

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2014

THESES 2014 / TOU3 / 2059

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Christelle Merlo

**Utilisation des adjuvants dans les vaccins : état
des lieux et actualités**

Le 4 juillet 2014

Directeur de thèse : Pasquier Christophe

JURY

Président : Pasquier Christophe
1er assesseur : Benoist Hervé
2ème assesseur : Ducros Marie

REMERCIEMENTS

A chacun des membres de mon jury de thèse

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury de me faire l'honneur de juger mon travail et d'être présents pour cette soutenance. Merci pour leur intérêt et leur expertise.

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier,

Professeur de virologie-bactériologie, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Virologiste au CHU de Toulouse,

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse et de présider ce jury, je vous remercie vivement de m'avoir accordé votre disponibilité, votre confiance dans la réalisation cette thèse ainsi que pour tous vos conseils qui m'ont été précieux.

A Monsieur le Professeur Hervé Benoist,

Professeur d'immunologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques

C'est un honneur que vous me faites de faire partie de ce jury. Merci pour votre disponibilité et pour toutes ces années d'enseignement de l'immunologie qui m'ont particulièrement intéressé.

A Madame Marie Ducros,

Docteur en Pharmacie

Merci d'avoir accepté sans réserve de rejoindre ce jury. Je te remercie de l'intérêt que tu as bien voulu porter à ce travail et de l'honneur que tu me fais en acceptant d'être mon juge.

A ma famille

A mes parents,

Merci pour votre soutien à toute épreuve et votre confiance indéfectible pendant toutes ces années et encore aujourd'hui.

A mon frère,

Merci d'avoir toujours été présent pour moi. Je suis fière d'être ta sœur.

Bienvenue Mathilde !

A toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines,

Merci pour votre aide et accueil dans tous mes changements de villes dans le cadre de mes études !

C'est toujours un plaisir de se retrouver, et j'espère que les occasions de se réunir resteront multiples.

A mes amis,

Carcassonnais, Toulousains, Lyonnais, Bruxellois et Singapouriens, merci pour votre amitié, je suis heureuse de vous avoir rencontré.

A toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement à ce travail

Je suis reconnaissante de votre aide à l'accomplissement de ce travail.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 1 |
| Liste des figures | 6 |
| Liste des tableaux | 7 |
| Liste des abréviations..... | 8 |
| Introduction | 10 |
| Chapitre 1 : Les vaccins..... | 11 |
| 1 Bases immunologiques de la vaccination..... | 12 |
| 1.1 Généralités | 12 |
| 1.2 Fonctionnement | 12 |
| 1.3 Mécanismes de l'immunisation | 16 |
| 2 Histoire du développement des vaccins | 19 |
| 2.1 Les premières découvertes..... | 19 |
| 2.2 Le 20 ^e siècle..... | 19 |
| 3 La vaccination | 21 |
| 3.1 Principes | 21 |
| 3.2 Objectifs..... | 21 |
| 4 Mécanismes de la vaccination..... | 22 |
| 5 Les différents types de vaccins..... | 23 |
| 5.1 Les vaccins à agents vivants atténués..... | 23 |
| 5.2 Vaccins à agents inactivés | 23 |
| 5.3 Vaccins recombinants..... | 25 |
| 5.4 Conclusion | 25 |
| 6 Nouvelles stratégies vaccinales | 27 |
| 6.1 Les vaccins à ADN | 27 |
| 6.2 Vaccins à agents vivants recombinés | 28 |
| 6.3 Pseudo particules virales ou « Virus-Like Particles » | 28 |
| 6.4 Stratégie combinée : les plasmovLP..... | 29 |
| 6.5 Ciblage des antigènes vers les cellules dendritiques | 30 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 6.6 | Vaccins cellulaires | 30 |
| 7 | Défis des vaccins « modernes » | 31 |
| 7.1 | Défi des pathogènes complexes..... | 31 |
| 7.2 | Défi des populations cibles..... | 32 |
| 8 | Conclusion..... | 34 |
| Chapitre 2 : Utilisation des adjuvants dans les vaccins | | 35 |
| 1 | Les adjuvants..... | 36 |
| 1.1 | Définition..... | 36 |
| 1.2 | Histoire du développement des adjuvants | 37 |
| 1.3 | Modes de classification | 38 |
| 1.4 | Stratégies de développement | 43 |
| 1.5 | Succès et limites dans le développement de nouveaux adjuvants | 44 |
| 1.6 | Conclusion | 46 |
| 2 | Mécanismes d'actions | 47 |
| 2.1 | Considérations générales | 47 |
| 2.2 | Adjuvants cibles de l'immunité innée | 49 |
| 2.3 | Adjuvants cibles de l'immunité adaptative | 51 |
| 3 | Formulation des adjuvants | 53 |
| 4 | Tolérance des adjuvants | 54 |
| 4.1 | Principaux enjeux | 54 |
| 4.2 | Discussion générale sur l'innocuité des adjuvants | 54 |
| 4.3 | Efficacité versus sécurité..... | 55 |
| 4.4 | Profil d'effets indésirables des adjuvants | 55 |
| 4.5 | Impact de la voie d'administration | 61 |
| 5 | Profil des principaux adjuvants utilisés sur le marché | 63 |
| | Introduction | 63 |
| 5.1 | Sels d'aluminium..... | 64 |
| 5.2 | Le MF59 | 71 |
| 5.3 | Les systèmes adjuvants (AS)..... | 75 |
| 5.4 | Liposomes / Virosomes | 80 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 3 : Environnement Réglementaire des adjuvants | 83 |
| Introduction | 84 |
| 1 Cadre réglementaire des adjuvants..... | 85 |
| 1.1 Contraintes réglementaires et freins au développement | 85 |
| 1.2 Accès aux adjuvants : Initiatives Internationales | 86 |
| 1.3 Les acteurs de la réglementation des adjuvants..... | 87 |
| 2 Enregistrement des vaccins adjuvantés en Europe..... | 92 |
| 2.1 Format du dossier de soumission..... | 92 |
| 2.2 Rappel sur les procédures d'enregistrement en Europe..... | 94 |
| 3 Évaluation réglementaire scientifique des nouveaux adjuvants..... | 96 |
| 3.1 Evaluation de la qualité | 96 |
| 3.2 Evaluation de la sécurité..... | 99 |
| 3.3 Evaluation de l'efficacité..... | 102 |
| 3.4 Suivi post-commercialisation | 104 |
| 4 Controverses sur les adjuvants | 105 |
| Conclusion générale | 107 |
| Bibliographie..... | 108 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Résumé des réactions immunitaires (3)..... | 18 |
| Figure 2 : Classification des vaccins suivant leur composition | 26 |
| Figure 3 : le développement des adjuvants (24)..... | 38 |
| Figure 4 : Classification des adjuvants suivant leur mécanisme d'action (23) | 39 |
| Figure 5 : Représentation des différentes cibles des adjuvants (14) | 48 |
| Figure 6 : Représentation des TLR et de leurs ligands (25)..... | 50 |
| Figure 7 : Représentation des évènements immunotoxiques qui peuvent apparaître après l'utilisation d'adjuvants (34) | 56 |
| Figure 8 : Micrographie de l'hydroxyde d'aluminium obtenue par microscopie électronique à transmission (x 100 000) (45) | 66 |
| Figure 9 : Micrographie du phosphate d'aluminium obtenue par microscopie électronique à transmission (x 100 000) (45) | 66 |
| Figure 10 : Structure des émulsions (53) | 72 |
| Figure 11 : Structure du MF59 (53) | 73 |
| Figure 12 : Structure du MPL (47)..... | 76 |
| Figure 13 : Structure de l'AS03 (53)..... | 78 |
| Figure 14 : Structure d'un virosome (53)..... | 81 |
| Figure 15 : Représentation schématique de la composition du dossier CTD..... | 93 |
| Figure 16 : Evolution d'un programme d'immunisation en fonction de la perception de sa tolérance (101)..... | 106 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Formulations des adjuvants décrits dans la littérature [(26), (27)] | 40 |
| Tableau 2 : Caractéristiques optimales d'un adjuvant candidat | 45 |
| Tableau 3 : Exemple de mécanismes d'action des principaux adjuvants (26)..... | 52 |
| Tableau 4 : Réactions locales et systémiques induite par certains adjuvants..... | 60 |
| Tableau 5 : Principaux adjuvants utilisés dans les vaccins | 63 |
| Tableau 6 : Sels d'aluminium utilisés dans les vaccins | 64 |

LISTE DES ABREVIATION

| | |
|--------|---|
| ACF | Adjuvant Complet de Freund |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| Ag | Antigène |
| AMM | Autorisation de Mise sur le Marché |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| AS | Système Adjuvant |
| BPC | Bonnes Pratiques Cliniques |
| BPF | Bonnes Pratiques de Fabrication |
| BPL | Bonnes Pratiques de Laboratoire |
| CBER | Centre for Biologics Evaluation and Research |
| CD | Cellule Dendritique |
| CHMP | Committee for Medicinal Products for Human Use |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CPA | Cellule Présentatrice de l' Antigène |
| CPMP | Committee for Proprietary Medicinal Product |
| CTD | Common Technical Document |
| DAMP | Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires |
| DCP | Procédure Décentralisée |
| EMA | European Medicine Agency |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HPV | Papillomavirus Humain |
| HSV | Herpès Simplex Virus |
| ICH | International Conference on Harmonisation |
| IFN | Interféron |
| IL | Interleukine |
| ISCOM | Immune Stimulating Complexes |
| LB | Lymphocyte B |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LT | Lymphocyte T |
| MDP | Muramyl dipeptide |
| MPL | Monophosphoryl Lipide A |
| MRP | Procédure de Reconnaissance Mutuelle |
| MTP-PE | Muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine |
| NK | Natural Killer |
| NLR | Recepteur Nod Like |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PAMPs | Motifs moléculaires associés aux pathogènes |
| PASS | Post-authorization safety studies |

| | |
|-----|-------------------------------------|
| PE | Pharmacopée Européenne |
| PIP | Plan d'Investigation Pédiatrique |
| PLG | Acide polyglycolique |
| PRR | Pattern Recognition Receptor |
| Th | Lymphocyte T helper |
| TB | Tuberculose |
| TLR | Récepteurs Toll-Like |
| TNF | Facteur de nécrose tumorale |
| VHA | Virus de l'Hépatite A |
| VHB | Virus de l'Hépatite B |
| VHC | Virus de l'Hépatite C |
| VIH | Virus de l'Immunodéficience Humaine |
| VLP | Virus Like Particule |

INTRODUCTION

L'objectif de la vaccination est double, elle doit permettre :

- d'induire une réponse immunitaire spécifique à un agent pathogène permettant de protéger un individu contre l'infection ou la maladie causée par ce pathogène (protection individuelle) ;
- de réduire l'incidence d'une maladie dans une population dans le cadre de programmes de vaccinations. Dans certains cas les programmes de vaccination aboutissent à l'éradication d'une maladie.

Le développement de nouvelles stratégies vaccinales rencontre de nombreuses difficultés liées à la faible immunogénicité de certains antigènes ou aux problèmes d'immunité de certaines populations cibles. Ainsi, les stratégies adjuvantes dans les vaccins modernes tiennent une place de plus en plus importante et des réglementations toujours plus exigeantes encadrent le développement et la commercialisation des vaccins pour en assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité.

La possibilité d'amélioration de la réponse immunitaire à un antigène par l'addition des adjuvants dans la formulation des vaccins a été démontrée il y a presque 100 ans avec les sels d'aluminiums et est depuis lors utilisée. Bien qu'un grand nombre de candidats aient été proposés, leur toxicité est le facteur principal qui a limité leur utilisation. Les sels d'aluminium demeurent les adjuvants les plus largement autorisés sur le marché mondial mais leur utilisation reste limitée. D'autres adjuvants, tel que les émulsions, le MPL, le MF59 et les systèmes adjuvants ont été développés, en revanche leur utilisation n'est pas encore aussi largement répandue.

L'objectif de ce travail est de dresser un état des lieux des adjuvants actuellement utilisés dans les vaccins et de mettre en avant l'évolution des nouveaux composés ainsi que leurs impacts sur les réglementations.

