

## Protection contre la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) par vaccins à ADN et protéines recombinantes

*Philippe BLANCHARD (1), Dominique MAHÉ (1), Roland CARIOLET (1), André KERANFLEC'H (1), Marie Agnès BAUDOUARD (2), Emmanuel ALBINA (1), André JESTIN (1).*

*(1) AFSSA – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Zoopôle les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan.*

*(2) LDA 22 – Laboratoire de Développement et d'Analyses, Zoopôle le Sabot, BP 54, 22440 Ploufragan.*

### **Protection contre la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) par vaccins à ADN et protéines recombinantes**

Le circovirus porcin de type 2 (PCV2) a été décrit comme jouant un rôle central dans l'étiologie de la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP), pathologie apparue en Bretagne en 1996 et affectant essentiellement les porcelets de 2 à 3 semaines d'âge. L'objectif de cette étude porte sur la mise au point d'un vaccin, issu du génie génétique. Les propriétés immunogènes des deux protéines majeures du circovirus porcin de type 2 (Orf1 codant pour la protéine de réplication et Orf2 codant pour la capsid virale) ont été évaluées chez le porc, via l'étude des paramètres de gain de poids, d'hyperthermie et d'absence de lésions. Dans un premier essai dit de prime boost, comprenant une injection d'ADN puis une seconde injection, 15 jours plus tard, d'ADN et de protéines recombinantes, la protéine de capsid s'est révélée être l'immunogène majeur. Dans un second essai, les performances du vaccin subunitaire, à base de protéines recombinantes, sont apparues supérieures à celles du vaccin ADN.

### **Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins**

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is known to be associated with Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), a recently described disease of young pigs. Since no PCV2 vaccine was available so far, we have developed a specific PCV2 vaccine candidate. The Orf1-encoded replication protein and Orf2-encoded capsid protein of PCV2 were expressed and detected in either mammalian or insect expression systems. In a first trial, Orf2 protein was found to be a major immunogen, inducing protection in a prime boost protocol. The piglets received a first injection with plasmids directing Orf2 protein and GM-CSF expression, followed by a second injection, a fortnight later, associated with baculovirus-expressed Orf2 protein. As evaluated by growth parameters, clinical signs (fever) and seroconversion, the pigs were protected against a PCV2 challenge after vaccination. In a second trial, protection induced by a subunit vaccine was even better than the one induced by DNA vaccine, since PCV2 replication was completely inhibited.

## INTRODUCTION

La maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP ou PMWS), apparue en 1996 dans les principaux bassins de production porcine en Europe et en Amérique du Nord (CLARK, 1996 ; SEGALÈS et al., 1997 ; ALLAN et al., 1998 ; MADEC et al., 2000), demeure actuellement un problème majeur. Dans les troupeaux sévèrement touchés, des mesures zootechniques de lutte ont été proposées sur la base des premières connaissances épidémiologiques de la maladie (MADEC et al., 1999). Elles visaient surtout à réduire la pression d'infection microbienne en renforçant l'hygiène et la conduite zootechnique de l'élevage et ont permis le plus souvent une réduction des pertes. Pour autant, ces mesures à elles seules n'ont pas toujours permis de retrouver une situation stable.

Le rôle déterminant du Circovirus Porcin de type 2 dans l'étiologie de la MAP a désormais été largement démontré (ELLIS et al., 1999 ; BALASCH et al., 1999 ; MAGAR et al., 2000 ; ALBINA et al., 2001 ; BOLIN et al., 2001). Une de nos approches en terme de prophylaxie a été de mettre au point un vaccin afin de pouvoir contrôler l'infection à circovirus porcine de type 2. Nos précédents travaux ont permis de développer un modèle expérimental (ALBINA et al., 2001), indispensable pour l'étude d'une protection induite par différents protocoles de vaccination.

Cette étude décrit deux protocoles de vaccination, basés sur l'utilisation de vaccins à ADN et de vaccins subunitaires (à base de protéines recombinantes produites en Baculovirus), en association ou non.

Nous avons précédemment démontré le rôle protecteur d'une vaccination à ADN dans le modèle Aujeszky (DUFOUR et al., 2000). De plus, les travaux de SOMASUNDARAM et al. (1999) ont permis d'accroître la réponse immunitaire suite à la co-administration d'une cytokine porcine de type GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor) agissant comme adjuvant naturel. Nous avons donc choisi cette approche dans notre protocole de vaccin à ADN.

Les propriétés antigéniques de la protéine de capsid virale du PCV2, produite dans le système Baculovirus, ayant été démontrées (MAHÉ et al., 2000 ; BLANCHARD et al., 2003), nous avons poursuivi notre étude sur les propriétés immunogènes de cette protéine dans une approche vaccinale.

L'efficacité de protection induite par la vaccination à ADN associée ou non à la vaccination subunitaire a été évaluée par les paramètres de croissance et de signes cliniques (fièvre ou symptômes), comparée aux résultats obtenus chez les porcs non vaccinés et éprouvés. Des études sérologiques et virologiques ont complété l'étude.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Production et caractérisation des préparations plasmidiques et protéiques

Les Orf1 et Orf2 du PCV2 codant pour la protéine de réplication et de capsid ont été clonés soit dans un vecteur

pcDNA3,1 pour l'expression en cellules de mammifères (pORF1 et pOrf2), soit dans un vecteur pVL 1393 pour l'expression en cellules d'insectes permettant l'obtention des baculovirus recombinants respectifs (BacOrf1 et BacOrf2).

