aide de ces réactifs (LAUDE *et al.*, ce volume). Plusieurs laboratoires travaillent à la mise au point d'un test permettant la détection d'antigènes GET directement sur des prélèvements fécaux d'animaux infectés (BERNARD *et al.*, 1986; VAN NIEUWSTADT *et al.*, 1987). Le principe très général de ce type de test est un **Elisa sandwich** utilisant des Ac.Mo. reconnaissant des épitopes distincts, l'un utilisé comme capteur, l'autre comme révélateur (Figure 2).

FIGURE 2
TEST DE DÉTECTION IMMUNOENZYMATIQUE UTILISANT
DEUX ANTICORPS MONOCLONAUX



– Des Ac.Mo. dirigés contre différentes protéines structurales du virus de la **Maladie d'Aujeszky (MA)** ont également été isolés (HAMPL *et al.*, 1984; ELOIT *et al.*, 1987). Le dépistage différentiel des viroses respiratoires majeures chez le porc charcutier (Aujeszky, Grippe type A H1N1 et H3N2, coronavirus respiratoire) pourrait bientôt s'effectuer en quelques heures et avec une sensibilité acceptable à l'aide d'une réaction immunoenzymatique utilisant une gamme d'Ac.Mo. appropriés et des cellules provenant d'un écouvillonnage nasal (JESTIN *et al.*, 1987; ONNO, 1987). L'emploi d'Ac.Mo. s'applique également au sérodiagnostic par le biais d'un test **Elisa compétitif**. Ainsi, un test permettant de distinguer les porcs infectés de ceux vaccinés contre le virus MA a été décrit récemment. Ce test utilise comme indicateur un Ac.Mo. anti-glycoprotéine gl, un antigène qui n'est pas exprimé par certaines souches utilisées comme vaccin (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1986).

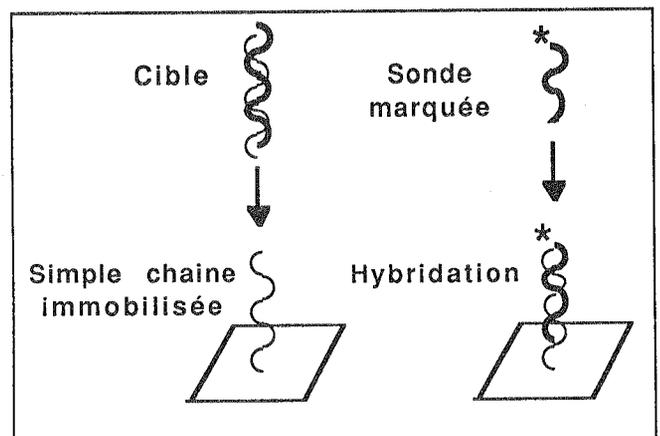
– En bactériologie, les Ac.Mo. ont fait avancer la caractérisation des antigènes de surface des **salmonelles**, des **mycoplasmes** notamment, ce qui débouche sur une simplification notable du processus de typage des souches (C. LAENNEC, M. KOBISH, Ploufragan, comm. pers.; QUILLIEN, 1987).

Les progrès réalisés dans la compréhension des aspects biochimiques de la pathogénie de la **Rhinite Atrophique** dont l'agent causal est *Bordetella bronchiseptica*, reposent en grande partie sur la caractérisation à l'aide d'Ac.Mo., de la fameuse protéine de surface 68K qui joue un rôle déterminant dans l'évolution du processus pathologique. En particulier, dans le modèle souris, l'administration passive d'Ac.Mo. anti-68K quelques heures avant l'aérosol infectant prévient le développement des modifications nasales (MONTARAZ *et al.*, 1984).

1.2. Les sondes nucléiques

Les sondes nucléiques sont des réactifs de détection déjà très largement employés en génie génétique. Leur principe d'utilisation repose sur la propriété d'une chaîne nucléotidique, ADN ou ARN, de s'apparier très spécifiquement avec une autre chaîne dont la séquence est dite complémentaire, en formant une structure bicaténaire suffisamment stable. Ce phénomène d'**hybridation moléculaire** permet d'identifier des fragments de matériel génétique, tandis que les tests immunoenzymatiques détectent la présence d'antigènes. Les sondes, généralement obtenues à partir d'un ADN cloné (cf. infra), sont "marquées" de façon à visualiser la réaction d'hybridation avec la molécule cible (Figure 3). La majorité des sondes utilisées à l'heure actuelle sont des sondes dites "**chaudes**", marquées par incorporation de précurseurs radioactifs dans la chaîne nucléotidique. Le test d'hybridation s'applique naturellement à la détection d'agents pathogènes, virus ou bactéries, soit par contact avec un dépôt d'acides nucléiques préalablement extraits de l'échantillon à analyser, soit par cytohybridation *in situ* sur des cellules ou des coupes de tissus (revue: HAASE *et al.*, 1984). La sensibilité est telle qu'il est possible de détecter de 1 à 10 pg d'ADN ou d'ARN par spot, et jusqu'à une copie de génome par cellule en hybridation *in situ*.