CHAPITRE 1 : LES VACCINS

1 BASES IMMUNOLOGIQUES DE LA VACCINATION

1.1 Généralités

Le système immunitaire a pour rôle de lutter contre les agressions extérieures subies par l'organisme en cas d'invasion par des agents infectieux, dont les virus, bactéries, parasites et, champignons. Il est constitué d'un réseau de cellules, de tissus et d'organes spécifiques qui défendent l'organisme (1).

Les organes du système immunitaire sont :

- les organes lymphoïdes primaires qui sont le lieu de maturation des lymphocytes : la moelle osseuse et le thymus ;
- les organes lymphoïdes secondaires qui sont peuplés des cellules issues des organes lymphoïdes primaires et où se produisent les différentes coopérations cellulaires aboutissant à une réponse immunitaire spécifique : la rate et les ganglions lymphatiques.

1.2 Fonctionnement

La surface de l'organisme est protégée des agressions extérieures par un ensemble de dispositifs interconnectés, incluant des mécanismes non-immunologiques et les réponses immunologiques non spécifiques et spécifiques.

Il existe deux grands systèmes immunitaires :

- Le système immunitaire inné ou immédiat qui est non spécifique ;
- Le système immunitaire adaptatif acquis qui est spécifique de l'agresseur et qui se met en place plus tardivement.

Ces deux systèmes sont liés et collaborent ensemble lors d'une agression

1.2.1 Les mécanismes non-immunologiques

1.2.1.1 Les barrières anatomiques

Il s'agit du revêtement cutanéomuqueux qui assure des fonctions d'échange et de protection vis-à-vis du monde extérieur. L'épithélium type Malpighien, tel que la peau et les muqueuses, constitue une première barrière très efficace contre la pénétration des microorganismes.

1.2.1.2 Les barrières physiologiques non immunes

Les glandes exocrines ou les cellules des surfaces épithéliales (épiderme, tube digestif, appareil respiratoire, tractus urogénital, surface conjonctival) sont capables de produire une sécrétion, empêchent l'adhésion des microorganismes et contiennent des molécules microbicides. Ainsi, sébum, larmes, salive, mucus pulmonaire et intestinal, participent à la défense de l'organisme.

D'autres mécanismes participent également à la protection de la surface de l'organisme : l'acidité, le mouvement des fluides (salivation, péristaltisme intestinal, miction, expectoration, vomissement, diarrhée...), la présence de molécules microbicides dans les sécrétions de surface (lysozymes, interférons, enzymes protéolytiques, anticorps...), ainsi que la flore bactérienne commensale (microorganismes produisant des molécules acides et peroxydes qui s'opposent à l'implantation des pathogènes).

1.2.1.3 La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire fait partie de la défense de l'organisme. Il s'agit d'une réaction cellulaire et moléculaire complexe et a pour conséquence l'isolement de la zone agressée du reste de l'organisme, l'élimination de l'agresseur et la réparation de la zone lésée. Cette réaction fait intervenir des cellules n'appartenant pas au système immunitaire (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, mastocytes...) et les cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, polynucléaires, lymphocytes). La réponse inflammatoire peut être modulée par le système immunitaire et réciproquement.

1.2.2 Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné se compose de molécules et de cellules qui distinguent les cellules de l'hôte de celles d'agents pathogènes, en partie par la reconnaissance de motifs conservés chez le microorganisme appelé en termes scientifiques internationaux les PAMPs (Pathogen associated Molecular Patterns) grâce à des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) (1).

La principale famille de récepteurs capable de reconnaître des structures moléculaires endogènes et propres aux microorganismes est représentée par les récepteurs Toll-Like (TLR). Il existe 11 différents récepteurs chez l'homme capable de reconnaître plusieurs PAMPs chacun, déclenchant lorsqu'ils sont activés une réponse inflammatoire.

1.2.2.1 Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont une place majeure dans ce système, leurs principaux rôles sont :

- Un rôle de défense immédiat fondé sur la libération de cytokines proinflammatoires, de chimiokines et d'éléments moléculaires susceptibles de participer au mécanisme de défense ;
- Un rôle de présentation de l'antigène lui permettant d'interagir avec le système immunitaire adaptatif en présentant l'antigène via les Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), formant un complexe CMH-peptide reconnu par les lymphocytes T ;
- Un rôle d'instruction en fonction des interactions avec les cytokines (IL-12, IL-4, IL-23 et le microenvironnement, on influence différemment le système immunitaire vers la voie Th1 (activation de la voie cellulaire avec les LT CD8+ cytotoxique), Th2 (aide à la production d'anticorps).

1.2.2.2 Les mécanismes non spécifiques

Les mécanismes immunologiques non spécifiques fournissent une réponse immédiatement recrutée, dans les heures qui suivent l'exposition, en attendant que l'immunité acquise devienne opérationnelle.

L'immunité innée repose sur des mécanismes humoraux, tel que :

- L'activation du système complémentaire ;
- La production de cytokines dont certaines sont pro-inflammatoires et/ou antimicrobiennes (exemple du lysozyme produit par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages qui a une activité antivirale et antibactérienne).

Et des mécanismes cellulaires, tel que :

- L'endocytose, fonction que possède toute cellule, qui consiste en l'internalisation par invagination membranaire d'éléments du milieu extracellulaire. La phagocytose est une spécialisation de l'endocytose qui est assurée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles ;
- La cytotoxicité à médiation cellulaire qui est la capacité que possèdent certaines cellules (monocytes, lymphocytes, lymphocytes NK (Natural Killer),...) de tuer d'autres cellules (infectées, tumorales).

L'activation de l'immunité innée constitue la réponse inflammatoire.

1.2.3 Le système immunitaire acquis

La réponse immunitaire spécifique apparaît plus tardivement et est spécifique d'un pathogène.

Les principales cellules impliquées dans cette réponse sont les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et les lymphocytes :

- Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale et sont capable de reconnaître les épitopes dans leur forme native.
- Les lymphocytes T sont eux responsables de l'immunité cellulaire et reconnaissent les épitopes sous forme de peptides s'ils sont présentés par des molécules du CMH.
- Trois types de cellules ont constitutionnellement des propriétés de présentation de l'antigène: les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

Cette réponse immunitaire renforce la réponse inflammatoire et l'efficacité du système immunitaire inné. Elle participe directement à l'élimination des agresseurs par la production d'anticorps capable de reconnaître un nombre pratiquement illimité de cibles différentes, efficace seulement 2 à 4 jours après le premier contact avec un micro-organisme particulier. Toutefois, cette immunité est dirigée spécifiquement contre le microorganisme et persiste ensuite sous forme d'une mémoire immunitaire qui assurera une protection rapide lors d'une exposition ultérieure au même agent infectieux (1).

Ainsi, le système immunitaire acquis augmente :

- La réponse inflammatoire ;
- L'efficacité du système du complément (mécanismes de défense contre les infections, il intervient dans la destruction des agents infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, ainsi que dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques) ;
- L'efficacité de la phagocytose (opsonisation par les anticorps, activation des phagocytes par les cytokines) ;
- L'efficacité de la cytotoxicité à médiation cellulaire.

Ces propriétés constituent la base de l'effet protecteur d'une vaccination. La plupart des mécanismes qui éliminent les organismes infectieux sont fournis par le système immunitaire inné : ils peuvent être mis en œuvre directement, par la reconnaissance de l'agent pathogène par le système immunitaire inné.

1.3 Mécanismes de l'immunisation

Lorsqu'un agent pathogène réussit à déjouer les défenses naturelles non spécifiques décrites ci-dessus (les barrières cutanées ou muqueuses, les mécanismes de phagocytose), le système immunitaire entre en action.

La réponse immunitaire est le résultat de la première rencontre entre les lymphocytes naïfs et l'antigène. La réponse secondaire se produit lors d'expositions ultérieures avec le même antigène. Cette réponse est plus rapide, plus ample et plus durable, donc plus importante et plus efficace pour éliminer l'antigène. Cette réponse secondaire résulte de l'activation des lymphocytes mémoires qui sont eux induits lors de la réponse primaire. La mémoire concerne les lymphocytes B et T, et permet d'optimiser la capacité du système immunitaire à combattre les infections persistantes et récurrentes.

Les cellules présentatrices de l'antigène permettent aux antigènes de former un complexe avec des glycoprotéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présent à la surface des macrophages. Ce complexe pourra être capté par un lymphocyte possédant un récepteur spécifique. A la suite de cette liaison, pourra s'en suivre (2) :

- Dans le cas de l'activation d'un lymphocyte B, les lymphocytes effecteurs deviennent des plasmocytes sécrétant des anticorps spécifiques visant la destruction de l'antigène ;
- Dans le cas de l'activation d'un lymphocyte T, les lymphocytes effecteurs seront de 2 catégories :
 - o Des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) qui détruisent les cellules infectées et les cellules cancéreuses ;
 - o Des lymphocytes T helper (ou auxiliaire) (CD4+) qui jouent un rôle clé dans la coordination de l'immunité humorale ou cellulaire.

Cellules régulatrices Th1 et Th2 :

On distingue au moins deux types de lymphocytes T auxiliaires ou *helper*, les cellules régulatrices de l'immunité de type Th1 et de type Th2.

Les cellules Th1 sont responsables de l'immunité cellulaire. Ils stimulent la phagocytose, favorisent la destruction intracellulaire des micro-organismes, facilitent la présentation de l'antigène aux cellules T et causent les réactions inflammatoires. Les cellules Th1 stimulent

l'immunité cellulaire et notamment les cellules T cytotoxiques, qui ont une activité phagocytaire intense.

Les cellules Th2 sont responsables de l'immunité humorale. La stimulation des lymphocytes B se fait surtout par le biais de certaines interleukines qui favorisent la production d'anticorps.

Une inflammation peut emprunter les voies Th1 ou Th2. La mise en place d'une de ces voies inhibe l'autre.

Les antigènes peuvent déclencher des réactions immunitaires humorales sans la participation des lymphocytes T, ils sont appelés *antigènes T-indépendants*. Dans le cas où l'antigène ne parvient pas à stimuler la production d'anticorps sans l'intervention des lymphocytes T auxiliaires, on les appelle des *antigènes T-dépendants*. La réaction en anticorps obtenue à la suite de la stimulation par des antigènes T-indépendants est généralement plus faible.

Il existe également les cellules Th3 qui sont des cellules de régulation. Ces cellules inhibent les voies Th1 et Th2 et règlent donc l'inflammation (2).

En conclusion, les différents mécanismes de défense mis en œuvre vis-à-vis d'un agent pathogène sont l'inflammation, l'immunité innée et l'immunité adaptative. La Figure 1 ci-dessous représente les différentes réactions immunitaires.