Les plasmides pOrf1 et pOrf2, ainsi que le plasmide pGM-CSF, gène du granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor cloné en pcDNA3 et fourni par l'INRA de Jouy-en-Josas, ont été produits et purifiés sur colonne Qiagen (EndoFree plasmid Giga kit comlums). L'expression de ces protéines a été vérifiée et confirmée (SOMASUNDARAM et al., 1999, MAHÉ et al., 2000). La concentration ADN a été mesurée par spectrophotométrie.

Les cellules d'insectes Sf9 ont été infectées soit par le baculovirus sauvage AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*), soit par chacun des deux recombinants BacOrf1 et BacOrf2 à une multiplicité d'infection de 10 pfu (plaque-forming unit) par cellule. Après 72 heures d'infection, les cellules sont récoltées, lavées (PBS) puis resuspendues en PBS à une concentration de  $10^7$  cellules par ml. Les préparations protéiques ont été contrôlées sur Gel SDS-Page suivi d'un Western Blot révélé par un sérum anti-PCV2.

### 1.2. Protocole de vaccination

Les préparations vaccinales plasmidiques sont composées de 200 µg de chaque plasmide sous un volume total de 1 ml en PBS. Les préparations vaccinales protéiques sont préparées extemporanément : 500 µl d'extrait de protéines issus de chaque baculovirus recombinant (BacOrf1 et/ou BacOrf2) sont complétés à 1 ml en PBS, mélangés avec 1 ml d'adjuvant type Montanide (IMS 1313 PR fourni par Seppic), puis conservés sur glace jusqu'à leur utilisation.

Les expérimentations se sont déroulées dans les animaleries de l'Afssa, protégées par filtration absolue de l'air à l'entrée et à la sortie ; ces installations sont soumises à des règles de biosécurité très strictes (niveau P3). Les porcelets utilisés sont exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) et randomisés suivant leur poids et leur sexe (CARIOLET et al., 1994).

#### 1.2.1. Comparaison des propriétés immunogènes des deux protéines majeures du PCV2 (Orf1 et Orf2) dans le cadre d'une vaccination génique (ADN plasmidique) et protéique (à base de protéines recombinantes produites en Baculovirus) (essai N° 1)

35 porcelets EOPS âgés de 25 jours et répartis en 5 lots sont utilisés pour cet essai N°1. Les porcs font l'objet d'une vaccination génique à 25 jours et 39 jours d'âge, la seconde vaccination génique étant suivie d'une vaccination protéique. Les porcs sont ensuite éprouvés 10 jours plus tard, suivant le protocole décrit par ALBINA et al. (2001) pour le modèle expérimental, à savoir 5 ml par voie intratrachéale et 1 ml par voie intramusculaire d'un inoculum PCV2 titrant  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

La composition des préparations vaccinales des 5 lots de porcelets est représentée dans le tableau 1. Les porcelets font

**Tableau 1** - Composition des préparations vaccinales de l'essai N° 1, suivant les différents lots de porcelets et calendrier des vaccinations et épreuve PCV2.

Essai N°. 1 7 porcelets par lot	Injection 1 ADN 25 jours d'âge	Injection 2 ADN – Protéines recombinantes 39 jours d'âge	Challenge PCV2 49 jours d'âge
Lot Contrôle challenge (CC)	pcDNA3,1 – 200µg GM.CSF – 200µg	pcDNA3.1 – 200µg / GM.CSF – 200µg AcNPV / 10 <sup>7</sup> cellules avec Montanide	OUI
Lot Vaccin Orf1	Orf1/PCV2 - 200µg GM.CSF – 200µg	Orf1/PCV2 – 200µg / GM.CSF – 200µg Orf1/PCV2 - 5.10 <sup>6</sup> cellules avec Montanide	OUI
Lot Vaccin Orf2	Orf2/PCV2 - 200µg GM.CSF – 200µg	Orf2/PCV2 – 200µg / GM.CSF – 200µg Orf2/PCV2 – 5.10 <sup>6</sup> cellules avec Montanide	OUI
Lot Vaccin Orf1&Orf2	Orf1/PCV2 - 200µg Orf2/PCV2 - 200µg GM.CSF – 200µg	Orf1/PCV2 – 200µg / Orf2/PCV2 – 200µg GM.CSF – 200µg Orf1/PCV2 - 5.10 <sup>6</sup> cellules / Orf2/PCV2 – 5.10 <sup>6</sup> cellules Avec Montanide	OUI
Lot Contrôle (C)	Sans	Sans	NON

l'objet d'un suivi clinique pendant la période de vaccination puis 5 semaines après l'infection. Les paramètres d'hyperthermie (durée du pic thermique > 40,5°C) et de croissance des lots vaccinés (Gain de poids quotidien relatif, GMQR) ont été étudiés et comparés aux résultats obtenus pour le lot contrôle challenge (CC).

### 1.2.2. Comparaison de la protection induite par deux compositions vaccinales (Orf1&Orf2) issues soit du vaccin ADN, soit du vaccin subunitaire (essai N° 2)

Ce second essai a été conduit sur deux groupes d'animaux. Pour chaque groupe, 32 porcelets EOPS de 4 semaines d'âge sont répartis en 4 lots. Les vaccinations géniques ou protéiques sont réalisées à 4 et 6 semaines d'âge, l'épreuve PCV2 intervenant 11 jours après le rappel de vaccination.

La composition des préparations vaccinales des différents lots de porcelets est représentée dans le tableau 2.