FIGURE 3
DÉTECTION SPÉCIFIQUE D'UNE SÉQUENCE A L'AIDE
D'UNE SONDE

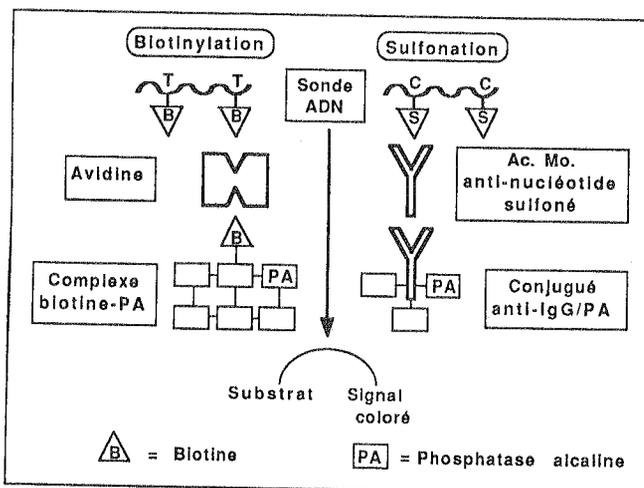


Des sondes chaudes applicables à la détection de virus porcins tels que **Peste Porcine Africaine** (TABARES, 1987), **coronavirus** (SHOCKLEY *et al.*, 1987), **rotavirus** (J. COHEN, Grignon, comm. pers.) ou **Maladie d'Aujeszky** sont actuellement disponibles. Dans le cas particulier du virus MA, les sondes nucléiques constituent un outil irremplaçable pour l'étude des phénomènes de latence : RZIHA *et al.* (1986) ont pu montrer que le génome viral persiste de façon stable

qualitativement et quantitativement (0,3 à 30 copies par cellule) dans différentes aires du système nerveux central et périphérique, plus d'un an après l'infection. Ces travaux donnent donc accès à l'étude des facteurs conditionnant la réactivation du virus, ou de la capacité des souches vaccinales à prévenir le phénomène de latence. La détection sélective de *Mycoplasma hyorhinis* à l'aide de fragments clonés de l'ADN génomique a également été décrite (TAYLOR *et al.*, 1985), et rien ne s'oppose à ce que d'autres applications voient le jour en microbiologie porcine comme c'est déjà le cas en clinique humaine.

Cela étant, les sondes radiomarquées posent un problème de sécurité et de coût, qui restreint leur champ d'utilisation s'agissant du diagnostic à large échelle. Mais d'autres techniques de marquage, visant à l'élaboration de "sondes froides", sont en plein essor (revue : PEREIRA, 1986). L'hybridation est mesurée cette fois par un test colorimétrique. La sonde contient des nucléotides modifiés (biotinylation, sulfonation) de façon à permettre dans une seconde étape une détection sélective par un procédé enzymatique classique, comme dans la technique Elisa (Figure 4). La mise au point des sondes froides reste pour l'instant plus délicate que celle des sondes chaudes, mais l'écart devrait se réduire au fil des années.

FIGURE 4
SONDES FROIDES : 2 PROCÉDÉS DE DÉTECTION INDIRECTE



2. VACCINATION : UNE PERCÉE TECHNOLOGIQUE

2.1. De la recombinaison d'ADN au séquençage de gène : Rappels

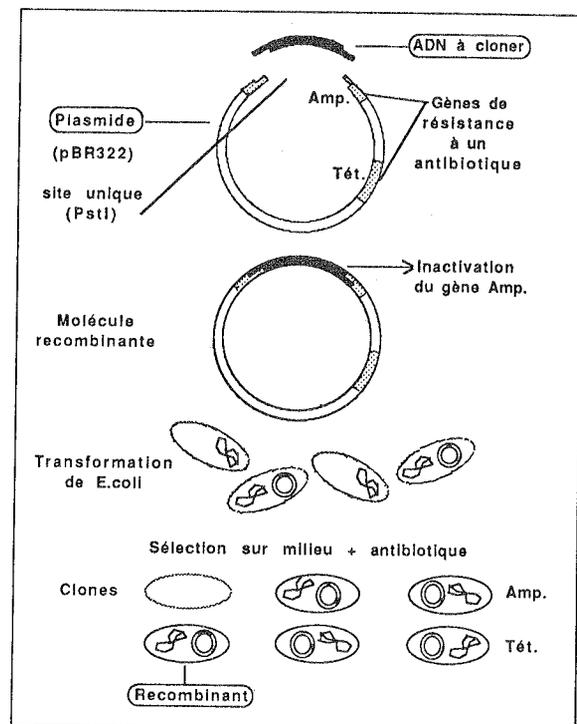
Le patrimoine génétique d'une cellule vivante est stocké sur une double hélice d'ADN. L'information y est contenue sous forme d'un alphabet de 4 lettres, correspondants à 4 motifs chimiques élémentaires (nucléotides A, T, C et G). Lorsqu'un gène s'exprime, il y a tout d'abord fabrication d'une copie de l'ADN, l'ARN messager. Lors du décodage du messager par la machinerie cellulaire, chaque triplet de lettres forme un codon, et c'est l'ordre des codons qui détermine l'enchaînement des acides aminés, briques élémentaires dont sont constituées les protéines. De cela trois points essentiels sont à retenir : 1) La **séquence** d'une protéine peut être prédite à partir d'une séquence d'ADN grâce au code génétique. 2) Ce code est universel de sorte que l'information sera lue de façon identique par une cellule bactérienne, animale ou végétale. 3) C'est l'ordre et la nature des amino-acides qui déterminent la structure tridimensionnelle d'une protéine et partant son activité, antigénique par exemple.