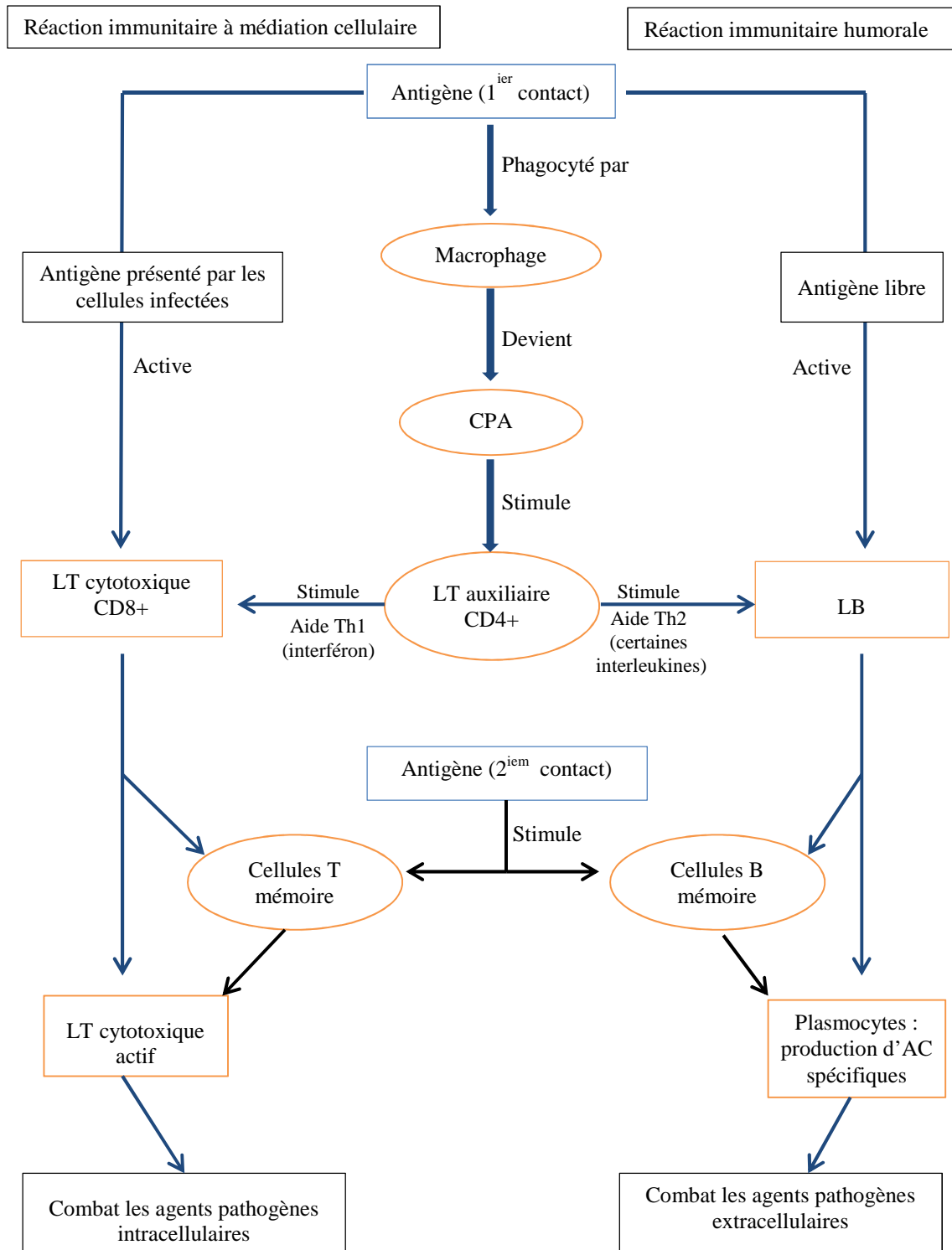


Figure 1 : Résumé des réactions immunitaires (3)

2 HISTOIRE DU DEVELOPPEMENT DES VACCINS

La vaccination fut la première contribution majeure de l'immunologie à l'amélioration de la santé humaine.

2.1 Les premières découvertes

Les sciences de la vaccinologie et de l'immunologie ont été créées il y a deux siècles par des études scientifiques d'Edward Jenner et élargi par les scientifiques de la fin du 19^e siècle (4).

En 1796, E. Jenner a conduit la première investigation scientifique sur la prévention de la variole suite à ces observations montrant que les personnes ayant accidentellement contracté la vaccinelle cowpox (maladie semblable à la variole mais moins virulente) ne développent pas la variole. Ces démonstrations expérimentales par l'administration de pulpe vaccinale (produit de grattage des pustules varioliques) à des enfants ont montré une protection contre une inoculation ultérieure de virus variolique.

Trois quart de siècle plus tard, Louis Pasteur établit le principe de la vaccination avec le premier vaccin « scientifique » contre la pasteurellose par inoculation du virus « vieilli ». Il montre alors que :

- Une dose de culture « vieillie » de *P. multocida* ne tue pas les poules ;
- L'administration ultérieure d'une dose de culture fraîche, mortelle chez les poules témoins, ne tue pas les premières poules.

Il applique en 1885 ce principe à la rage et fait ces premiers essais concluant chez l'homme.

2.2 Le 20^e siècle

Au début du 20^e siècle, les vaccins à partir de bactéries tuées se développent pour la fièvre typhoïde, la tuberculose, la shigellose et le choléra. En 1923 et 1926, Gaston Ramon a montré les propriétés antigéniques des anatoxines diphtériques et tétaniques, par la transformation de ces toxines sous l'effet du formol et de la chaleur, et capables d'induire une protection vaccinale. Aujourd'hui, ce même principe est encore utilisé et tous ces vaccins continuent à être améliorés.

Ce n'est qu'en 1948 que la culture cellulaire *in vitro* est maîtrisée. Cette découverte faite par John Enders a ainsi montré la possibilité de cultiver les virus en dehors d'un hôte vivant

(souris, œuf). Cette technique a été mise au point la première fois en 1954 par Jonas Salk pour préparer un vaccin trivalent inactivé contre la poliomyélite. De nombreux autres vaccins ont suivi cette découverte.

En 1970, E.C. Gotshlich montre que les capsules polysidiques des bactéries sont immunogènes et induisent une réponse protectrice chez l'enfant de plus de 24 mois.

On assiste alors au développement de vaccins polysidiques et de la vaccination contre le méningocoque A et C, le pneumocoque, la typhoïde et *Haemophilus influenzae b*.

Schneerson et Robins en conjuguant des polysides à une protéine montrent une immunogénicité protectrice dès les premiers mois de vie du nourrisson (appliqué pour *Haemophilus influenzae b*).

La fin du 20^{iem} siècle voit se développer le génie génétique avec la fabrication des antigènes vaccinaux par des cellules étrangères. On met au point des vaccins vivants recombinants, des vaccins sous-unités ou conjugués, des vaccins à ADN ou ARN nu (4).

3 LA VACCINATION

3.1 Principes

La protection naturelle fournie par le système immunitaire est très efficace contre les agents infectieux mais n'est pas parfaite. En effet, certains agents pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant de contourner les défenses immunitaires et provoquant des maladies graves voire fatales, particulièrement chez les individus se trouvant aux extrêmes du spectre de l'âge.

Les vaccins sont des médicaments immunologiques. Le principe de la vaccination est d'introduire chez un individu une préparation antigénique dérivée d'un agent infectieux capable d'induire une réponse immunitaire, permettant à l'individu de développer une protection active spécifique vis-à-vis d'un agent infectieux.

L'immunogénicité d'un vaccin peut être dépendant de nombreux facteurs propres à l'antigène, notamment sa morphologie, sa nature chimique et sa masse moléculaire, mais aussi de la voie d'administration ou encore de l'utilisation d'adjuvants (5).

3.2 Objectifs

Cette immunoprophylaxie active spécifique est, très efficace. Son application à une population ou à un groupe en fait un moyen de prévention très utile en santé publique. La vaccination est de loin la contribution la plus importante de l'immunologie à la santé publique.

En 1979, grâce aux campagnes de vaccination, l'OMS déclare officiellement l'éradication de la variole dans le monde. D'autres maladies infantiles jadis courante, tel que la poliomyélite, les oreillons, la rougeole, la rubéole, la diphtérie, la coqueluche, ont disparu ou fortement régressé des pays industrialisés occidentaux.

Le principe des vaccins repose sur le concept de la mémoire. Les objectifs sont d'induire une protection durable contre l'agent pathogène, de rendre notamment par les rappels vaccinaux cette réponse la plus adaptée possible aux antigènes et à la physiopathologie du pathogène [(1), (6)].

4 MECANISMES DE LA VACCINATION

L'efficacité des vaccins est liée à leur capacité d'induire rapidement la production d'anticorps neutralisants de haute affinité qui lient le pathogène et l'empêchent de pénétrer dans les cellules de l'hôte ou alors neutralisent les toxines. La nature et l'intensité de la réponse est fonction du type de vaccin administré (agents vivants ou inactivés) et des facteurs liés à l'hôte (2).

L'antigène vaccinal est capable d'activer les cellules B et T, ce qui se traduit par l'induction de cellules B spécifiques de l'antigène qui prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps ou des cellules B mémoires.

La réponse vaccinale des cellules T est générée en parallèle de celles des cellules B par interaction avec des CD activés. La majorité des vaccins est capable d'activer les LT CD4+. Les réponses cellulaires Th1 et Th2 induisent la différenciation des cellules B (Th2) ou des LT cytotoxiques (Th1). La voie empruntée est dépendante de la nature de la réaction inflammatoire initiale et conditionne l'efficacité de la réponse adaptative ultérieure.

La propriété la plus importante des vaccins actuels est leur capacité à induire la production d'anticorps neutralisants, dépendante des cellules T (1).

Voir Figure 1 : Résumé des réactions immunitaires.

5 LES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS

5.1 Les vaccins à agents vivants atténués

Les vaccins vivants atténués font parties des premiers vaccins produits. Ce sont des agents vivants bactériens ou viraux qui créent une infection asymptomatique ou atténuée. Leur administration provoque une réponse immunitaire spécifique (cellulaire et humorale) efficace et une protection maintenue sur le long terme.

On retrouve dans cette famille les vaccins contre la rougeole, les oreillons, la rubéole, la varicelle, la fièvre jaune, la poliomyélite (Sabin), la tuberculose ou les gastroentérites à rotavirus.

L'atténuation du pouvoir pathogène est obtenue par passage du microorganisme sur des cultures cellulaires dans des conditions défavorables (de température, d'espèce cellulaire) ou par voie chimique. Les nouvelles technologies permettent une atténuation par génie génétique (ex : vaccin contre l'encéphalite japonaise et rotavirus).

Cette approche vaccinale peut soulever des problèmes d'innocuité car ces vaccins ne sont pas dépourvus de risques infectieux : risque de réversion du virus qui retrouve sa virulence ou infections sévères chez les immunodéprimés chez qui leur utilisation est contre-indiquée [(5), (7)].

5.2 Vaccins à agents inactivés

Cette méthode consiste à inoculer des microorganismes entiers inactivés (tués). Ces vaccins sont exempts de tous risques infectieux et sont de bons immunogènes capables de produire une réponse humorale protectrice.

Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique ou chimique qui entraîne une perte de la virulence sans dénaturer le pouvoir immunogène.

Pour ces vaccins, plusieurs injections, par voie intramusculaire ou sous-cutanée, sont nécessaires pour obtenir une immunisation suffisante. Le schéma vaccinal requiert des doses élevées et des injections de rappel pour garantir une immunité à long terme [(5), (7)].

On distingue deux types de vaccins inactivés suivant s'ils sont produits à partir de tout ou partie d'un micro-organisme.

5.2.1 Les vaccins à agents entiers

Ces vaccins sont constitués de la totalité du micro-organisme. Ils ont une bonne immunogénicité et peuvent engendrer des effets indésirables.

Actuellement sur le marché, les vaccins concernés sont ceux contre les virus de la grippe, de l'hépatite A, de l'encéphalite japonaise, de la poliomyélite et de la rage.

Ils ont également été utilisés dans des vaccins antibactériens de première génération, constitués de bactéries entières tuées, par exemple contre la typhoïde, le choléra et la coqueluche.

5.2.2 Les vaccins sous-unitaires

Ces vaccins sont basés sur l'utilisation des molécules antigéniques des micro-organismes.

Cette stratégie correspond à la recherche d'une capacité de stimulation plus ciblée avec moins d'effets secondaires mais l'immunogénicité induite est moins grande en comparaison aux vaccins inactivés (5).

On distingue :

- Les anatoxines bactériennes purifiées, qui sont la forme détoxifiée des protéines sécrétées par les bactéries pathogènes ;
- Les vaccins protéiques, basés sur l'utilisation de déterminants antigéniques des protéines virales ;
- Les vaccins polysidiques ;
- Les vaccins conjugués : combinaison d'un antigène polysidique à une protéine porteuse (exemple de la toxine tétanique inactive).

5.3 Vaccins recombinants

Le mode de production des vaccins par génie génétique s'est développé avec l'essor de la biologie moléculaire et des techniques de recombinaison génétique. Ils utilisent une cellule animale ou une levure pour la synthèse de l'antigène vaccinal (5).

Il existe deux possibilités d'application :

- La synthèse *in vitro* de la fraction antigénique : le plasmide exprimant le gène d'intérêt est inséré dans un système d'expression cellulaire. Après purification et extraction, les protéines constituent la matière première du vaccin.
- L'élaboration de vaccins recombinants : le virus atténué peut être utilisé comme « producteur » de la protéine d'intérêt. Lors de la réplication virale directement dans les cellules de l'hôte, il y a production de l'antigène.

5.4 Conclusion

Ces nouveaux vaccins marquent l'évolution de la vaccinologie au cours du XXe siècle. A partir de 1980, on assiste à l'utilisation presque exclusive des vaccins sous-unitaires. Ceci témoigne de la recherche à la fois d'une sécurité d'utilisation et d'une immunité humorale comme mécanisme protecteur (7).