Les porcelets du 1<sup>er</sup> groupe (lots CC1, ADN1, SU1 et C1) font l'objet d'un suivi clinique pendant 5 semaines post infection ; les paramètres d'hyperthermie (durée du pic thermique

> 40,5°C) et de croissance des lots vaccinés (Gain de poids quotidien relatif, GMQR) ont été étudiés et comparés aux résultats obtenus pour le lot contrôle challenge (CC1). A l'autopsie, des prélèvements d'organes (ganglions trachéobronchiques et amygdales) sont réalisés pour des analyses virologiques.

Dans le second groupe (lots CC2, ADN2, SU2, C2), 2 porcelets de chaque lot sont abattus et autopsiés à J4, J8, J14 et J17 post infection. Des prélèvements d'organes (amygdales, poumons, iléons, ganglions trachéobronchiques, mésentériques et inguinaux) sont effectués pour des analyses virologiques.

### 1.3. Analyses sérologiques et virologiques lors de l'essai N° 2

#### 1.3.1. Détection des anticorps spécifiques du PCV2 par un test ELISA (LPBE, Liquid Phase Blocking Elisa)

Les porcelets des lots CC1, ADN1, SU1 et C1 font l'objet d'un suivi sérologique PCV2 avant la vaccination et jusqu'à 4 semaines post infection. La sérologie PCV2 est réalisée

**Tableau 2** - Composition des préparations vaccinales de l'essai N° 2, suivant les différents lots de porcelets et calendrier des vaccinations et épreuve PCV2.

Essai N°. 2 8 porcelets par lot	Injection 1 28 jours d'âge	Injection 2 42 jours d'âge	Challenge PCV2 53 jours d'âge
Lots Contrôle challenge (CC1 and CC2)	sans	sans	OUI
Lots Vaccin ADN (ADN1 and ADN)	Orf1/PCV2 - 200µg Orf2/PCV2 - 200µg GM.CSF – 200µg	Orf1/PCV2 – 200µg Orf2/PCV2 – 200µg GM.CSF – 200µg	OUI
Lots Vaccin sub-unitaire (SU1 and SU2)	Orf1/PCV2 - 5.10 <sup>6</sup> cellules Orf2/PCV2 – 5.10 <sup>6</sup> cellules avec Montanide	Orf1/PCV2 - 5.10 <sup>6</sup> cellules Orf2/PCV2 – 5.10 <sup>6</sup> cellules avec Montanide	OUI
Lots Contrôle (C1 and C2)	sans	sans	NON

par le test ELISA LPBE développé par SALA et al. (2001). En effet, le test ELISA protéine développé par BLANCHARD et al. (2003) ne peut être utilisé dans cette configuration, ce test utilisant le même système d'expression que pour les préparations vaccinales protéiques (système Baculovirus), source de réactions croisées. Le test ELISA LPBE est basée sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux spécifiques du PCV2.

### 1.3.2. Détection par PCR du PCV2 dans les échantillons de tissus

L'ADN de chaque échantillon de tissus des 8 lots de porcelets est extrait sur colonne Qiagen (kit Dneasy tissue system) et soumis à une recherche du PCV2 par PCR, comme décrit précédemment par MAHÉ et al. (2000). Un contrôle interne de 428pb, destiné à mettre en évidence les fausses réactions négatives, est systématiquement ajouté à chaque réaction de PCR.

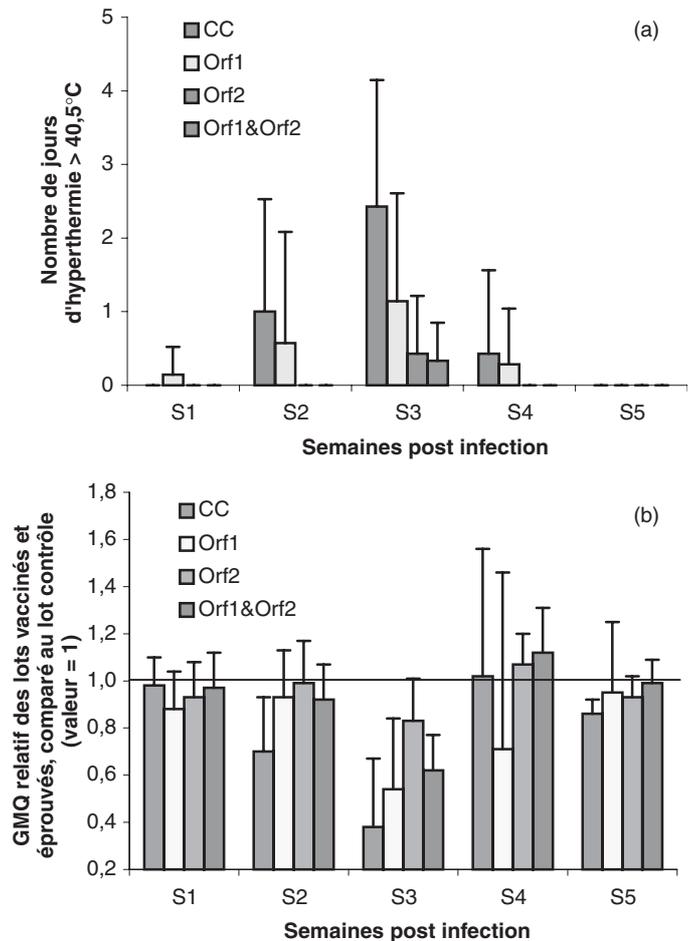
## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Identification de l'immunogène majeur du PCV2 dans l'approche d'une vaccination type prime-boost (essai N° 1)

Durant les trois semaines qui ont précédé l'infection (J25-J49), aucun symptôme particulier n'a été mis en évidence dans les 5 lots d'animaux. La comparaison des GMQ relatif (GMQR) entre les lots vaccinés et le lot contrôle n'a révélé aucune différence significative.