Le génie génétique intègre un ensemble de techniques d'intervention sur l'ADN, et fait notamment appel à la **recombinaison in vitro**, c'est-à-dire l'insertion d'un fragment d'ADN dans le génome d'un organisme différent de celui de départ (revue : DAVIES, 1987). Les opérations de **clonage moléculaire** (isolement et purification d'un gène), et de **séquençage** (décryptage de l'information) ont atteint un haut niveau de perfectionnement. Introduire un gène codant pour une protéine virale par exemple, dans la bactérie Gram- Escherichia coli K12, la bête de somme du génie génétique, ou bien établir la séquence d'un segment d'ADN de plusieurs milliers de nucléotides, ne soulève plus en principe de difficultés majeures.

Le **clonage** s'effectue en greffant le fragment d'ADN exogène sur une sorte de minichromosome d'origine bactérienne (**plasmide**) ou virale, modifié à cette fin. Pour réaliser cette chirurgie moléculaire, l'expérimentateur dispose d'un véritable arsenal d'enzymes de restriction, c'est-à-dire des endonucléases coupant l'ADN en des sites bien définis, et d'enzymes de modification (polymérase, ligase, etc.). Une fois introduit dans la bactérie (**transformation**), le **vecteur de clonage** s'y réplique de façon autonome, amplifiant ainsi le gène greffé (Figure 5).

Obtenir l'**expression** du gène cloné, c'est-à-dire la production d'une protéine étrangère par la cellule hôte, est en revanche plus aléatoire, et nécessite l'emploi de vecteurs plus sophistiqués. Le principe consiste, pour un **vecteur d'expression** procaryote comme eucaryote, à réaliser une construction précise, dans laquelle le gène à exprimer est notamment placé sous contrôle d'un **promoteur** puissant, au besoin inductible. Il s'agit alors d'une véritable **reprogrammation génétique**, transitoire ou permanente, de la cellule hôte.

FIGURE 5
CLONAGE D'UN FRAGMENT D'ADN
DANS UN PLASMIDE BACTÉRIEN



2.2. Limites des vaccins actuels

Pour mieux saisir l'apport du génie génétique dans l'élaboration des vaccins, il est nécessaire de rappeler brièvement les limites des vaccins conventionnels, notamment antiviraux. Celles-ci sont de deux ordres, qu'il s'agisse d'une préparation atténuée ou inactivée.

– Production : L'inactivation ou l'atténuation des agents pathogènes représente une étape critique : trop poussée, elle risque de compromettre le pouvoir immunogène ; trop modérée, elle laisse subsister soit un pouvoir pathogène résiduel, soit des germes pleinement pathogènes. L'obtention d'une souche atténuée, en particulier, est le fruit d'un travail fastidieux et aveugle, les mutations responsables de l'altération du pouvoir pathogène demeurant inconnues. Les virus se propagent, non sur des milieux synthétiques comme les bactéries, mais en culture de cellules, dont la production en masse est coûteuse. A ce stade, le risque de contamination par d'autres agents n'est pas négligeable. Enfin, certains pathogènes (rage, fièvre aphteuse...) requièrent des conditions de confinement hautement contraignantes.

– Vaccination : L'un des problèmes majeurs concerne l'innocuité. Il n'est pas rare d'observer des effets secondaires suite à l'injection de préparations inactivées, qui nécessitent souvent des doses importantes ou renouvelées pour une immunisation solide. Parallèlement, il existe toujours un risque potentiel de réversion avec les vaccins à virus atténués.

La plupart de ces inconvénients pourraient être éliminés à condition de pouvoir séparer les antigènes induisant la réponse protectrice (le principe vaccinant) du reste de l'organisme infectieux : c'est précisément l'une des possibilités qu'offre le génie génétique.

2.3. Les nouvelles stratégies

La figure 6 résume les différentes voies d'obtention d'un vaccin de nouvelle génération. La plupart passent, on le voit, par le clonage moléculaire des séquences qui codent pour le ou les **antigène(s) protecteur(s)**. Schématiquement on peut distinguer 4 types d'approche :