Un autre progrès majeur en vaccinologie a été le développement de vaccins combinant plusieurs valences vaccinales administrées en une seule injection. Ceci a permis de simplifier les stratégies vaccinales et d'améliorer leur accessibilité (7).

Exemple de vaccins combinant 6 valences : diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, *Haemophilus influenzae* b et hépatite B (Infanrix hexa®, Hexaxima®)

L'ensemble des agents infectieux couverts par un vaccin seul est présenté dans la Figure 2.

| Composition des vaccins | Agent infectieux concernés | |
|---|---|--|
| | Bactérien | virale |
| Vivants atténués | Tuberculose (BCG) Fièvre Typhoïde | Fièvre jaune Oreillons Rotavirus Rougeole Rubéole Varicelle / Zona Encéphalite japonaise |
| Inactivés entiers | <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC) Choléra | Encéphalite Européenne à tiques Encéphalite japonaise Hépatite A Poliomyélite Rage |
| Inactivés à protéines purifiées ou recombinantes | Coqueluche Diphtérie Tétanos | Hépatite B Grippe Papillomavirus humain |
| Inactivés polysaccharidiques | Pneumocoque Fièvre Typhoïde | / |
| Inactivés conjugués (polysaccharides + protéines) | <i>Haemophilus influenzae</i> type b Méningocoque C Méningocoque A, C, Y, W135 Pneumocoque | / |

Figure 2 : Classification des vaccins suivant leur composition

6 NOUVELLES STRATEGIES VACCINALES

La vaccinologie moderne se doit d'intégrer les nouvelles connaissances en immunologie fondamentale, en microbiologie, ainsi que les nouvelles avancées technologiques. Il paraît important de prendre en considération les autres composants du système immunitaire, autre que les réponses anticorps. Aujourd'hui, les études sont axées sur l'implication des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, des lymphocytes T helper et des cellules présentatrices de l'antigène, en particulier les cellules dendritiques qui expriment les molécules de costimulation indispensables à l'activation des lymphocytes T naïfs.

Afin d'assurer l'efficacité de la vaccination, il est important que le type de réponse immunitaire induite après inoculation du vaccin soit en adéquation avec le mécanisme immunitaire naturel induit par l'agent pathogène.

Après le développement de vaccins à agents vivants recombinants et multivalents, les nouvelles techniques de vaccination par ADN, l'utilisation de pseudo-particules virales, le ciblage et l'utilisation des cellules dendritiques, occupent maintenant une place très importante dans les recherches académiques et industrielles. (7)

6.1 Les vaccins à ADN

Les vaccins à ADN ont beaucoup évolué depuis les 20 dernières années mais ne sont, à ce jour, pas encore une alternative aux vaccins conventionnels.

Ces vaccins sont constitués d'un plasmide codant l'antigène vaccinal avec un promoteur eucaryote assurant l'expression de l'ARNm et de la protéine. Le plasmide est produit dans des bactéries, purifié et injecté par voie intramusculaire ou intradermique, ou par des procédés permettant d'optimiser la capture de cet ADN par les cellules, avec pour but d'induire l'expression *in vivo* de l'antigène et de déclencher la réponse immunitaire désirée (8).

Bien que cette technique vaccinale ait pour le moment montré une bonne tolérance, les réponses immunitaires obtenues ont été décevante lorsque le plasmide est utilisé seul.

Des stratégies adjuvantes consistant à administrer simultanément l'ADN vaccinal avec des séquences exprimant des cytokines ou d'autres molécules immunostimulante sont en

développement. Pour rendre cette vaccination performante, l'efficacité de transformation, le niveau d'expression des antigènes et leur immunogénicité doit être amélioré (7).

Aucun vaccin à ADN n'est commercialisé actuellement chez l'humain.

6.2 Vaccins à agents vivants recombinés

La stratégie de vaccination au moyen de vecteurs vivants recombinants est une optimisation de la stratégie de vaccination à ADN car dans ce cas, l'étape de pénétration du matériel génétique dans la cellule est efficace et non limitante. Dans les vaccins à agents vivants recombinés, les souches des micro-organismes sont rendues totalement inoffensives en inactivant ou en éliminant les gènes responsables de leur pouvoir pathogène (les gènes de la virulence). Les séquences vaccinales sont véhiculées par des vecteurs bactériens ou viraux vivants et atténués. L'administration de ces vaccins imite l'infection naturelle, ce qui est favorable à l'induction d'une réponse immunitaire forte et durable après une seule injection.

Des vecteurs viraux et bactériens peuvent être utilisés pour exprimer et délivrer l'antigène. Ces vecteurs présentent à la fois un intérêt économique car leur coût de production est relativement faible mais aussi un intérêt sécuritaire, car le risque de réversion vers la virulence est fortement réduit [(7), (9)].

Exemples du vaccin contre les rotavirus.

6.3 Pseudo particules virales ou « Virus-Like Particles »

Les VLP (Virus-Like Particles) sont des particules vaccinales formées de protéines recombinantes sous-unitaires, capables de s'assembler et de reproduire la structure des particules virales. Leur intérêt est d'obtenir un virus entier mais inactif, entraînant une immunogénicité forte.

Leur production est réalisée par génie génétique en introduisant les gènes codant les protéines structurales dans des systèmes d'expression (procaryote ou eucaryote).

Différents types de VLP sont décrits [(7), (10)] :

- Les VLP dérivés de virus non enveloppés : constitués des protéines de capsides qui s'auto-assemblent après expression *in vitro* (exemple du vaccin HPV Gardasil®). Une autre alternative est d'utiliser ces VLP comme plateforme antigénique et d'y greffer, par génie-génétique ou chimiquement, des antigènes vaccinaux (épitopes ou polypeptides) formant un composé virale hétérologue (exemple des vaccins HBV Engerix®, Recombivax HB®) ;
- Les VLP dérivées de virus enveloppés : structures complexes constituées par une membrane cellulaire (enveloppe) intégrant sur la surface extérieure les antigènes cibles (application dans les vaccins contre le VIH, VHC, Grippe).

6.4 Stratégie combinée : les plasmovLP

Le plasmovLP est un plasmide porteur des gènes codant pour les protéines vaccinales. C'est un vaccin ADN capable de former *in vivo* des VLP recombinantes portant les antigènes vaccinaux. Cette stratégie combine les avantages des vaccins ADN et des VLP, avec une production simple, rapide, peu onéreuse et à grande échelle des vecteurs ADN plasmidiques tout en assurant une forte immunogénicité des antigènes exprimés véhiculés par les VLP produits *in situ*.

Les stratégies plasmovLP sont en développement pour les vaccinations préventives contre le VHC, le VIH et les infections grippales. Des études cherchent à renforcer l'immunogénicité des vaccins en insérant à la surface des VLP des molécules capables de cibler et d'activer les cellules dendritiques (7).

6.5 Ciblage des antigènes vers les cellules dendritiques

La compréhension du rôle majeur joué par les cellules dendritiques (CD) dans l'induction des réponses immunitaires a fait de ces cellules un élément clef dans le développement vaccinal.

Aujourd'hui, un nouvel objectif en vaccinologie est de délivrer spécifiquement les antigènes vers les cellules dendritiques [(9), (11)].

On distingue 2 stratégies :

- Stratégies de ciblage par l'utilisation d'anticorps spécifiques des CD. Dans ce cas, les molécules exprimées à la surface des CD sont utilisées comme cible par des anticorps spécifiques afin de délivrer l'antigène.
- Stratégies de ciblage par l'utilisation de protéines bactériennes se liant aux cellules dendritiques. L'exemple des toxines bactériennes en vectorisation a fait l'objet de nombreux travaux du fait de leur capacité de pénétrer dans les cellules cibles après des interactions spécifiques avec leurs récepteurs. Des antigènes vaccinaux peuvent être génétiquement insérés dans une forme détoxifiée de toxine bactérienne ayant pour cible une molécule présente à la surface des CD.

6.6 Vaccins cellulaires

Les vaccins cellulaires sont un nouveau type de vaccins adaptés pour la génération d'une réponse cellulaire cytotoxique, réponse importante pour l'immunisation contre les virus ou contre les cancers (7).

Ces vaccins cellulaires sont particulièrement appliqués pour des vaccins thérapeutiques contre le cancer visant à générer des réponses immunitaires contre les cellules cancéreuses grâce à l'induction d'une réponse cellulaire et d'une réponse médiée par les anticorps. E (12).

Les différentes approches développées sont :

- Des vaccins à base de cellules dendritiques. L'utilisation de cellules dendritiques chargées avec des antigènes tumoraux sous forme de peptides, de lysats tumoraux ou d'ARNm, est une stratégie directe qui permet d'obtenir une réponse T efficace. Un candidat vaccin est en cours de développement avec cette technique contre le cancer de la prostate résistant à la castration.

- Vaccins à base de cellules entières. L'utilisation de cellules entières allogéniques et autologues sont en développement. Dans cette approche, la cellule tumorale entière est la source de l'immunogénicité pour induire une réponse immune antitumorale. L'avantage de cette technique est que de multiples antigènes sont ciblés simultanément.

Malgré son efficacité d'initiation des réponses immunitaires, cette stratégie n'a obtenu que de faibles réponses cliniques objectives. La combinaison à des stratégies adjuvantes peut être une solution à développer (7).

7 DEFIS DES VACCINS « MODERNES »

Le développement de nouveaux vaccins fait face à d'importants défis liés à la complexité des antigènes ainsi qu'aux patients présentant un dysfonctionnement immunitaire, tel que chez la personne âgée (immunosénescence), les malades atteints de maladies chroniques ou les immunodéprimés. Dans ces situations, la vaccination est malheureusement souvent inefficace.

7.1 Défi des pathogènes complexes

Les pathogènes compliqués tels que *Plasmodium falciparum*, HIV ou *Mycobacterium tuberculosis* peuvent rendre le développement d'un vaccin difficile.

Un exemple de pathogène compliqué est *Plasmodium falciparum*. Le nombre de décès dus à la malaria était estimé à 655 000 personnes pour l'année 2010. Le parasite est un organisme complexe qui a plusieurs stades de développement dans le corps humain et a la capacité d'échapper au système immunitaire grâce à des déterminants antigéniques complètement différents exprimés à chaque étapes intra ou extracellulaire rendant difficile le ciblage d'un stade pour le développement d'un vaccin. Le développement d'un vaccin contre un antigène présent à une étape donnée du cycle de vie du parasite et agissant uniquement à cette étape est possible [(13), (14)].

Un autre défi concerne les antigènes soumis à des variations importantes liées à des mutations génétiques créant l'émergence continue de nouvelles souches contre lesquelles la majorité de la population humaine reste sensible. C'est le cas du virus de la grippe dont les gènes codant les antigènes sont souvent sujets à des mutations. La variabilité antigénique s'acquiert en

raison de l'acquisition de mutations ponctuelles lors de la réplication (responsable de la variabilité des souches grippales), ou de réassortiments majeures du matériel génétique entre des souches apparentées. Ceci peut conduire à une nouvelle souche potentiellement responsable de pandémie grippale due au fait que la majorité de la population sera naïve vis-à-vis de cette souche.

Un vaccin candidat contre la grippe pandémique doit démontrer un spectre de protection vaccinale vis-à-vis de variants viraux génétiquement éloignés tout en ayant la plus faible dose possible d'antigène. L'utilisation d'adjuvants permet de répondre à ces attentes. Les adjuvants actuellement utilisés dans les vaccins antigrippaux permettant d'élargir le spectre de protection, en promouvant la cross-réactivité des anticorps, et d'avoir une dose d'antigène réduite sont le MF59 et l'AS03 [(15) (16)].

7.2 Défi des populations cibles

Certaines populations représentent un défi vaccinal et doivent être prises en compte dans le développement des vaccins car le système immunitaire a la particularité de changer avec l'âge. Les populations aux âges extrêmes de la vie sont représentées par les nourrissons, qui ont un système immunitaire immature, et les populations de plus de 65 ans chez qui l'immunosénescence est observée. Chez ces populations la vaccination peut ne pas entraîner une réponse immune efficace et durable.

Les autres populations cibles présentant un défi sont les personnes immunodéprimées et celles présentant une maladie chronique (14).