Après une période d'incubation de 10 à 14 jours suivant l'infection PCV2, tous les porcelets du lot contrôle challenge (CC) ont présenté une phase d'hyperthermie (> 40,5°C) et un retard de croissance. Le nombre de jours durant lesquels la température rectale a excédé 40,5°C et le gain de poids quotidien relatif au lot contrôle sont représentés dans la figure 1. Dans ce groupe, le pic d'hyperthermie et le retard de croissance ont été observés essentiellement durant la seconde semaine post infection (durée du pic thermique = 1 +/- 1,53 jours, GMQR = 0,70 +/- 0,23,  $p < 0,05$ ) et durant la troisième semaine post infection (durée du pic thermique = 2,43 +/- 1,72 jours et GMQR = 0,38 +/- 0,29,  $p < 0,01$ ), comparés au lot contrôle (C) où aucune hyperthermie > 40,5°C et retard de croissance n'ont été observés. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par ALBINA et al. (2001) lors du développement du modèle expérimental. De plus, plusieurs animaux ont présenté des symptômes cliniques tels que dyspnée, tremblements et ataxie dont un, très amaigri, sera euthanasié 4 semaines post infection.

Les lots vaccinés (Orf1, Orf2, Orf1&Orf2) ont présenté un pic thermique d'une durée plus courte que celle observée pour le lot CC (figure 1a). Dans le lot Orf1, la différence est significative durant la troisième semaine post infection ( $p < 0,05$ ) alors que les lots Orf2 et Orf1&Orf2 ont montré une différence significative durant la seconde ( $p < 0,01$ ) et la troisième semaine ( $p < 0,001$ ) post infection. Deux porcs de ces derniers lots ont présenté de l'hyperthermie contre quatre porcs du lot Orf1.



**Figure 1** - Nombre de jours d'hyperthermie > à 40,5°C (a) et Gain Moyen Quotidien relatif (GMQR) (b) des quatre lots vaccinés et éprouvés dans l'essai N° 1.

De la même façon, la croissance observée dans les lots vaccinés a été supérieure à celle observée dans le lot CC (figure 1b). Durant la seconde semaine post infection, les trois lots vaccinés ont présenté une différence significative, tandis que seuls les lots Orf2 et Orf1&Orf2 ont montré une différence significative durant la troisième semaine post infection ( $p < 0,01$  et  $< 0,05$ , respectivement).

Afin d'évaluer la protection clinique, nous avons déterminé un indice  $\Delta GS3$ , correspondant à la différence du GMQ (exprimé en gain de poids moyen quotidien pour 100 kg) pendant la troisième semaine post infection, entre les lots vaccinés et le lot contrôle challenge (tableau 3). Ces résultats ont montré une protection significativement plus efficace avec le vaccin de type Orf2, confirmant le rôle d'immunogène majeur de la protéine de capsid virale du PCV2.

### 2.2. Comparaison entre un vaccin ADN et un vaccin subunitaire (essai N° 2)

#### 2.2.1. Suivi clinique des lots de porcs du premier groupe (CC1, ADN1, SU1) pendant 5 semaines post infection

Durant les trois semaines qui ont précédé l'infection PCV2 (J28-J53), aucun symptôme particulier n'a été mis en évidence dans les différents lots d'animaux, excepté de l'hyperther-

**Tableau 3** - Protection clinique des lots vaccinés après infection PCV2 dans l'essai N° 1.

Lots de porcs	GMQ % kg 3 <sup>ème</sup> semaine pi	indice $\Delta$ DGS3	Symptômes cliniques MAP
Lot Contrôle challenge	0,9 +/- 0,69		Oui <sup>a</sup> (1)
Lot Vaccin Orf1	1,29 +/- 0,71	+ 0,39	Oui <sup>a</sup> (1)
Lot Vaccin Orf2	1,99 +/- 0,43 **	+ 1,09	Non
Lot Vaccin Orf1&Orf2	1,5 +/- 0,36 *	+ 0,6	Non

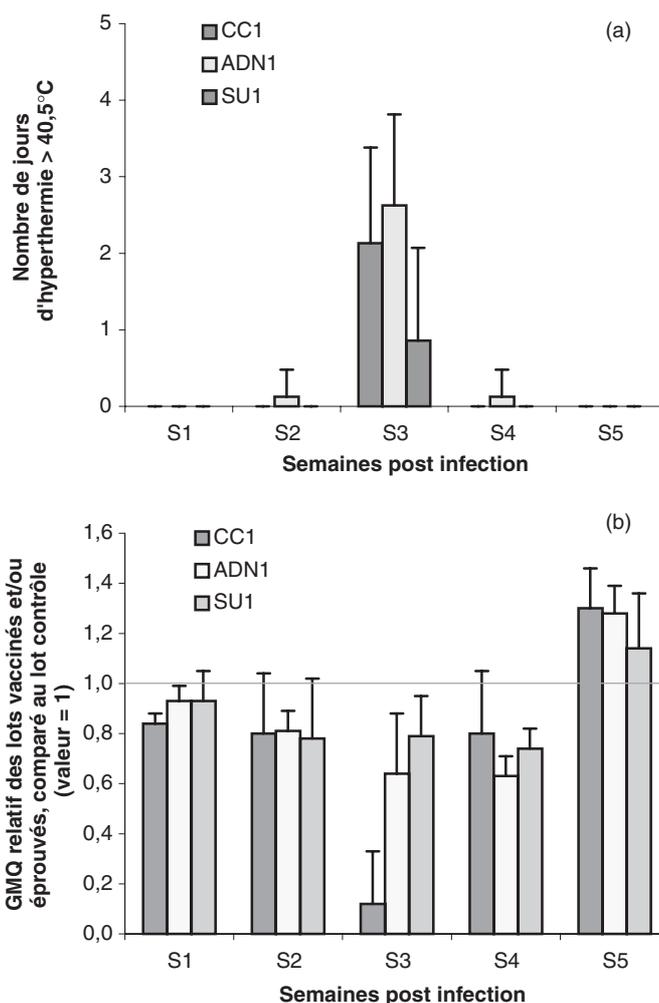
<sup>a</sup> Plusieurs animaux ont présenté des symptômes cliniques (1) – un porc amaigri a été euthanasié 4 semaines (lot CC) ou 5 semaines après infection (lot Orf1).