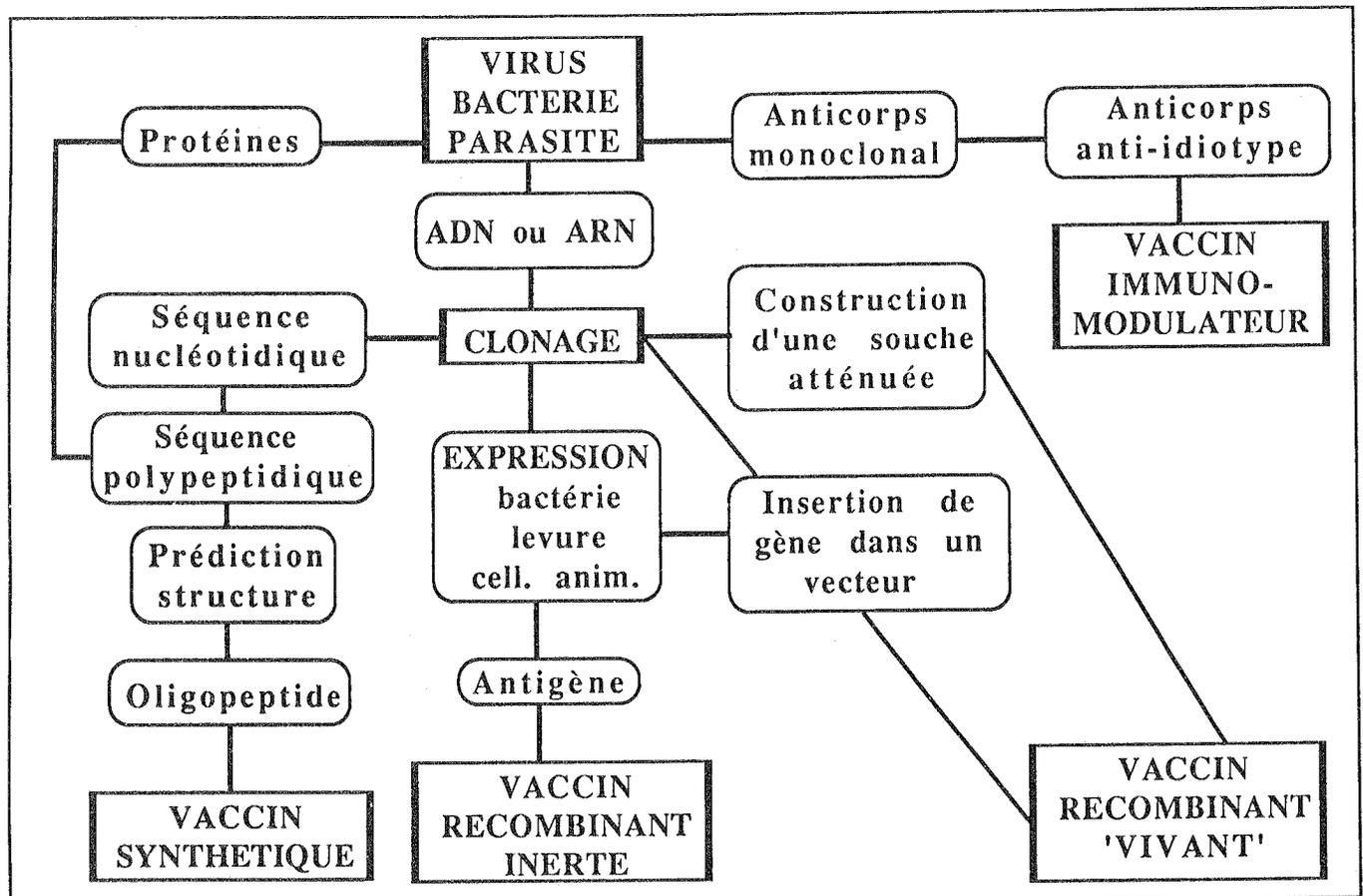
1) **Vaccin synthétique** : une fois identifiée sur la séquence de la protéine candidate une portion virtuellement immunogène, on peut synthétiser artificiellement le peptide correspondant. Un tel vaccin, chimiquement défini, est conceptuellement idéal (revue: ARNON & SELA, 1985). Cependant cette approche n'est pas toujours possible du fait qu'un déterminant antigénique peut impliquer des éléments distants sur la chaîne polypeptidique. D'autre part, le pouvoir immunogène des **oligopeptides** est fréquemment insuffisant. Cette démarche est tentée dans le cas du virus de la Fièvre Aphteuse : l'injection des peptides synthétiques correspondant aux aminoacides 141-160 et 200-213 de la protéine VP1 confère une certaine protection à l'animal (revue : ROWLANDS, 1985).

2) **Vaccin à antigène recombinant** : le principe est cette fois d'obtenir l'expression d'une protéine immunogène clonée, en bactérie ou en levure par exemple, de façon à permettre une production en masse bien plus aisée que par les techniques classiques. Ainsi la protéine VP1 du virus de la Fièvre Aphteuse a été exprimée dans *E. coli* (KLEID *et al.*, 1981). Les écueils rencontrés à l'emploi d'antigènes recombinants tiennent soit à des problèmes de modification post-traductionnelle des protéines (glycosylation, etc.), propres à chaque cellule hôte, soit à l'accroissement des doses nécessaires à l'immunisation, du fait notamment que l'antigène n'est plus présenté sous une forme "particulaire".