7.2.1 Le nourrisson

Du fait de l'immaturité du système immunitaire du nourrisson, même les vaccins les plus efficaces risquent de ne pas obtenir une réponse suffisante pour être protecteur. Les vaccins ayant prouvé leur efficacité chez l'adulte peuvent ne pas induire une bonne protection chez le nourrisson.

Les facteurs influençant la production d'anticorps chez le nourrisson sont :

- Le type de vaccin (vaccin vivant versus sous-unitaires),
- L'âge de la première vaccination,
- L'intervalle entre les doses,

- L'âge auquel la dernière dose d'une série est administrée.

Il y a des différences claires entre les réponses immunitaires humorales et cellulaires de l'adulte et du nourrisson. En règle générale, les nourrissons répondent mal aux antigènes T-indépendants (antigènes polysaccharidiques). La réponse aux antigènes T-dépendant est plus faible et les anticorps persistent moins longtemps (antigènes protéiques). Néanmoins, il est possible de générer des cellules B mémoire bien que les interactions entre les CD et les antigènes sont le plus faibles. Il existe en plus de cette immaturité immunologique, les anticorps maternels qui ont un effet inhibiteur sur la réponse immunitaire du nourrisson (17).

7.2.2 Le sujet âgé

Chez le sujet âgé, une immunosénescence est partiellement responsable de l'augmentation de la prévalence et de la sévérité des maladies infectieuses, ainsi que de la faible efficacité de la vaccination. L'immunosénescence se caractérise par une diminution de la médiation cellulaire du système immunitaire et de la réponse humorale. Cependant, le système immunitaire inné semblerait mieux préservé que le système immunitaire adaptatif. La déficience de la fonction des cellules T gêne l'induction de la réponse adaptative. Ceci conduit à la diminution de la réponse attendue lors de la vaccination.

L'amélioration de la stratégie vaccinale avec des nouveaux adjuvants et des nouveaux vaccins qui ciblent spécialement le vieillissement du système immunitaire, aiderait à surmonter la limitation de la réponse immune due à l'immunosénescence. Au sein de cette population, les adjuvants pourraient particulièrement aider à stimuler les cellules mémoire afin d'améliorer la réponse (18).

7.2.3 L'immunodéprimé

Il existe des problèmes spécifiques à la vaccination des sujets immunodéprimés. Chez ces patients, l'immunogénicité à long terme est mal connue et l'innocuité de la vaccination n'est pas clairement établie.

Ces patients peuvent avoir un risque accru de développer certaines infections, de ce fait, des vaccins supplémentaires pourraient être recommandés pour eux. Souvent, la réponse immunitaire des personnes immunodéprimées aux antigènes vaccinaux n'est pas aussi efficace que chez les immunocompétents. Des doses plus élevées ou des rappels plus fréquents peuvent être nécessaires. Néanmoins, même dans ces conditions la réponse immune

peut ne pas être optimale. Il est à noter que l'utilisation des vaccins vivants atténués est contre indiquée dans cette population du fait du risque d'infections sévères (19).

8 CONCLUSION

Beaucoup d'efforts sont déployés pour permettre l'accès à la vaccination pour tous et la protection contre les infections les plus graves.

Le développement de nouveaux vaccins nécessitent de prendre en considération des exigences d'ordre :

- Scientifique : efficacité sans effet secondaire ;
- Technologique : stabilité du produit ;
- Sociologique : facilité d'administration ;
- Economique : faible coût.

L'idéal est un vaccin stable conférant une immunité protectrice à vie après une seule administration par voie non invasive. Néanmoins, cet idéal se heurte encore à de nombreux obstacles pratiques.

De nos jours, la faible immunogénicité de certains antigènes, les problèmes d'immunité de certaines populations cibles et le développement de nouvelles stratégies vaccinales font que les stratégies adjuvantes dans les vaccins modernes tiennent une place de plus en plus importante. Il existe un besoin important de développer de nouveaux adjuvants.

La réussite du développement d'un vaccin nécessite de connaître quel adjuvant utiliser et comment le formuler de façon optimal avec l'antigène, afin d'obtenir un vaccin immunogène et sans danger.

CHAPITRE 2 : UTILISATION DES ADJUVANTS DANS LES VACCINS

1 LES ADJUVANTS

Comme vu précédemment, l'antigène par lui-même n'est souvent pas un agent suffisamment stimulant dans le processus de recrutement du système immunitaire et la mise en place d'une réponse immune adaptative. La définition d'une stratégie adjuvante pour optimiser la réponse immunitaire est une étape importante dans les vaccins modernes.

1.1 Définition

Le terme « adjuvant » est dérivé du mot latin *adjuvare* qui signifie « aider ». Tout matériel qui augmente la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire d'un antigène est considéré comme un adjuvant, il est dit immunogène (20).

Les adjuvants sont utilisés pour augmenter la réponse immunitaire d'un antigène depuis près de 100 ans. C'est Gaston Ramon, vétérinaire et biologiste français, qui a instauré en 1925 le principe des substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité, par une technique qui permet d'obtenir des sérums plus riches en antitoxines en joignant au vaccin une substance irritante pour les tissus (21)

Les adjuvants peuvent être utilisés pour (22) :

- Accroître l'immunogénicité des nouveaux antigènes peu immunogènes (protéines purifiées ou recombinantes, peptides, polysaccharides purifiés...);
- Moduler et orienter la réponse immunitaire (Th1, Th2, CTL...);
- Maintenir la réponse immunitaire dans le temps (mémoire);
- Réduire la quantité d'antigène ou le nombre de rappel de vaccination nécessaires pour l'immunité protectrice (aspect économique);
- Améliorer la réponse immunitaire aux vaccins chez les nouveau nés, les personnes âgées ou les immunodéprimées;
- Développer de nouvelles voies d'immunisation (oral, nasal).

1.2 Histoire du développement des adjuvants

Le développement des adjuvants dans les vaccins se poursuit depuis plus d'un siècle :

- 1916 : Le Moignic et Pinoy furent les premiers à identifier que *Salmonella typhimurium* en suspension dans une huile minérale potentialisait la réponse immunitaire ;
- 1925 : Ramon démontre que la réponse à une anatoxine peut être augmentée par une large gamme de composés très variés, tel que l'agar, le tapioca, la lécithine, l'huile d'amidon, la saponine ;
- 1926 : Glenny fut le premier à découvrir les propriétés adjuvantes des sels d'aluminium. Cette découverte a ouvert le champ à l'utilisation des sels d'aluminium comme adjuvant dans les vaccins ;
- 1936 : Une nouvelle étape a été la découverte des propriétés adjuvante du Quil A, une saponine triterpénoïde extraite de l'écorce du *Quillaja saponaria* d'Amérique du Sud par Thibault et Richou ;
- 1937 : Les études de Freund décrivent l'effet immunopotentialisateur des émulsions formant ainsi la base au développement des adjuvants modernes tel que le MF59.

Jusqu'à présent, les composés à base d'aluminium (aluminium composés principalement d'hydroxyde ou de phosphate) sont les plus utilisés dans la production des vaccins humains.

De nombreux adjuvants ont été découverts par la suite mais leurs fortes toxicités locales et systémiques n'ont pas permis leur utilisation chez l'homme (exemple de l'adjuvant complet de Freund et des lipopolysaccharides). Ceci a contribué à laisser le champ libre à l'utilisation de l'aluminium pendant près de 80 ans (22).

Depuis les années 2000, le développement de nouveaux adjuvants beaucoup plus ciblé a vu le jour.

Aujourd'hui, l'objectif est d'avoir des molécules immunostimulantes dont la composition chimique et le mécanisme d'action sont parfaitement définis (23) .

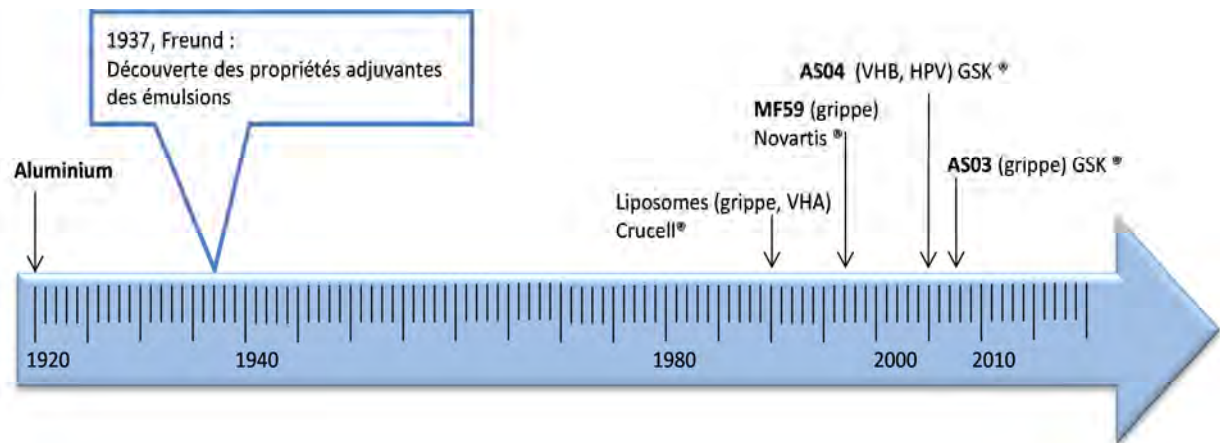


Figure 3 : le développement des adjuvants (24)

1.3 Modes de classification

L'hétérogénéité des adjuvants potentiels et de leurs mécanismes a suscité de nombreuses tentatives pour les classer.

1.3.1 Classement suivant leur mécanisme d'action

Une première classification est faite suivant leur mécanisme d'action (25) :

- Les immunostimulants qui agissent directement sur le système immunitaire pour améliorer la réponse à l'antigène (ligands aux TLR, cytokines, saponines et des endotoxines bactériennes qui stimulent la réponse immunitaire) ;
- Les dépôt/carrier qui sont des systèmes de libération (ou véhicules) présentant l'antigène vaccinal au système immunitaire de façon optimale, permettant la libération contrôlée et la formation d'un dépôt améliorant la réponse spécifique à l'antigène ;
- Les immunostimulants mélangés à un système de libération (sels d'aluminium, émulsions, liposomes).

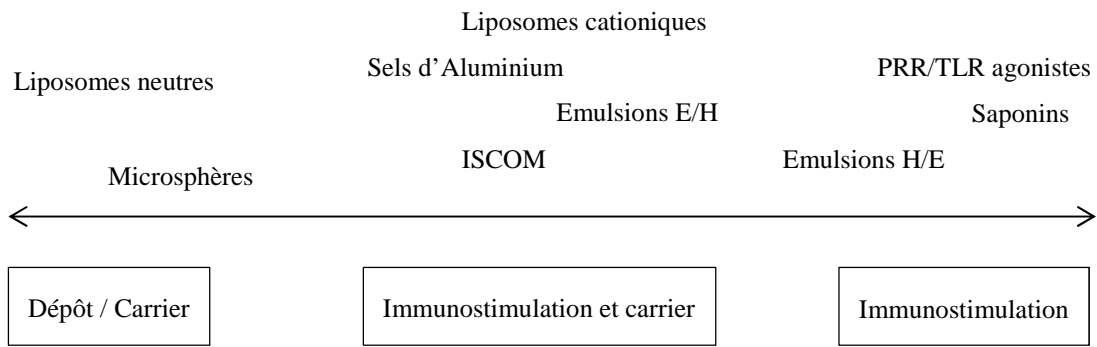


Figure 4 : Classification des adjuvants suivant leur mécanisme d'action (23)

1.3.2 Classement en fonction de la réponse induite

Une voie alternative est de les classer en fonction du signal qu'ils induisent sur le système immunitaire. Néanmoins, cette classification serait sujette à des redéfinitions régulières du fait de la meilleure compréhension des voies de signalisations mises en jeu dans l'activation de la réponse immunitaire et pouvant mener à l'apparition de nombreux groupes.

1.3.3 Classement par génération

Il est possible d'obtenir une meilleure compréhension des adjuvants en les classant simplement en « générations ». Ce mode de classement offre une bonne visibilité permettant de mettre en évidence les points communs entre les différentes approches de développement des nouveaux adjuvants, tout en étant pas sujet à des changements réguliers (24).