mie chez les porcelets vaccinés subunitaire sans conséquence sur leur croissance.

Comme lors du premier essai, tous les porcelets du lot CC1 ont présenté de l'hyperthermie > à 40,5°C ainsi qu'un retard de croissance, en accord avec le modèle expérimental. Le nombre de jours durant lesquels la température rectale a excédé 40,5°C et le gain de poids quotidien relatif au lot contrôle sont représentés dans la figure 2. Dans ce lot, le pic d'hyperthermie et le retard de croissance ont été observés essentiellement durant la troisième semaine post infection (durée du pic thermique = 2,13 +/- 1,25 jours, GMQR = 0,12 +/- 0,21, p<0,001), comparés au lot contrôle (C1) où aucune hyperthermie > 40,5°C et retard de croissance n'ont été observés. Cependant, les signes cliniques ont été peu prononcés durant cet essai (désordres digestifs). La différence d'expression clinique MAP des lots contrôle challenge des 2 essais ne peut être imputable à la seule vaccination placebo du premier essai. Des symptômes cliniques typiques de MAP ont en effet déjà été observés lors de nos précédents essais sans vaccination placebo (ALBINA et al., 2001).

Représenté en figure 2a, le lot vacciné ADN (ADN1) a présenté un pic thermique aussi important que le lot CC1 durant la troisième semaine post infection (2,63 +/- 1,19 jours) alors que le lot vacciné subunitaire (SU1) a présenté un pic thermique moins prononcé par rapport au lot CC1 (0,86 +/- 1,21 jours, p<0,05). La croissance des lots vaccinés (ADN1 et SU1), représentée en figure 2b et observée pendant la troisième semaine post infection, a été supérieure à celle observée pour le lot CC1, respectivement 0,64 +/- 0,24 et 0,79 +/- 0,16 (p<0,001).

L'indice  $\Delta$ G3, tel que déterminé pour le premier essai, a montré une protection clinique significativement plus efficace avec le vaccin ADN ou le vaccin subunitaire (tableau 4).



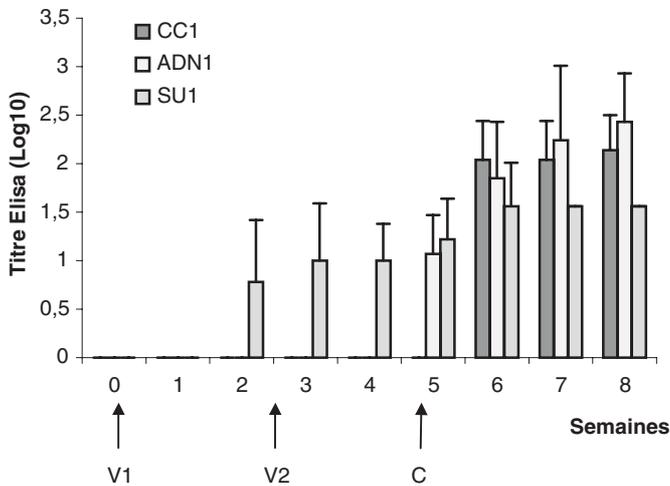
**Figure 2** - Nombre de jours d'hyperthermie > à 40,5°C (a) et Gain Moyen Quotidien relatif (GMQR) (b) des trois lots vaccinés et/ou éprouvés dans l'essai N° 2.

**Tableau 4** - Protection clinique des lots vaccinés après infection PCV2 dans l'essai N° 2.

Lots de porcs	GMQ % kg 3 <sup>ème</sup> semaine pi	indice $\Delta$ G3	Symptômes cliniques MAP
Lot Contrôle challenge	0,29 +/- 0,48		Peu <sup>a</sup>
Lot Vaccin ADN	1,49 +/- 0,52***	+ 1,20	Peu <sup>b</sup>
Lot Vaccin Subunitaire	1,83 +/- 0,38 ***	+ 1,54	Non

Peu d'animaux ont présenté des symptômes cliniques, seulement d'ordre digestif <sup>a</sup> ou de prostration <sup>b</sup>.