3) **Vaccin recombinant réplcatif** : c'est une voie qui paraît particulièrement prometteuse en virologie vétérinaire. Il existe en fait 2 stratégies bien distinctes :

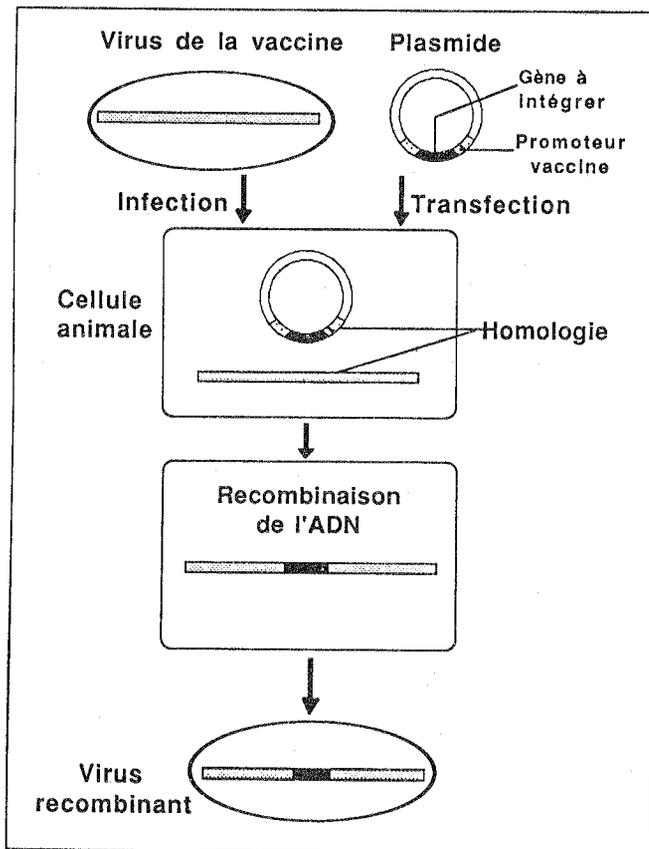
– utilisation d'un **vecteur** : le gène choisi est inséré dans le génome d'une bactérie ou d'un virus **apathogène**, qui va propager l'antigène correspondant chez l'animal vacciné à la place du pathogène dont il provient. Le **virus de la vaccine**

FIGURE 6
NOUVELLES STRATÉGIES POUR L'OBTENTION DE VACCINS



est le vecteur viral le plus utilisé pour l'instant (revue : MOSS & FLEXNER, 1987) (Figure 7), mais d'autres virus (adénovirus, papillomavirus, herpes) sont candidats. Outre l'absence de pouvoir pathogène *in vivo*, ces vecteurs viraux possèdent deux caractéristiques communes : un génome à ADN double brin afin d'effectuer commodément les opérations de recombinaison, et la capacité d'héberger un fragment d'ADN exogène sans perdre leur capacité à se répliquer ; idéalement, il faudrait pouvoir greffer plusieurs antigènes sur un même vecteur (polyvalence). L'une des réussites les plus spectaculaires en ce domaine est la vaccination anti-rabique du renard par l'administration *per os* d'un virus vaccine recombinant qui porte dans son génome les séquences codant pour la glycoprotéine externe gp65 du virus de la rage (BLANCOU *et al.*, 1986).

FIGURE 7
INSERTION D'UN GÈNE ÉTRANGER DANS LE GÉNOME
DU VIRUS DE LA VACCINE PAR RECOMBINAISON
D'ADN *IN VIVO*



– **Construction d'une souche atténuée** : le génome du pathogène lui-même est rationnellement manipulé de façon à obtenir une souche avirulente. Ceci implique qu'un ou plusieurs gènes conditionnant l'expression de la virulence aient été identifiés. Ensuite sont pratiquées en des endroits précis du génome des délétions (ou des insertions), qui créent tout à la fois l'atténuation de la souche et le moyen d'en contrôler la stabilité. C'est précisément l'approche choisie dans le cas de l'herpesvirus de la Maladie d'Aujeszky (cf. infra). Il est un fait que les virus à ADN se prêtent bien à ce type de manipulation, considérablement plus délicate à mettre en œuvre dans le cas des virus à ARN.

4) **Anticorps anti-idiotypes** : de tels anticorps portent, selon la théorie du réseau immunitaire de Jerne, l'**empreinte positive** d'un déterminant antigénique. Ils sont de ce fait des subs-

tituts potentiels à l'antigène de départ (revue : BONA, 1987). Les anticorps anti-idiotypes ouvrent la voie à une manipulation fine de la réponse immune, pour l'instant réservée à la médecine humaine. Cette approche apparaît irremplaçable s'agissant d'une immunisation vis-à-vis d'antigènes non-codés (non-protéiques).

2.4. Réalisations et projets dans l'espèce porcine

– **Entérite colibacillaire néonatale**: L'une des caractéristiques des souches *E. coli* entérotoxigènes est la présence à la surface des cellules de filaments protéiques qui leur permettent de s'attacher aux entérocytes. Ces **facteurs d'attachement** sont immunogènes et induisent des anticorps capables de bloquer spécifiquement l'interaction avec les cellules cibles, phase initiale de la colonisation. L'induction d'anticorps anti-adhésines dans le colostrum des truies est donc un moyen de protéger précocement le porcelet allaité.