Tableau 1 : Formulations des adjuvants décrits dans la littérature [(26), (27)]

| Nom | Informations | Indications | Etape du développement |
|--|--|--|-------------------------------|
| Sels minéraux | | | |
| Sels d'aluminium (sels d'hydroxyde et de phosphate) | Phénomène d'adsorption de l'antigène. Induit une réponse anticorps forte | Utilisé dans près de 80% des vaccins actuellement sur le marché | Autorisé sur le marché |
| Phosphate de calcium | Composé naturellement présent dans le corps humain | Utilisé dans la formulation de vaccins contre diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite | Autorisé sur le marché |
| Emulsions | | | |
| MF59 | Emulsion H/E stabilisée par des surfactants non-ioniques | Utilisé dans le vaccin contre la grippe, en essai dans différents vaccins contre la malaria, VHC, VIH | Autorisé sur le marché Europe |
| Montanide ISA-51 | Emulsion E/H stabilisée (Induit une forte réponse LT) | En essai contre la malaria et cancer | Phase III |
| AF03 | Emulsion H/E à base de squalène | Utilisé dans le vaccin de la grippe pandémique de 2009 | Autorisé sur le marché Europe |
| Dérivés microbiens | | | |
| MPL (monophosphoryl lipid A) | Agoniste TLR4 | Utilisé en combinaison | / |
| Flagelline | Flagelline lié à l'Ag Agoniste TLR5 | En essai dans les vaccins contre la grippe, la peste, | Phase I |
| OM-174 (Lipid A derivative, E. coli), OM-triacyl | Analogue synthétique, induit la maturation des CD | En essai dans les cancers | |
| Toxine thermolabile (LT), Toxine cholérique (CT, enterotoxines modifiées) | Augmente les réponses sériques et mucosales (production IgA) | En essai dans l'immunisation transcutanée LT a été autorisé dans un vaccin contre la grippe en Suisse puis retiré du marché | Retiré du marché |
| CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) | Utilisé en association Oligonucleotide + Aluminium, Oligonucléotide+ | En essai dans la vaccination contre HBV, HCV, malaria | Phase I |

| | | | |
|---|---|--|----------------------------------|
| | MF59 Agoniste TLR9, réponse Th1 et induction de LT CD8 | | |
| Formulation particulière | | | |
| Liposome | Vésicules lipidiques qui permettent une fusion aux membranes cellulaires et de délivrer l'antigène aux CMH 1 | En essai, vaccins variés | / |
| Virosome™ | Liposome reconstitué avec des glycoprotéines de particules virales isolées | Utilisé dans la vaccination HAV et grippe | Autorisé sur le marché Europe |
| ISCOMS® | Structure complexe de saponines et lipides : Liposomes + QS21 Réponse LT CD8 et CD4 | Essais dans la vaccination contre la grippe, HPV, HCV et cancer Deuxième génération (ISCOMATRIX) testée dans la vaccination HPV16 | Phase I |
| PLG (poly[lactide-co- glycolide]) | Microparticules fonctionnent comme système de délivrance Réponse Th1 et Th2 | Vaccin ADN (VIH) | Phase I |
| Proteosomes™ | Agoniste TLR2 Développé pour la vaccination mucoale | En développement pour la vaccination intranasale (grippe) | / |
| Petites molécules potentiateurs immunitaires | | | |
| Imiquimod | Imidazoquinoline Agoniste TLR7 | En essai en massage aux sites d'injection du vaccin thérapeutique HPV | Phase II |
| Saponine | | | |
| QS21 | Saponine (fractions purifiées de Quil A) Réponse LT et anticorps importante | Essais seuls ou avec MPL dans malaria, grippe, cancer | Phase I |
| Combinaisons d'adjuvants | | | |
| AS01 | Liposomes contenant MPL et QS21, favorisent une réponse type Th1 | Essais pour malaria | Phase II |

| | | | |
|---------------|---|--|-------------------------------------|
| AS02 | Emulsion H/E composée de MPL et QS21 réponse LT et anticorps | Essais pour malaria, HBV, TB | Phase II |
| AS03 | Emulsion H/E+ tocopherol α Potentialise la réponse adaptative | Grippe pandémique | Autorisé sur le marché Europe |
| AS04 | MPL + hydroxide d'aluminium. Protection induite plus forte en comparaison a l'aluminium seul | Utilisé dans la vaccination HPV 16/18, en essai HBV, HSV | Autorisé sur le marché Europe et US |
| RC-529 | MPL synthétiques + aluminium | HBV | Phase II |

1.4 Stratégies de développement

D'un point de vue pratique, pour le développement des vaccins, il y a un avantage à combiner plusieurs mécanismes d' « adjuvantité » :

- permettre une addition des mécanismes de mise en place d'une réponse protectrice,
- réduire la quantité d'antigènes nécessaire à une réponse optimale,
- diminuer les effets indésirables et accroître la sécurité d'utilisation de l'adjuvant.

Il est également important de se rappeler que l'initiation, la qualité et l'ampleur de la réponse immunitaire à un antigène vaccinal peuvent être influencées par de nombreux facteurs non spécifiques. Ces facteurs comprennent le type et la dose de l'antigène, le calendrier de vaccination, la voie d'immunisation, et même l'âge et la santé générale de la personne vaccinée. Ainsi, l'utilisation de ces facteurs peut être considérée comme des types de stratégies adjuvantes (28).

1.4.1 Les adjuvants de première génération

L'adjuvant le plus anciennement utilisé est l'aluminium. Identifié dans les années 1920, il est le plus largement utilisé dans les vaccins sur le marché. Les émulsions n'ont été introduites qu'une dizaine d'années plus tard par Freund.

Par conséquent, les deux plus grands adjuvants représentant la première génération sont liés par leur structure physique et leur dimension. Ce sont des dispersions particulières (agrégats d'aluminium ou gouttelettes d'émulsion) dans lesquels l'antigène est lié ou associé. Ils ont tous les deux la propriété de prolonger la durée de présence de l'antigène au site d'injection. A cette époque, l'induction d'une inflammation locale entraînant le recrutement des cellules présentatrices de l'antigène au site d'injection était recherché.

Sur la base de leur structure particulière et leur dimension, les particules polymériques (ou microparticules) et les liposomes font également partie de la première génération d'adjuvants. Comme l'aluminium, ces composés sont facilement capturés par les cellules immunitaires et sont capables d'adsorber ou d'encapsuler l'antigène permettant d'améliorer sa persistance et sa libération au site d'injection (28).

1.4.2 Les adjuvants de deuxième génération

La deuxième génération d'adjuvants a été initiée dans les années 1970 lorsque l'on a commencé à additionner d'autres composés à la génération 1 pour améliorer leur efficacité. Le développement de la deuxième génération fait suite à la découverte de composés synthétiques qui active le système immunitaire. Parmi ces composés, le muramyl dipeptide (MDP) composant des cellules des mycobactéries, est identifié comme le plus petit composé ayant une activité adjuvante. Ces composés extraits des microorganismes n'ont pas une efficacité optimale par eux-mêmes et sont donc couplés ou liés aux composés de génération 1.

La deuxième génération d'adjuvant existe depuis plus de 40 ans. Cependant, ce n'est qu'en 2007 que l'AS04 composant du vaccin Cervarix® a obtenu une autorisation de mise sur le marché. Ceci montre bien que le développement des adjuvants dans les vaccins est un processus lent et difficile (28).

1.5 Succès et limites dans le développement de nouveaux adjuvants

Bien qu'il y ait un grand nombre de candidats disponibles en recherche et développement, très peu d'adjuvants sont autorisés dans les vaccins. Le plus utilisé à travers le monde est l'aluminium. Le MF59, émulsion huile dans eau, est également un succès, il est autorisé dans une vingtaine de pays depuis une dizaine d'années.

Le succès de la deuxième génération est l'AS04 (système adjuvant développé par GSK Vaccines) qui est une combinaison d'aluminium et de MPL. Il est autorisé sur le marché dans le vaccin contre les papillomavirus humains et un vaccin contre le virus de l'hépatite B.

Les principales limites rencontrées sont :

- L'analyse du rapport bénéfice/risque doit être favorable ;
- Le risque doit être minimal du fait de l'utilisation chez des personnes saines et des enfants ;
- L'utilisation de l'adjuvant doit être justifiée : il est important de montrer que l'adjuvant est indispensable à l'obtention de la réponse immune souhaitée et qu'il offre un avantage clair et cohérent ;

- La sécurité d'utilisation doit être démontrée à travers les études précliniques et cliniques.

Le défi qui se pose pour les adjuvants de deuxième génération est de répondre à l'ensemble des exigences réglementaires requises par les autorités de santé (voir chapitre 3 – Environnement réglementaire des adjuvants).

Le succès dans le développement des nouveaux adjuvants est donc difficile à atteindre. Ils devraient répondre aux caractéristiques optimales présentés dans le Tableau 2 (24). De plus, ce tableau présente les principales causes d'échec au développement.

Tableau 2 : Caractéristiques optimales d'un adjuvant candidat

| Réussite | Echec |
|--|---|
| Sécurité, non associé à un effet long-terme | Profil de sécurité inacceptable |
| Bien toléré | Réactions locales conséquentes |
| Voie de synthèse simple | Manque de reproductibilité, complexité de la formulation |
| Composants simples, peu chers | Matière première chère, pureté non convenable |
| Biodégradable | Non dégradable, résidu reste longtemps au site d'injection |
| Compatible avec différents types d'antigènes | Difficile à formuler avec d'autres adjuvants, mauvais impact sur la stabilité de l'antigène |
| Capable de délivrer l'antigène et d'être un potentialisateur immunitaire | Peu facile à combiner avec des composés additionnels de la formulation |

1.6 Conclusion

La définition du terme « adjuvant » est très imprécise, il y a beaucoup de candidats disponibles et des nouveaux sont régulièrement décrits dans la littérature. Les adjuvants les plus récents décrits sont en fait des variations sur des thèmes anciens, souvent améliorés pour les rendre plus efficace. En outre, comme les voies de signalisation impliquées dans l'activation du système immunitaire sont de mieux en mieux définies, de plus en plus de candidats voient le jour. Néanmoins, de nouvelles exigences réglementaires ont pour but d'encadrer le développement et l'utilisation des adjuvants pour assurer qualité, efficacité et surtout sécurité des vaccins.

2 MECANISMES D' ACTIONS

2.1 Considérations générales

Comme vu précédemment, un adjuvant potentialise (accélère, augmente, améliore et/ou prolonge) l'immunité induite contre l'antigène avec lequel il est combiné, en agissant sur une ou plusieurs étapes de la réponse immune.

Plusieurs cibles sont utilisées par les adjuvants leur permettant de moduler les réponses immunes, en impactant (14) :

- La reconnaissance par les récepteurs Toll-Like des PAMPs (voir Figure 5, adjuvant A) ;
- La présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux récepteurs des lymphocytes T (voir Figure 5, adjuvant B) ;
- La reconnaissance des signaux de co-stimulations spécifiques des lymphocytes T et des ligands (voir Figure 5, adjuvant C) ;
- Le signal intracellulaire des CPA (voir Figure 5, adjuvant D).