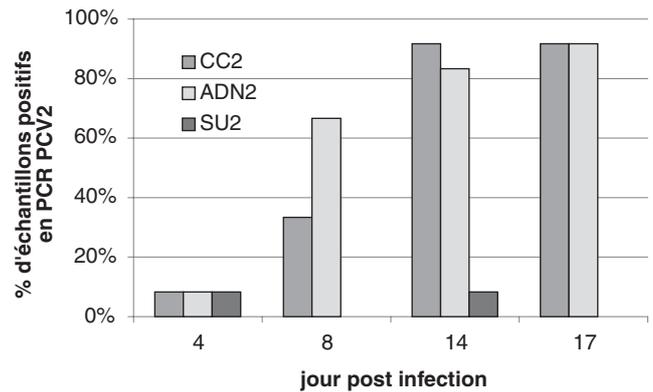
Afin d'étudier le profil de séroconversion des porcs avant et après l'épreuve PCV2, un test ELISA PCV2 (LPBE) a été réalisé tel que décrit par SALA et al. (2001), dont le seuil de détection a été estimé à 0,78 Log<sub>10</sub>. Tous les porcs du lot CC1 ont séroconverti deux semaines post infection (figure 3), profil similaire à celui obtenu avec notre test ELISA protéine dans nos essais précédents (BLANCHARD et al., 2003). Les porcs du lot ADN1 ont présenté une séroconversion une semaine post infection, tandis que des anticorps anti-PCV2 ont été détectés pour 5 porcelets du lot SU1, deux semaines après la première vaccination, et chez tous les porcs juste après le rappel. Après l'épreuve, les titres en anticorps anti-PCV2 du lot SU1 sont restés constants et légèrement inférieurs à ceux observés pour les lots ADN1 et CC1. Ces résultats montrent une meilleure réponse immunitaire du lot vaccinal subunitaire par rapport au lot vaccinal ADN.



**Figure 3** - Suivi sérologique par ELISA LPBE des lots vaccinés et/ou éprouvés de l'essai N°2

### 2.2.2. Cinétique d'abattage sur le second groupe de porcs (CC2, ADN2, SU2)

Deux porcs par lot ont été abattus à J4, J8, J14 et J17 post infection, et l'ADN extrait de six organes (amygdale, poumon, iléon, ganglions trachéobronchique, mésentérique et inguinal) a été soumis à une PCR PCV2. Les résultats obtenus sont synthétisés en figure 4. Au quatrième jour pi, le génome du PCV2 a été détecté dans un organe (ganglion trachéobronchique) d'un porc de chaque lot, le porc ADN2 présentant un signal plus intense. Au huitième jour pi, les deux porcs des lots CC2 et ADN2 ont révélé la présence du PCV2 (4/12 et 8/12 respectivement) alors qu'aucun signal n'a été détecté pour les porcs du lot SU2. A partir du quatorzième jour pi, tous les tissus d'organes des lots ADN2 et CC, excepté pour le poumon (seulement 3/8) ont révélé la présence du PCV2. Seul, un ganglion trachéobronchique du lot SU2 à J14pi a présenté un résultat faiblement positif. Aucun signal PCV2 n'a été détecté dans le lot C2. Ces résultats sont en faveur d'une neutralisation virale du lot vaccinal subunitaire comparés au lot vaccinal ADN, pour lequel la réplication virale semble avoir été amplifiée par rapport au lot contrôle challenge (CC2).



**Figure 4** - Détection du PCV2 par PCR dans les 3 lots de porcs de l'essai N°2 (CC2, ADN2, SU2)

## 3. DISCUSSION

La maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) demeure aujourd'hui une préoccupation majeure dans de nombreux pays producteurs de porcs (MADEC et al. 2000). Il est désormais bien établi que l'expression de la MAP est liée à la présence du PCV2 dans les élevages (ELLIS et al., 1999 ; BALASCH et al., 1999 ; ALBINA et al., 2001), sans négliger certains co-facteurs démontrés comme jouant un rôle important dans le développement de la pathologie (ALLAN et al., 2000 ; KENNEDY et al., 2000 ; KRAKOWKA et al., 2001). Bien que l'application des recommandations liées au management de l'élevage ait permis de réduire le taux de perte, la mortalité observée dans les élevages reste encore significative (MADEC et al. 2001).

Cette étude rapporte nos travaux en terme de prophylaxie, dans une approche vaccinale. Dans notre cas, les difficultés rencontrées dans la production et la purification du virus PCV2 nous ont conduits à élaborer plusieurs stratégies utilisant les apports de la biologie moléculaire et de l'ingénierie des protéines afin de mettre au point différentes préparations vaccinales. De nombreux travaux ont déjà démontré l'efficacité de vaccins à ADN (DUFOR et al., 2000) ou subunitaires, à base de protéines recombinantes produites en Baculovirus (KUNTZ-SIMON et al., 2002). Fort de notre modèle expérimental décrit par ALBINA et al. (2001) et de nos études menées sur la caractérisation antigénique des protéines majeures du PCV2 (MAHE et al., 2000), nous avons réalisé deux essais de vaccination afin d'évaluer la capacité de ces protéines à induire une protection contre une infection à PCV2.

Le premier essai a permis de comparer les propriétés immunogènes des deux protéines (Rep et capsid) du PCV2, dans une approche vaccinale dite de prime-boost. Le protocole, basé sur l'association d'un vaccin à ADN et d'un vaccin subunitaire, comprend deux injections intramusculaires pour le vaccin ADN (2 semaines d'intervalle) et une injection intramusculaire (lors du rappel ADN) pour le vaccin subunitaire. Le vaccin ADN est constitué des plasmides codant pour