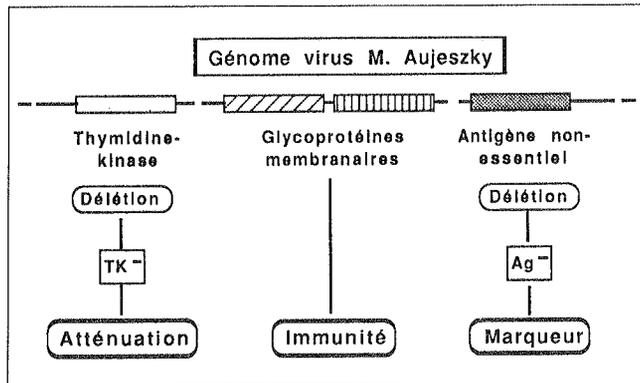
Akzo (Pays-Bas), Cetus (U.S.A.) et Rhône-Mérieux commercialisent un vaccin dont la particularité est d'être historiquement le premier exemple de vaccin recombinant utilisé sur le terrain en médecine vétérinaire. Les opérations de génie génétique effectuées ont le mérite de la simplicité et ont consisté à transférer d'un plasmide bactérien à un autre, un large fragment d'ADN contenant l'**opéron K88** (promoteur + gènes qui permettent l'assemblage de l'antigène K88). Le plasmide receveur est ensuite réintroduit dans une souche *E. coli* apathogène (CERF *et al.*, 1982; MEYERINK *et al.*, comm. pers.). Le vaccin "Imocolipor" par exemple est en fait un mélange de trois souches recombinantes, chacune correspondant à l'un des trois sérotypes de l'antigène K88 (ab, ac et ad). Comparativement aux souches classiques, les souches recombinantes assurent une stabilité accrue de l'expression et une présentation sélective des antigènes d'attachement.

– **Maladie d'Aujeszky** : Ces trois dernières années ont été marquées par un large essor des travaux sur la biologie moléculaire du virus MA. Deux gènes au moins gouvernent l'expression de la virulence : le gène de la thymidine kinase (TK) et celui de la glycoprotéine d'enveloppe gI (130K). Les souches dites gI- ou TK- sont atténuées pour le porc, tout en étant capable d'induire une immunité solide. C'est à KIT *et al.* (1985) que revient le mérite d'avoir montré l'intérêt de la recombinaison d'ADN pour fabriquer des mutants de virus MA sur mesure à des fins prophylactiques. La technique, assez simple à mettre en œuvre dans le cas d'un virus à ADN double brin, consiste à cloner le gène TK dans un plasmide, à amputer le gène d'un segment, puis à réinsérer le gène tronqué dans le génome viral. Cette dernière étape s'effectue par recombinaison spontanée en cotransfectant des cellules avec l'ADN parental et l'ADN plasmidique. Des recombinants TK- ont montré un pouvoir vaccinant analogue à celui des souches empiriquement atténuées. L'avantage de la méthode réside dans le fait qu'une large délétion dans un gène interdit en principe toute reversion vers le phénotype sauvage.

Mais la recombinaison d'ADN offre des perspectives plus attrayantes encore. En effet, l'attention s'est récemment portée sur un certain nombre de glycoprotéines virales dites non essentielles (appelons les gpNE), qui ne joueraient de rôle appréciable ni dans l'expression du pouvoir pathogène, ni dans l'instauration d'une immunité. C'est notamment le cas des protéines gIII et gX (KIT *et al.*, 1987; THOMSEN *et al.*, 1987). Ces gènes étant cartographiés et séquencés, il devient donc possible de produire des **doubles recombinants** TK-/gpNE-. Le sérum des animaux immunisés avec ce type de

mutants serait dépourvu d'Ac. vis-à-vis d'une protéine gpNE (Figure 8), d'où un moyen élégant de différencier les animaux infectés par le virus sauvage des animaux vaccinés, par un test Elisa de routine. Des vaccins anti-MA reposant sur ce principe devraient être commercialisés dans un avenir très proche.

FIGURE 8
VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY :
OBTENTION DE RECOMBINANTS POUR LA VACCINATION



- Gastroentérite Transmissible :

La connaissance du génome du coronavirus de la GET a bien progressé durant ces dernières années. La séquence des gènes codant notamment pour les protéines structurales a été établie (LAUDE *et al.*, 1987; RASSCHAERT *et al.*, 1987). Dans le cas d'un virus à ARN, le clonage du génome passe par une étape critique qui est l'obtention d'une copie d'ADN complémentaire (ADNc) par action de la transcriptase inverse. Malheureusement cette copie est généralement morcelée ou incomplète, de sorte que la construction d'une souche atténuée via la recombinaison d'ADN, comme décrite pour le virus MA, est pour l'instant inaccessible dans le cas du virus GET.