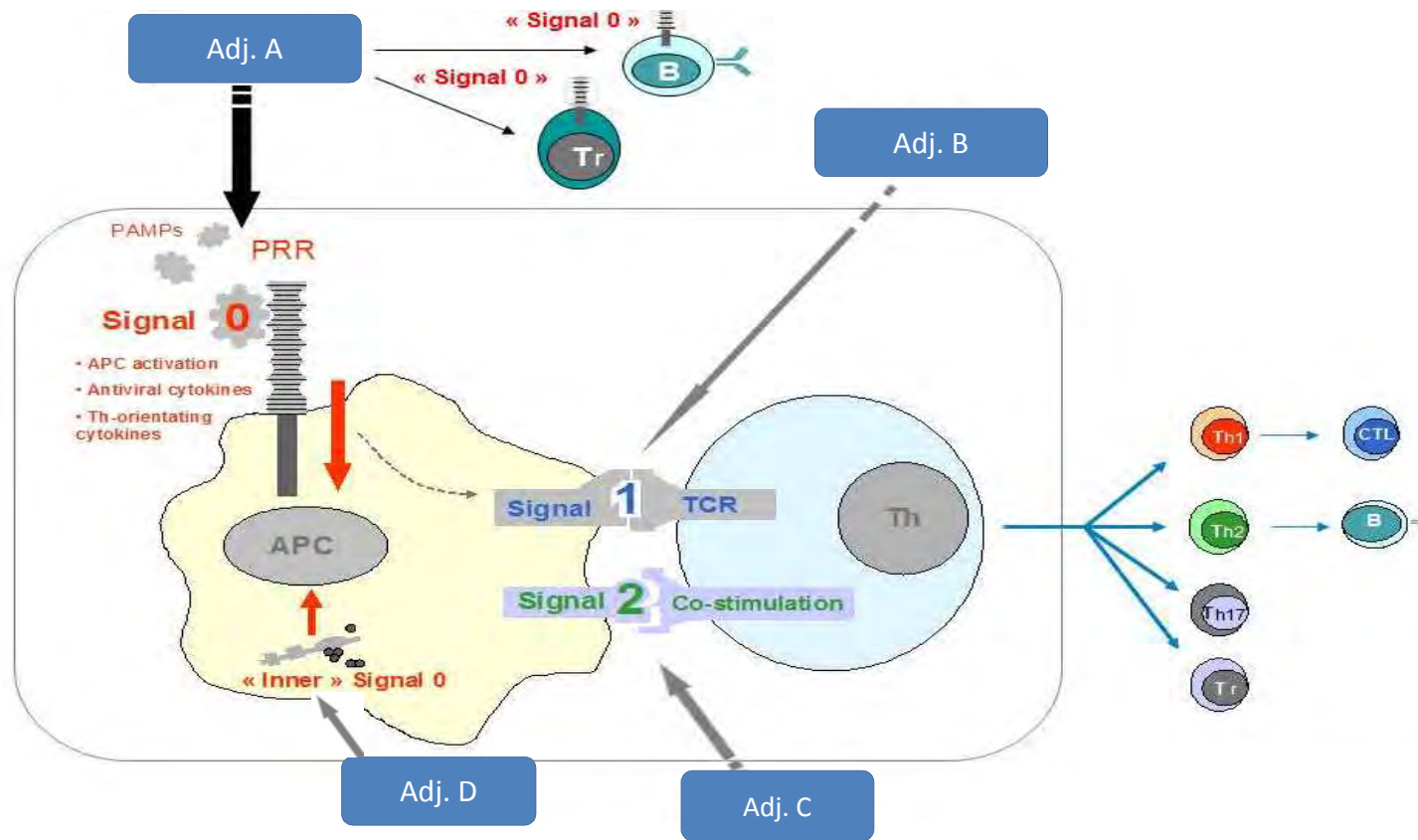


Figure 5 : Représentation des différentes cibles des adjuvants (14)

2.2 Adjuvants cibles de l'immunité innée

2.2.1 Adjuvants ciblant les récepteurs Toll-Like et PRR

Les PRR (Pattern Recognition Receptor) sont exprimés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène et lient les motifs hautement conservés des pathogènes (les PAMPs). La reconnaissance des PAMPs par les PRR active les voies de signalisation intracellulaire et régule l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires conduisant à la maturation, différenciation et prolifération des CD, macrophages, cellules NK, LT et LB (29).

A l'heure actuelle, 11 TLR ont été identifiés chez l'homme, et chaque TLR reconnaît distinctement des dérivés PAMPs de microorganismes variés. Les TLR peuvent être classés en deux groupes suivant leur localisation cellulaire. Les TLR du premier groupe sont localisés sur la membrane plasmique et les TLR du deuxième groupe (incluant TLR3, 7, 8 et 9) sont localisés dans le compartiment intracellulaire, voir Figure 6. Les particules virales et bactériennes sont endocytées et dégradées, et les produits de la dégradation (ADN et ARN) sont libérés dans le compartiment intracellulaire permettant ainsi le contact avec les TLR intracellulaires (30).

Les dérivés des PAMPs sont utilisés comme adjuvant dans les formulations des vaccins. Exemple des émulsions E/H ou des LPS.

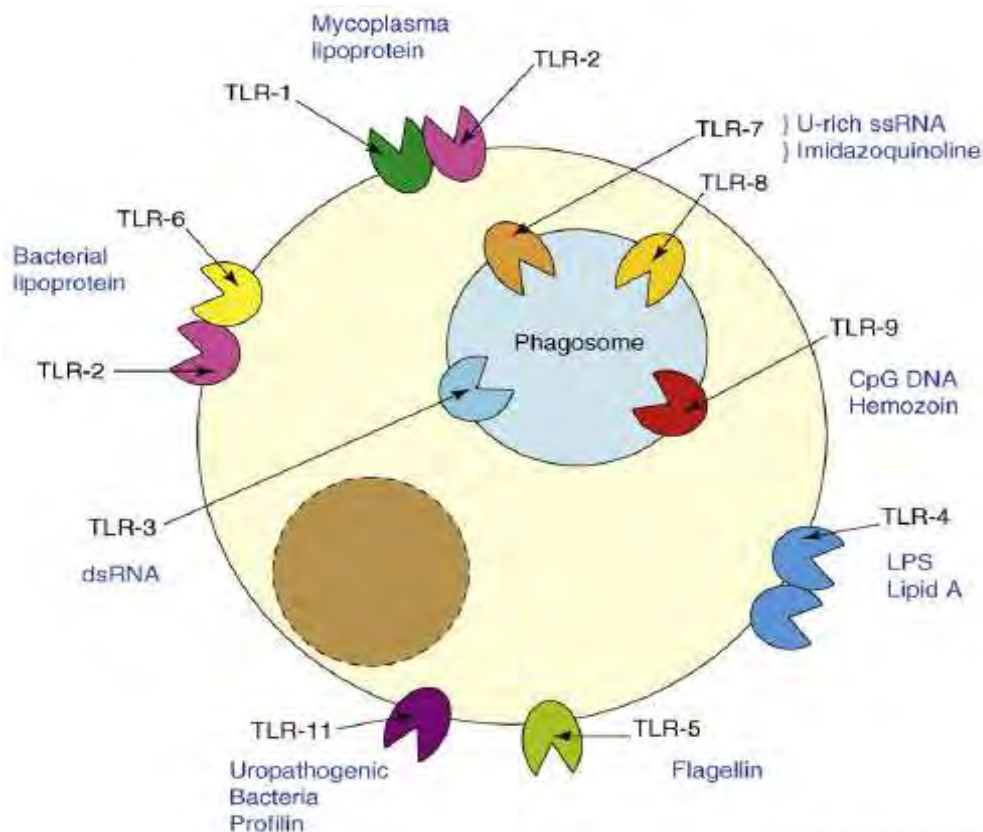


Figure 6 : Représentation des TLR et de leurs ligands (25)

2.2.2 Systèmes de libération

La caractéristique principale des systèmes de libération est de déclencher une réaction inflammatoire au site d'injection menant au recrutement des CPA. Ces cellules capturent l'antigène et migrent dans les ganglions lymphatiques afin de présenter les épitopes aux lymphocytes T. Ils ont la capacité de retenir l'antigène au site d'injection formant ainsi un effet dépôt.

La concentration en antigène et la disponibilité des CPA au site d'injection est un prérequis important pour une bonne présentation des antigènes aux lymphocytes. Les systèmes de libération assurent la disponibilité des antigènes aux CPA de manière contrôlée. La vitesse de libération de l'antigène au site d'injection est un facteur important pour le maintien d'une réponse immune spécifique de l'antigène lors de la vaccination.

Les principaux adjuvants de cette classe sont les émulsions E/H et les sels d'aluminium. On peut également mentionner les liposomes, les virosomes et les complexes immunostimulant (29).

2.3 Adjuvants cibles de l'immunité adaptative

Les adjuvants ciblant l'immunité adaptative sont des molécules très différentes les unes des autres quant à leur origine, nature chimique et effet sur les cibles du système immunitaire, ils peuvent être naturels ou synthétiques. On retrouve les adjuvants solubles dans l'eau (QS-21), les émulsions H/E (MF59) ainsi que des protéines recombinantes (les cytokines, chimiokines, molécules de costimulation et des peptides Th dérivés de toxines bactériennes ou composés viraux).

Ces adjuvants permettent d'améliorer le recrutement des cellules dendritiques et la présentation des antigènes aux cellules T peut améliorer la réponse immune. Les lymphocytes T CD4⁺ subissent une expansion clonale en 2 sous-populations T helper suite au contact du complexe peptide-CMH. Les cellules Th1 et Th2 stimulent la réponse humorale et cellulaire (29).

Tableau 3 : Exemple de mécanismes d'action des principaux adjuvants (26)

| Adjuvant | Activité | Mécanismes |
|--|--|---|
| Sels d'aluminium (gel non-cristallin) | Réponse Ac et Th2 | <p>↑ production chimiokines /cytokines, ↑ recrutement des monocytes et différenciation des CD, ↑ la capture de l'Ag par les CD</p> |
| MF59 (émulsion H/E) | <p>↑ titre en Ac et réactivité croisée des Ac Réponse Th2</p> | <p>↑ production chimiokines /cytokines, ↑ recrutement des CD, ↑ la capture de l'Ag par les CD</p> |
| Ligands TLR (MPL, GpG) | Réponse Th1 et CTL, ↑ cellules T mémoires | <p>Signal TLR des CD favorise la présentation de l'Ag, améliore la migration des CD dans les ganglions lymphatique et la production de cytokines Pourrait avoir un impact direct sur les lymphocytes</p> |
| QS21 (fractions purifiées de Quil A) | Réponse Ac, Th1 et CTL | Améliore la réponse immune par un mécanisme peu connu, possède des capacités lytiques et une réactogénicité locale |

3 FORMULATION DES ADJUVANTS

L'influence de la formulation est souvent sous-estimée. Les adjuvants ont peu ou pas d'efficacité s'ils sont mal formulés. La formulation est essentielle, non seulement pour la stabilité et l'immunogénicité des vaccins, mais aussi pour réduire leur réactogénicité et améliorer leur efficacité. La plupart de ces informations ne sont pas publiées et demeurent le savoir-faire des producteurs de vaccins (31).

Pour une formulation optimale, plusieurs critères rentrent en considération :

- La nature du composant antigénique,
- Le type de réponse immune souhaitée,
- La voie d'administration,
- La stabilité du vaccin.

La formulation idéale devra être sûre, stable avant administration, facilement biodégradée et éliminée, capable de favoriser une réponse immunitaire spécifique à l'antigène et peu chère à produire. De plus, la définition physique et chimique du composé est nécessaire pour faciliter le contrôle qualité garantissant la reproductibilité de la fabrication et l'activité de l'adjuvant (25).

La formulation du vaccin représente donc une étape importante qui peut être la cause de l'arrêt du développement de nombreux adjuvants.

4 TOLERANCE DES ADJUVANTS

4.1 Principaux enjeux

L'attention est faite sur le besoin d'une considération spécial pour la tolérance des adjuvants susceptibles de devenir les composants de vaccins et le besoin d'une surveillance étroite des réactions locales et systémiques ainsi que des évènements rares tel que les maladies auto-immunes et les troubles neurologiques (32).

4.2 Discussion générale sur l'innocuité des adjuvants

Les discussions entre les représentants de l'industrie, des universités et des autorités de santé ont mis en avant la nécessité d'efforts concertés pour avancer sur le sujet de l'innocuité des adjuvants. Des groupes de travail ont établi des priorités à court, moyen et long terme sur le thème de l'innocuité des adjuvants.

A court terme, les priorités sont tournées vers l'harmonisation de la définition, l'identification et l'évaluation des effets indésirables graves dans les essais cliniques. L'étude approfondie du mode d'action des nouveaux adjuvants peuvent aider à l'évaluation des risques, y compris la possibilité de déclencher ou d'exacerber un évènement auto-immune.

Les priorités à moyen terme comprennent l'évaluation de l'incidence et de la prévalence des maladies auto-immunes en fonction de l'âge, de la population et de la géographie pour aider l'interprétation des données cliniques. L'identification et la validation de nouveaux biomarqueurs de la toxicité induite par un adjuvant chez des modèles animaux et humains pourraient améliorer l'évaluation de la sécurité dans les études précliniques et des essais chez l'homme.