l'un et/ou l'autre gène des deux protéines majeures du PCV2, associés à un plasmide codant pour le gène du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), cytokine porcine agissant comme adjuvant naturel (SOMASUNDARAM et al., 1999). Le vaccin subunitaire est constitué des protéines de réplication et/ou de capsid du PCV2 exprimées en Baculovirus, préparées avec un adjuvant de type Montanide (Seppic). L'efficacité de la protection induite par ces deux protéines, en association ou non, a été évaluée sur la base des paramètres d'hyperthermie et de croissance présentés par les porcs vaccinés placebo puis éprouvés (lot contrôle challenge), résultats par ailleurs en accord avec notre modèle expérimental. Dans cet essai, la vaccination a permis de réduire significativement la durée du pic thermique, de façon plus marquée pour les lots vaccinés Orf2 et Orf1&Orf2 que pour le lot vacciné Orf1. De plus, durant la troisième semaine post infection, seuls les lots Orf2 et Orf1&Orf2 ont montré un retard de croissance significativement moins important comparé au lot contrôle challenge. De même, durant cette période, aucune différence n'a été observée entre le lot Orf2 et le lot contrôle (non éprouvé), alors que le lot Orf1&Orf2 a montré une différence significative ( $p < 0,01$ ). Ces résultats sont confirmés par l'indice  $\Delta GS3$ , plus fort dans le lot Orf2 que dans le lot Orf1&Orf2 (1,09 contre 0,6). Bien qu'aucune différence entre ces deux lots n'ait été montrée, il semblerait que l'apport de l'Orf1 dans la composition vaccinale associée ait réduit l'efficacité de l'Orf2.

Nous avons ainsi démontré que la protéine de capsid du PCV2, utilisée dans un protocole vaccinal prime-boost, constitue l'immunogène majeur capable d'induire une protection des porcelets contre une infection à PCV2.

Dans notre second essai, nous avons comparé l'efficacité de la protection induite soit par le vaccin ADN, soit par le vaccin subunitaire. Indépendamment des résultats précédents, nous avons opté pour des préparations vaccinales à partir de l'association des deux protéines (Orf1&Orf2). Sur la base des résultats obtenus avec le lot contrôle challenge, nous avons observé une réduction significative de la durée du pic thermique par la vaccination subunitaire ( $p < 0,05$ ) pendant la troisième semaine post infection, alors que la vaccination ADN n'a permis aucune diminution de la durée du pic thermique (voire même une augmentation). Cependant, en terme de croissance, les deux lots vaccinés ont présenté des résultats significativement plus performants que le lot contrôle challenge ( $p < 0,001$ ), confirmés par les indices  $\Delta GS3$ , 1,20 pour le lot ADN et 1,54 pour le lot subunitaire. Bien que les indices  $\Delta GS3$  de l'essai N°2 soient plus élevés que ceux de l'essai N°1, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents lots (Orf2, Orf1&Orf2, ADN, SU). Dans un contexte de vaccins commerciaux conventionnels élaborés contre la maladie d'Aujeszky, l'indice  $\Delta G7$  minimum requis est de 1,5. Bien que ces deux pathologies soient peu comparables, l'indice  $\Delta GS3$  obtenu dans notre essai préfigure d'une protection performante dans le cadre d'un vaccin contre une épreuve PCV2.

Afin de compléter les résultats cliniques de l'essai N°2, nous avons dans un premier temps étudié la réponse immune des

porcelets à partir de la vaccination jusqu'à 4 semaines après infection (test ELISA LPBE). Nous avons ainsi observé une séroconversion précoce du lot vacciné subunitaire à partir du rappel vaccinal, plus tardive avec le lot vacciné ADN, une semaine après l'épreuve. Les titres en anticorps ont été plus élevés pour les lots ADN et contrôle challenge, tandis que le lot vacciné subunitaire a présenté un titre plus faible, suggérant l'absence de réplication virale et d'effet amplificateur après l'épreuve. La réponse immune du vaccin ADN, apparue une semaine plus tôt que celle obtenue avec le lot contrôle challenge, n'a cependant pas permis d'empêcher la réplication virale. En effet, l'évaluation de la dissémination virale du PCV2 par PCR a mis en évidence une forte réplication virale pour les porcs vaccinés ADN pendant les trois semaines qui ont suivi l'infection, comparable à celle observée pour les porcs non vaccinés et éprouvés. A l'inverse, les résultats PCR du lot vacciné subunitaire ont révélé une neutralisation significative du PCV2, en accord avec une réponse immunitaire précoce. Ces résultats obtenus avec le vaccin subunitaire sont en faveur d'une forte réponse humorale (Th2), induisant une neutralisation virale après épreuve, réduisant ainsi l'excrétion virale, alors que les résultats obtenus avec le vaccin ADN tendent à suggérer que la réplication virale serait favorisée par la réponse immune cellulaire (Th1). Les travaux précédents décrits par KRAKOWKA et al. (2001) ont démontré le rôle potentiel du système immunitaire sur le développement de la MAP, notamment par l'effet immunostimulant d'adjuvants. Nos résultats semblent ici montrer une modification de la réplication virale suivant l'approche vaccinale, laissant supposer une influence du type de réponse immune sur l'expression de la MAP.

Nous avons ainsi démontré le rôle essentiel de la protéine de capsid produite en Baculovirus dans une approche vaccinale contre une infection PCV2. Des essais complémentaires doivent être menés afin de définir le meilleur protocole de vaccination. D'autres essais de vaccination utilisant l'approche prime-boost (ADN + protéines) ont démontré l'efficacité de la réponse immune humorale et cellulaire (RUITENBERG et al., 2000). Sur la base de nos observations précédentes dans le modèle Aujeszky (DUFOUR et al., 2000) et de nos résultats obtenus lors de nos deux essais, nous pouvons prédire une bonne efficacité du vaccin étudié dans une approche prime-boost, induisant une immunité humorale et cellulaire.