Les travaux s'orientent donc actuellement vers l'insertion dans divers types de vecteurs, du gène codant pour la **glycoprotéine E2 (220K)**. Cette protéine, qui forme les projections visibles à la surface des virions, porte les déterminants essentiels à l'instauration d'une immunité chez l'animal, dans la mesure où elle est la seule des protéines structurales à induire la synthèse d'Ac. neutralisant le virus. La firme Amgen (U.S.A.) est parvenue à exprimer une large portion du gène E2 dans le vecteur vaccine (HU *et al.*, 1984), mais les essais de protection chez le porc se sont soldés par un échec. Cependant, le vecteur vaccine qui, selon les rares informations disponibles, semble mal adapté à l'espèce porcine, ne constituait pas a priori un vecteur de choix dans l'optique d'une immunisation destinée au tractus intestinal. La leçon à tirer est qu'il faudra probablement développer dans l'avenir des vecteurs sur mesure, non seulement adaptés à l'espèce porcine, mais dotés du tropisme correspondant au type d'immunité désiré. Le virus de la MA pourrait lui-même devenir l'un de ces vecteurs, compte-tenu des caractéristiques de son génome...

3. AUTRES PERSPECTIVES

Il existe, en dehors de la vaccination et du diagnostic, d'autres fronts sur lesquels la lutte anti-infectieuse pourrait, dans un futur parfois lointain, bénéficier des apports du génie génétique.

- L'une de ces avancées est le clonage et la caractérisation de neuf des gènes codant pour l'**interféron** type α chez le porc (LEFEVRE & LA BONNARDIERE, 1986). Interféron, rappelons-le, est un terme générique qui désigne une famille de protéines capables d'induire un état antiviral à large spectre dans les cellules, et douées également de certaines propriétés immunomodulatrices. L'insertion de l'un de ces gènes dans un plasmide d'expression thermoinductible, a permis d'obtenir la production d'une quantité importante d'interféron recombinant dans *E. coli* (LEFEVRE, 1987). Un interféron porcine recombinant de type γ est également produit par la firme Ciba. Il est donc dorénavant possible d'analyser l'effet bénéfique éventuel de telles molécules dans diverses situations infectieuses notamment, travail qu'il eut été impensable de mener avec des interférons d'origine naturelle. Par ailleurs le clonage de gènes porcins codant pour d'autres molécules effectrices de l'immunité telles que les interleukines, devrait suivre à court terme. De même, la caractérisation de gènes codant pour des antigènes du complexe SLA pourrait un jour déboucher sur la sélection rationnelle d'animaux présentant une résistance naturelle accrue.

- Une autre piste dont l'exploration vient d'être entamée est celle des **anti-ARN messagers**. L'idée est de mettre à la disposition de la cellule en proie à une infection des **oligonucléotides synthétiques** ayant une séquence complémentaire à certaines des séquences codantes présentes dans le génome de l'agresseur. En se combinant spécifiquement avec les ARN messagers, ces oligonucléotides antisens pourraient entraver le processus de traduction en protéines (revue : TOULME, 1987). La membrane cellulaire constitue naturellement un obstacle à la pénétration de ces molécules, mais on peut imaginer intégrer de telles séquences dans le génome d'animaux transgéniques...

CONCLUSIONS

Telles sont, esquissées à grands traits, les perspectives essentielles qui s'ouvrent en matière de lutte anti-infectieuse. Deux constatations s'imposent de prime abord : l'espèce porcine bénéficie au même titre que d'autres espèces d'intérêt agronomique de ces avancées technologiques, et la contribution des laboratoires français en ce domaine est notable. Ensuite, il paraît nécessaire de formuler quelques remarques d'ordre général visant à replacer l'impact des biotechnologies dans le contexte du réel. Il convient de rappeler que les progrès accomplis le sont au prix d'un très lourd investissement de recherche, et aussi que le chemin à parcourir du laboratoire au terrain est souvent plus semé d'embûches qu'on ne le prévoit. Dans le domaine du diagnostic, on peut sans risque d'erreur prédire une banalisation à brève échéance des sondes moléculaires, notamment des anticorps monoclonaux. A cet égard, l'arrivée sur le marché de "kits" de diagnostic polyvalents utilisables directement par les praticiens et les éleveurs va vraisemblablement susciter un certain nombre de problèmes neufs au plan de la responsabilité professionnelle ou de la législation.

Concernant la vaccination, en revanche, il ne faut sans doute pas s'attendre à une révolution aussi immédiate. Affirmer que le génie génétique permettra de fabriquer des vaccins plus sûrs, plus efficaces, plus économiques, semble pour le moins hâtif. Certes, un vaccin recombinant ne peut renfermer de particules pathogènes, et c'est là un gage indiscutable de sécurité pour le producteur comme pour l'éleveur. Mais en ce qui concerne l'efficacité et le coût, la réponse sera variable selon les cas. Dans le domaine propre de la médecine vétérinaire, il apparaît en définitive que l'un des atouts majeurs des vaccins de nouvelle génération sera la possibilité de dif-

férencier animaux infectés et vaccinés. Cela est envisageable dès lors que l'immunisation met en jeu soit un antigène unique, répliqué ou non par un vecteur, soit une souche recombinante atténuée à laquelle fait défaut un antigène exprimé en contrepartie par la souche sauvage. Dans un cas comme dans l'autre, un simple test pratiqué sur le sérum d'un animal permettrait de statuer sur l'origine, artificielle ou naturelle, de son immunité. Or l'enjeu est d'importance, car mener de front des opérations de vaccination et d'éradication face à une enzootie deviendrait alors réalisable.

