

VACCINATION DES RENARDS CONTRE LA RAGE AVEC LE VIRUS  
RECOMBINANT VACCINE-RAGE

J. Blancou\*, P.P. Pastoret\*\*, B. Brochier\*\*, M.P. Kieny\*\*\*\*,  
Ph. Desmettre\*\*\* et M. Artois\*

\* Ministère de l' Agriculture, Direction Générale de l'Alimentation, Centre National d'Etudes sur la Rage et la Pathologie des Animaux Sauvages, B.P.9, 54220 Malzéville, France.

\*\* Chaire de Virologie-Immunologie et Pathologie des Maladies Virales, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg, B-1070 Bruxelles, Belgique.

\*\*\* Rhône-Mérieux, 254 rue Marcel Mérieux, 69342 Lyon, France.

\*\*\*\* TRANSGENE S.A., 11 Rue de Molsheim, 67085 Strasbourg Cedex, France.

RESUME

La vaccination par voie orale des animaux sauvages contre la rage n'a été réalisable, à ce jour, qu'en utilisant un vaccin "vivant" capable de se répliquer dans l'organisme pour compenser la faible quantité d'antigène rabique réellement ingérée. Ce vaccin est donc en général constitué par une souche de virus rabique atténué par passage in vivo, in ovo ou in vitro sur cellules hétérologues. Ce sont les virus dérivés de la souche SAD (ex. : FRA, Vnukovo, SAD/B19) qui se sont montrés les plus efficaces dans ce but.

Une autre approche développée depuis 1984, consiste à introduire un gène codant pour la glycoprotéine du virus rabique (ERA) dans celui du virus de la vaccine (souche "Copenhagen") en sorte que ce virus exprime cet antigène rabique immunogène lors de sa répllication.

Les résultats obtenus à ce jour sont extrêmement prometteurs chez plusieurs espèces animales dont le renard roux (*Vulpes vulpes*). C'est chez cette dernière espèce que les expérimentations ont été les plus développées tant en ce qui concerne l'innocuité, que l'efficacité de l'administration par différentes voies, et à différentes doses. Les essais réalisés sur plus de 150 sujets ont permis de conclure à l'innocuité de l'administration du recombinant par toutes les voies (y compris les voies oculaire et nasale), à l'absence de diffusibilité de la souche et à son efficacité pendant au moins 18 mois après une seule prise de 10<sup>7,2</sup> U.F.P.

Ce sont les essais de ce vaccin sur le terrain qui permettront de vérifier si ce recombinant peut constituer une alternative intéressante au vaccin SAD actuel.

INTRODUCTION

La vaccination par voie orale, contre quelque maladie que ce soit, a toujours été très difficile du fait de la dégradation des fractions antigéniques du vaccin au cours de leur passage dans l'estomac ou l'intestin. La vaccination antirabique est une des rares exceptions à cette règle du fait que le virus vaccin semble se répliquer dans la région oro-pharyngée. Cette vaccination est particulièrement efficace chez le Renard, à condition que ce dernier ingère une quantité suffisante de virus rabique "vivant". L'ingestion de virus inactivé n'entraîne qu'une production minime (ou nulle) d'anticorps. Les virus rabique vivants, à la fois immunogènes par voie orale et sans danger pour le Renard sont nombreux, généralement dérivés de souches déjà utilisées pour vacciner les animaux domestiques par voie orale : Flury, SAD, ERA, Vnukovo. Quelques-uns ont été développés dans le but précis de vacciner les renards : "Ts", "Av01", "Tag" (in Pépin et al., 1985). Mais

tous ces vaccins peuvent être l'objet d'une même critique : ils utilisent un virus rabique encore vivant. Ce dernier est obtenu soit par passage en série sur espèces (ou cellules) hétérologues, soit par sélection de mutants naturels, ou de mutants obtenus en présence d'anticorps monoclonaux. Quel que soit le vaccin choisi, une réversion vers la souche parentale originale, ou une déviation du pouvoir pathogène du virus vaccin vers une espèce non cible ("rage de laboratoire") ne peuvent être formellement exclues.

C'est la raison pour laquelle plusieurs équipes de recherche se sont orientées vers les techniques de génie génétique en vue d'obtenir un vaccin où ne serait retenue que la "sous-unité" antigénique du virus, la glycoprotéine rabique. D'abord étudiée aux USA (Wiktor et al., 1984) puis reprise et développée en Europe (Kieny et al., 1984), c'est la technique d'incorporation du gène de la glycoprotéine dans le virus de la vaccine qui s'est révélée la plus efficace lors des essais sur animaux sous le nom général de "recombinant vaccine-rage".