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés grâce à la participation financière du FEDER (Fonds Européens de Développement et de Restructuration), du Comité Régional Porcin, de la Région Bretagne et de l'Union Européenne. Les auteurs remercient Bernard BEAUREPAIRE, Gérard BENEVENT (AFSSA22), Régis VINET (LDA22) pour leur collaboration technique et Stéphanie BOUGEARD (AFSSA22) pour l'analyse statistique. Les auteurs remercient également François LEFÈVRE et Chandra SOMASUNDARAM (INRA, Jouy en Josas) pour la fourniture du plasmide GM-CSF, Vincent GANNE (SEPPIC, France) pour la fourniture de l'adjuvant Montanide, Paolo CORDIOLI et Daniela BRESCIANI (IZSLER, BRESCIA, Italie) pour la réalisation de l'ELISA LPBE.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBINA E., TRUONG C., HUTET E., BLANCHARD P., CARIOLET R., L'HOSPITALIER R., MAHE D., ALLEE C., MORVAN H., AMENNA N., LE DIMNA M., MADEC F., JESTIN A., 2001. *J. Comp. Pathol.*, 125(4), 292-303.
- ALLAN GM., MCNEILLY F., KENNEDY S., DAFT B., CLARKE EG., ELLIS J.A., HAINES D.M., MEEHAN B.M., ADAIR B.M., 1998. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10, 3-10.
- ALLAN GM., MCNEILLY F., ELLIS J., KRAKOWKA S., MEEHAN B., MCNAIR I., WALKER I., KENNEDY S., 2000. *Arch. Virol.* 2000, 145, 2421-2429.
- BALASCH M., SEGALÉS J., ROSELL C., DOMINGO M., MANKERTZ A., URNIZA A. and PLANA-DURAN J., 1999. *J. Comp. Pathol.*, 121, 139-148.
- BLANCHARD PH., MAHÉ D., CARIOLET R., TRUONG C., LE DIMNA M., ARNAULD C., ROSE N., EVENO E., ALBINA E., MADEC F., JESTIN A., 2003. *Vet. Microbiol.*, 94/3, 183-194.
- BOLIN SR., STOFFREGEN WC., NAYAR GP., HAMEL AL., 2001. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 185-94.
- CARIOLET R., MARIE P., MOREAU G., ROBERT H., 1994. *Journées Recherche porcine en France*, 26, 1-12.
- CLARK EG: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners 1997*, 499-501.
- DUFOUR V., CHEVALLIER S., CARIOLET R., SOMASUNDARAM S., LEFEVRE F., JESTIN A., ALBINA E., 2000. *J. Interf. Cyt. Res.* , 20, 889-895.
- ELLIS J., KRAKOWKA S., LAIRMORE M., HAINES D., BRATANICH A., CLARK E., ALLAN G., KONOBY C., HASSARD L., MEEHAN B., MARTIN K., HARDING J., KENNEDY S., MCNEILLY F., 1999. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 3-14.
- KENNEDY S., MOFFETT D., MCNEILLY F., MEEHAN B., ELLIS J., KRAKOWKA S., ALLAN GM., 2000. *J. Comp. Pathol.*, 122, 9-24.
- KRAKOWKA S., ELLIS JA., MCNEILLY F., RINGLER S., RINGS DM., ALLAN G., 2001. *Vet. Pathol.*, 38, 31-42.
- KUNTZ-SIMON G., BLANCHARD P., CHERBONNEL M., JESTIN A., JESTIN V. 2002. *Vaccine*, 20, 3113.
- MADEC F., EVENO E., MORVAN P., HAMON L., ALBINA E., TRUONG C., HUTET E., CARIOLET R., JESTIN A., 1999. *Journées Recherche Porcine*, 31, 347-354.
- MADEC F., EVENO E., MORVAN P., HAMON P., BLANCHARD P., CARIOLET R., AMENNA N., MORVAN H., TRUONG C., MAHÉ D., ALBINA E., JESTIN A., 2000. *Livest. Prod. Sci.* 2000, 63, 223-233.
- MADEC F., ROSE N., EVENO E., MORVAN P., LAROUR G., JOLLY J., LE DIGUERHER G., CARIOLET R., LE DIMNA M., BLANCHARD P., JESTIN A., 2001. *Proceedings of ssDNA viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates*. Saint-malo, France.
- MAGAR R., LAROCHELLE R., THIBAUT S., LAMONTAGNE L., 2000. *J. Comp. Pathol.*, 123, 258-269.
- MAHE D., BLANCHARD P., TRUONG C., ARNAULD C., LE CANN P., CARIOLET R., MADEC F., ALBINA E., JESTIN A., 2000. *J. Gen. Virol.*, 81, 1815-1824.
- RUITENBERG KM., WALKER C., LOVE DN., WELLINGTON JE., WHALLEY JM, 2000. *Vaccine*, 18, 1367-1373.
- SALA G., RIGOLA S., ALBORATI GL., BROCCHI E., CORDIOLI P., 2001. *Proceedings 5<sup>th</sup> International Congress of Veterinary Virology*, Brescia, Italie.
- SEGALÉS J., SITJAR M., DOMINGO M., DEE S., DEL POZO M., NOVAL R., SACRISTAN C., DE LAS HERAS A., FERRO A., LATIMER K.S., 1997. *Vet. Rec.*, 141, 600-601.
- SOMASUNDARAM C., TAKAMATSU H., ANDREONI C., AUDONNET JC., FISCHER L., LEFEVRE F., CHARLEY B., 1999. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 70, 277-287.