Enfin, il n'est pas possible de clore cette revue sur l'apport des biotechnologies, sans souligner à nouveau leur rôle considérable dans l'acquisition de connaissances fondamentales sur les agents pathogènes, préalable indispensable à tout progrès technologique en matière de diagnostic, d'épidémiologie ou de fabrication de vaccin.

REMERCIEMENTS

Je remercie A. Jestin, P. Desmettre et M. Eloit pour les informations qu'ils ont eu la gentillesse de me communiquer.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNON R., SELA M., 1985. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* **136 D**, 271.
- BAZIN H., 1987. *Le Point Vétérinaire*, **19**, 17.
- BERNARD S., LANTIER I., LAUDE H., AYNAUD J.M., 1986. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 2441.
- BLANCOU J., KIENY M.P., LATHE R., LECOCQ J.P., PASTORET P.P., SOULEBOT J.P., DESMETTRE P., 1986. *Nature*, **322**, 373.
- BONA C., 1987. *La Recherche*, **188**, 672.
- CARTER M.J., TER MEULEN V., 1984. *Advances in Virus Research*, **29**, 95.
- CERF A., DESMETTRE P., 1982. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **295**, 587.
- DAVIES J., 1987. *La Recherche*, **188**, 572.
- DELMAS B., GELFI J., LAUDE H. 1986. *J. gen. Virol.*, **67**, 1405.
- ELOIT M., FARGEAUD D., L'HARIDON R., TOMA B., 1987. Identification of a PRV GP50 glycoprotein as a major target of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* (soumis).
- HAASE A., BRAHIC M., STOWRING L., BLUM H. 1984. Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization. *In: Methods in Virology*, **7**, pp 189, Academic Press.
- HAMPL H., BEN-PORAT T., EHRLICHER L., HABERMEHL K.O., KAPLAN A.S., 1984. *J. Virol.*, **52**, 583.
- HU S., BRUSZEWSKI J., BOONE T., SOUZA, L., 1984. Cloning and expression of the surface glycoprotein gp195 of porcine transmissible gastroenteritis virus. In *Modern Approaches to Vaccines*, pp. 219. R.M. Chanock & R.A. Lerner eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New-York.
- JESTIN A., ONNO M., PRUDHOMME de SAINT MAUR G., BRICOUT F., NICOLAS J.C., 1987. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease virus infection in fattened pigs by direct fluorescent antibody technique in nasal cells. *Vet. Quarterly* (sous presse).
- KIT S., KIT M., PIRTLE E.C. 1985. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1359.
- KIT S., SHEPPARD M., ICHIMURA H., KIT M., 1987. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 780.
- KLEID D., YANSURA D., SMALL B., DOWBENKO D., MOORE D., GRUBMAN M., MAC KERCHER P., MORGAN D., ROBERTSON B., BACHRACH H., 1981. *Science*, **214**, 1125.
- LAUDE H., RASSCHAERT D., HUET J.C., 1987. *J. gen. Virol.*, **68**, 1687.
- LEFEVRE F. 1987. Thèse de doctorat de l'Université de Paris VII.
- LEFEVRE F., LA BONNARDIERE C., 1986. *J. Interferon Res.*, **6**, 349.
- MONTARAZ J.A., NOVOTNY P., IVANYI J., 1984. *Infect. Immun.*, **47**, 744.
- MOSS B., FLEXNER C., 1987. *Ann. Rev. Immunol.*, **5**, 305.
- ONNO M., 1987. Mémoire de fin d'études Inst. Sup. Prod. Anim.
- PEREIRA H.G., 1986. *Bioessays*, **4**, 110.
- QUILLIEN L., 1987. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes.
- RASSCHAERT D., LAUDE H., 1987. *J. gen. Virol.*, **68**, 1883.
- RZIHA H.J., METTENLEITER T.C., OHLINGER V., WITTMANN G., 1986. *Virology*, **155**, 600.
- ROWLANDS D., 1985. *La Recherche*, **162**, 94.
- SHOCKLEY L.J., KAPKE P.A., LAPPS W., BRIAN D.A., POTGIETER L.N.D., WOODS R., 1987. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1591.
- TAYLOR M.A., WISE K.S., McINTOSH M.A. 1985. *Infect. Immun.*, **47**, 827.
- TABARES E., 1987. *Archiv. Virol.*, **92**, 233.
- THOMSEN D.R., MARCHIOLI C.C., YANCEY Jr. R.J., POST L.E., 1987. *J. Virol.*, **61**, 229.
- TOULME J.J., 1987. *La Recherche*, **184**, 104.
- VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B.W.J., ZETSTRA T., 1987. Detection of transmissible gastroenteritis virus in faeces of pigs after experimental infection by a monoclonal antibody based ELISA and solid phase immunosorbent electron microscopy. *Vet. Microbiol.* (sous presse).
- VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA H.J., MOONEN P.J.L.M., POL J.M.A., VAN ZAANE D., 1986. *J. gen. Virol.*, **67**, 1179.
- WENSVOORT G., TERPSTRA C., BOONSTRA J., BLOEMRAAD M., VAN ZAANE D., 1986. *Vet. Microbiol.*, **11**, 1179.