#### ETUDE EXPERIMENTALE DU VACCIN RECOMBINANT CHEZ LE RENARD

Le vaccin recombinant a été utilisé chez le Renard lors d'études expérimentales menées dans deux stations européennes, Nancy et Bruxelles, dans les conditions suivantes (Blancou et al., 1986) :

##### 1. Le vaccin recombinant vaccine-rage

Il a été obtenu, en 1984, des laboratoires Transcène à Strasbourg où il avait été construit selon le principe appliqué dès 1982 par Panicoli et Paoletti à l'insertion de divers gènes dans le virus de la vaccine (Brown et al., 1986). Des études similaires, ou antérieures, ont été également conduites dans les laboratoires du Wistar Institute à Philadelphie. Les exposés de J.P. Lecocq et M.P. Kieny donnent tous les détails de la construction du recombinant utilisé dans les essais européens. Plusieurs lots différents de vaccin recombinant ont été étudiés, utilisant tous la même glycoprotéine (extraite de la souche ERA) insérée dans la même souche du virus de la vaccine ("Copenhague") cultivée sur cellules "Vero" et titrée en unités formant places (UFP).

##### 2. Les renards

Tous les renards roux (Vulpes vulpes) utilisés dans les essais étaient des animaux sauvages mâles ou femelles capturés au terrier en zone indemne de rage. Au moment des essais ils étaient âgés de 9 à 12 mois.

##### 3. Evaluation de l'immunité conférée par le vaccin recombinant

L'immunité conférée par le vaccin recombinant a été évaluée par titrage des anticorps rabiques spécifiques selon la méthode de séroneutralisation sur souris (Kaplan et Koprowski, 1974) puis par épreuve directe des renards avec une souche sauvage de virus vulpin mortelle pour tout animal non vacciné à la dose utilisée (3000 DJ50 intracérébrale/souris).

Les résultats des essais réalisés depuis 1985 concernent l'innocuité de la vaccination, les conditions de l'immunisation et la cinétique de l'immunité conférée.

##### 4. L'innocuité du vaccin recombinant chez le Renard

Aucun des renards utilisés dans les essais n'a présenté de troubles locaux ou généraux après l'administration du virus recombinant, que cette administration soit réalisée par voie sous-cutanée, oculaire, nasale ou orale. Seule l'inoculation intradermique provoque une lésion locale bénigne qui rétrocède spontanément en 72 heures.

#### 5. Les conditions de l'immunisation du Renard par le recombinant

L'immunisation du Renard peut être obtenue après administration du recombinant par voie intradermique, sous-cutanée ou orale (tableau 1). La quantité de vaccin (mesurée en UFP) nécessaire pour immuniser les renards a été déterminée par voie orale (tableau 2) : elle doit être de 10 UFP au moins pour protéger 100% des animaux.

#### 6. Cinétique de l'immunité conférée au Renard par le recombinant

Elle a été déterminée chez des renards vaccinés par voie orale et éprouvés à intervalle régulier 1, 6, 12 et 18 mois après la vaccination (tableau 3).

#### EMPLOI DU VACCIN RECOMBINANT SUR LE TERRAIN

Les résultats précédents indiquent que le vaccin recombinant présente des caractères d'innocuité et d'efficacité égaux, voire supérieurs à ceux du vaccin SAD actuellement utilisé en Europe chez le Renard.

En ce qui concerne les autres espèces animales non cibles des essais très complets ont été réalisés, et sont encore en cours, en Belgique, au Canada, en France et aux USA (voir exposé de B. Brochier). Ils ont confirmé que le recombinant était inoffensif pour ces espèces, et qu'il pouvait également protéger correctement certaines d'entre elles jusqu'ici impossibles à immuniser avec le vaccin SAD (ex. mouffette américaine). La décision d'utiliser le vaccin recombinant comme alternative aux vaccins SAD actuels dépendra des conclusions définitives de tous ces essais en station, et de celles d'essais limités qui pourraient être réalisés sur le terrain en zones protégées dans les conditions recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (Anonyme, 1985).

Voies d'administration (dose de virus)	Résultat de l'épreuve par 9000 DL50/IM/Renard (Nombre d'animaux survivants/évalués)
intradermique (10 <sup>8</sup> UFP)	2/2
sous-cutanée (10 <sup>8</sup> UFP)	2/2
(10 <sup>4</sup> UFP)	1/4
orale (10 <sup>6</sup> UFP)	2/4
directe (10 <sup>8</sup> UFP)	8/8
orale en appât (10 <sup>8</sup> UFP)	4/5
Néant (Témoins)	0/6

**TABEAU 1** : Etude de l'immunité conférée par le vaccin recombinant administré par différentes voies au Renard.

Quantité de virus administrée	Résultats de l'épreuve par 9000 DL50/IM/Renard (Nombre d'animaux survivants/évalués)
10 <sup>6</sup> UFP	8/10
10 <sup>7</sup> UFP	10/10
10 <sup>8</sup> UFP	10/10
Néant (témoins)	0/10

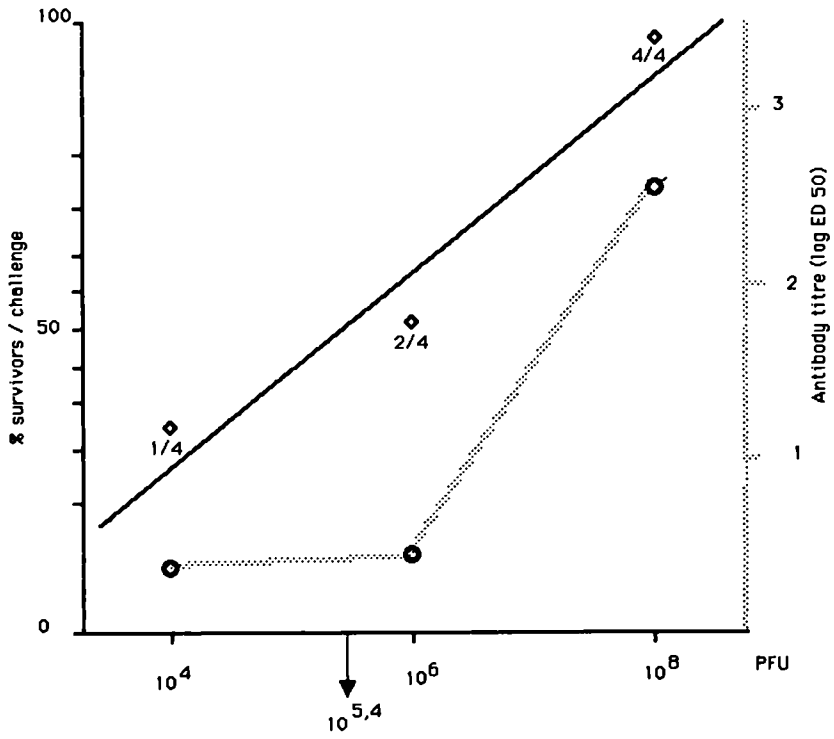
**TABEAU 2** : Etude de la relation entre la dose de vaccin recombinant administrée par voie orale et le taux de protection conféré au Renard.

Délai entre la vaccination et l'épreuve	Résultats de l'épreuve par 9000 DL50/IM/Renard (Nombre d'animaux survivants/évalués)
1 mois	4/4
6 mois	4/4
18 mois	4/4
Néant (témoins) contact avec les vaccinés	0/2
sans contact avec les vaccinés	0/2

**TABEAU 3** : Durée de l'immunité conférée au Renard par administration orale de 10<sup>7,2</sup> UFP de vaccin recombinant.

FIGURE 1

Antibody titre and resistance to challenge  
of foxes vaccinated with recombinant



#### REFERENCES

- Anonyme, 1985. Des formes recombinantes du virus de la vaccine utilisées comme vecteurs viraux vivants pour des antigènes vaccinaux. Memorandum d'une réunion OMS/USPHS/NIBSC. Bull. O.M.S., 63, 681-688.
- Blancou, J., Kieny, M.P., Lathe R., Lecocq, J.P., Pastoret, P.P., Soulebot, J.P. and Desmettre, P. 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. Nature, 322, 373-375.
- Brown, F., Schild, G.C. and Ada, G.L. 1986. Recombinant vaccinia viruses as vaccines. Nature, 319, 549--550.
- Kaplan, M.M. et Koprowski, H. 1974. La rage. Techniques de laboratoire, 3è ed. (Organisation Mondiale de la Santé, Genève). 379 p.
- Kieny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H. and Lecocq, J.P. 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, 312, 163-166.
- Pépin, M., Blancou, J., Aubert, M.F.A., Barrat, J., Coulon, p. and Flamand, A. 1985. Oral immunization against rabies with an avirulent mutant of the CVS strain : evaluation of its efficacy in fox (Vulpes vulpes) and its infectivity in seven other species. Ann. Inst. Pasteur/Virol., 136E, 65-73.
- Wiktor, T.J., McFarlan, K.J., Reagan, K.J., Dietzschold, B., Curtis, P.J., Wunner, W.H., Kieny, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Mackett M., Moss B. and Koprowski, H. 1984. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 7194-7198.