Une des priorités à long terme est de déterminer si les modèles animaux peuvent être développés pour prédire de façon fiable les risques chez l'homme associés aux adjuvants dans les vaccins. Le groupe a noté qu'en raison de la complexité du système immunitaire et du fait que beaucoup d'adjuvants sont des composés complexes avec des effets mitigés sur les différents types de cellule *in vivo*, la compréhension complète de leur mode d'action pourrait ne pas être réalisable avant l'autorisation de mise sur le marché et il faudrait attendre les avancées technologiques et les connaissances scientifiques (32).

Des comités ont été créés, tel que le « comité consultatif mondial de la sécurité vaccinale » (GACVS, hébergé par l'OMS). Le GACVS donne des avis indépendants et scientifiques sur les problèmes d'innocuité liés aux vaccins. Ce comité est à l'origine de plusieurs rapports dans lesquels l'innocuité des adjuvants est discutée et surveillée (33).

4.3 Efficacité versus sécurité

Il est généralement accepté que pour les adjuvants, la puissance doit être évaluée au regard de la toxicité dans le but de fournir une stimulation immunitaire maximum avec le moins d'effets indésirables possibles. Néanmoins, cette balance est controversée dans la mesure où les mêmes mécanismes d'action sont responsables des effets positifs immunostimulants et des effets secondaires défavorables.

Dans la vaccination préventive, le vaccin est administré à des sujets sains, de ce fait un compromis sur l'efficacité peut être nécessaire pour éviter les effets indésirables. Toutefois, dans le cas du développement de vaccins thérapeutiques contre les maladies humaines graves (cancers, infection à HIV,...) les critères peuvent être moins rigides. Dans ce cas, les réactions indésirables au vaccin sont admises et doivent être balancées avec le pronostic général de la maladie.

Il s'agit d'un équilibre (souvent dose-dépendant) entre une réaction locale négligeable et une réaction clinique significative et inacceptable.

4.4 Profil d'effets indésirables des adjuvants

4.4.1 Mécanismes en cause

L'hétérogénéité des adjuvants et de leurs mécanismes d'action rend difficilement prédictible le profil d'effets indésirables. L'action immunologique des adjuvants peut être associée à des réactions secondaires locales ou systémiques impliquant des mécanismes immunologiques variés représentés dans la Figure 7 [(34), (35)].

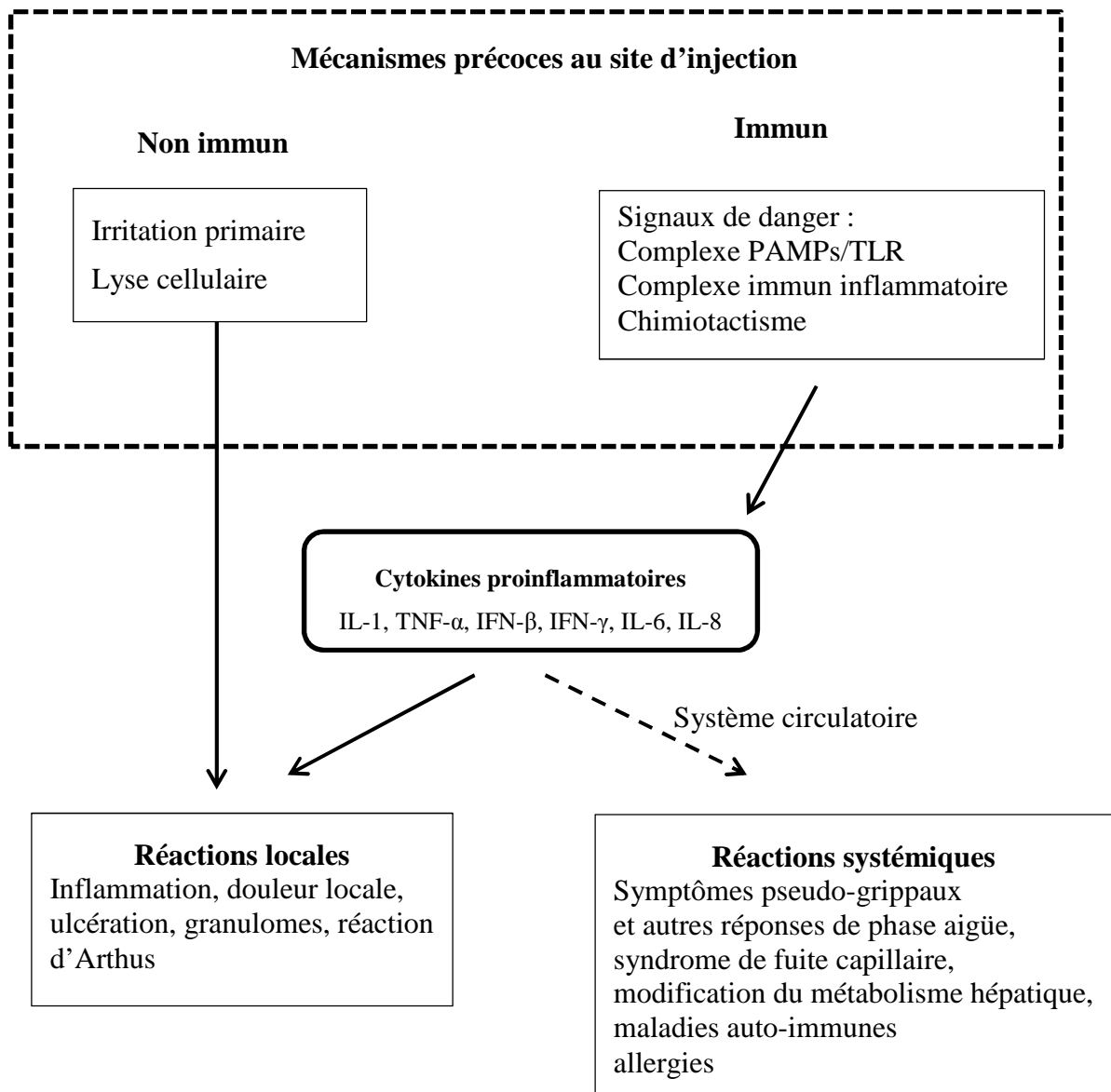


Figure 7 : Représentation des évènements immunotoxiques qui peuvent apparaître après l'utilisation d'adjuvants (34)

4.4.2 Effets locaux

La majorité des réactions indésirables sont produites au site d'inoculation de l'adjuvant. Les réactions les plus courantes sont une réaction inflammatoire locale (sensibilité et un gonflement), alors que les réactions les plus sévères impliquent la formation d'abcès douloureux et des nodules (34).

4.4.2.1 Douleurs locales

Les douleurs locales sont souvent associées à la présence des adjuvants dans les vaccins et sont la conséquence de dommages tissulaires ou de la formation d'une réaction inflammatoire au site d'injection (34).

4.4.2.2 Réaction d'hypersensibilité retardée

L'induction d'une hypersensibilité retardée locale est souvent observée. Elle est due aux cellules immunocompétentes, tel que les lymphocytes T CD4+, CTL, macrophages, capables de sécréter des cytokines inflammatoires migrant au site d'inoculation et provoquant le recrutement des cellules, la formation d'un œdème et la prolifération des fibroblastes.

La formation d'un granulome est une manifestation extrême à l'hypersensibilité retardée locale, due à la formation d'un tissu cicatriciel local induisant une fibrose locale (35).

4.4.2.3 Réaction d'Arthus

Un autre mécanisme potentiel lié à l'effet immunologique local des adjuvants est la réaction d'Arthus qui se caractérise par la formation de complexes immuns inflammatoires au site d'administration entre l'antigène ou l'adjuvant et les anticorps préexistants ou les composants du système du complément. Il s'agit d'un phénomène lié au titre élevé en anticorps induit par l'adjuvant ou à un phénomène d'hyperimmunisation (35).

4.4.2.4 Myofasciite à macrophage

Un phénomène appelé myofasciite à macrophage a été attribué à la persistance de l'hydroxyde d'aluminium pendant des années au site d'une précédente injection intramusculaire. Il se traduit par la présence de macrophages contenant de l'aluminium autour de fibres musculaires de patients vaccinés qui serait à l'origine de signes cliniques variés, tel que des myalgies, fatigue musculaire ou des troubles neurologiques plus controversés (36). Voir partie II section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** – profil d'effets indésirables des sels d'aluminiums.

4.4.3 Effets systémiques

Les réactions systémiques faisant suite à l'administration d'un adjuvant est généralement responsable de leur abandon en vaccinologie pratique. Par conséquent, peu d'observations sur ces effets systémiques sont disponibles. Les effets systémiques sont considérés comme rares et, à l'exception de la réponse inflammatoire, sont souvent sans signes cliniques (ou très atténués).

Les effets indésirables systémiques sont la conséquence de l'hyper-activation des mécanismes immunologiques induits après l'administration d'un vaccin adjuvanté. Ces effets sont souvent médiés par la libération de cytokines (IL-1, TNF, IFN, IL-6...). Ces cytokines sont la conséquence de la réponse immunitaire mais sont impliqués dans la pathogénèse des troubles immunitaires (34).

4.4.3.1 Phase de réponse aiguë de l'inflammation

La phase de réponse aiguë se traduit par un syndrome transitoire caractérisé par des changements dans les protéines plasmatiques associé à de la fièvre et à d'autres symptômes qui accompagnent les effets secondaires typiquement observés dans les symptômes pseudo-grippaux, tel que la fatigue et l'anorexie (35).

Les symptômes pseudo-grippaux sont les principaux effets secondaires rapportés après l'hyperstimulation du système immunitaire. Les symptômes observés sont de la fièvre, des frissons, de la fatigue, des myalgies, des céphalées et des nausées.

4.4.3.2 Induction ou aggravation de maladies auto-immunes

Plusieurs cas d'induction de maladies auto-immune induite par les vaccins ont été rapportés. Ces réactions ont été attribuées principalement à la présence d'adjuvants dans la formulation des vaccins. On leur a attribué le nom de syndrome inflammatoire ou auto-immun induit par les adjuvants (ASIA). Néanmoins, le lien de causalité n'a pas été démontré dans les études épidémiologiques et la preuve de l'implication de la vaccination n'est toujours pas établi.

Ces phénomènes d'auto-immunité induite par les vaccins sont très rares et les facteurs de risques, tels que des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux, seraient impliqués [(35), (37)].

4.4.3.3 Syndrome de fuite capillaire

Le syndrome de fuite capillaire est un effet indésirable grave observé après l'administration d'IL-2, IL-1, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) et d'autres cytokines proposées comme adjuvants dans les vaccins. Ce syndrome se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire, accompagnée d'une extravasation de liquide et de protéines entraînant un œdème interstitiel et une défaillance multiviscérale (38).

L'observation de ce syndrome a entraîné la disqualification des cytokines ayant montré leur implication (perforine et Fas-ligand) comme potentiel composé adjuvant (34) t.

4.4.3.4 Allergies

La question de l'allergie causée par les adjuvants est controversée. La faculté générale des adjuvants aluminiques pour stimuler la production d'IgE dans le cadre de la stimulation de la réponse Th2 et l'augmentation des polynucléaires éosinophiles est bien établi mais le mécanisme n'est pas connu. Cependant, en pratique il a été difficile de démontrer les cas où la vaccination avec les adjuvants aluminiques a entraîné des allergies (34).

Un adjuvant capable d'induire une augmentation des IgE dirigée vers l'antigène doit être considéré comme un risque potentiel au développement de réactions d'hypersensibilités.

4.4.4 Immunotoxicité embryonnaire

Les adjuvants pourraient avoir un effet immunomodulateur sur l'embryon et pourrait affecter le système immunitaire en développement du fœtus. La balance des réponses Th1/Th2 est importante dans la grossesse où les réponses maternelles sont sollicitées vers l'immunité humorale (Th2). Des rapports récents ont révélé qu'un changement vers un profil cytokinique type Th1 pendant la grossesse pourrait augmenter le risque d'anomalies morphologiques fœtales (39). Par conséquent, un vaccin ou un adjuvant qui oriente les réponses immunitaires vers Th1 pourrait, en théorie, avoir des effets néfastes sur le développement embryo-fœtal. En effet, les cytokines, les cellules NK et les lymphocytes T d'origine maternelle sont impliquées dans le processus de reconnaissance du fœtus, le développement du placenta et de la régulation de l'expression génique pendant l'organogénèse. Ainsi, tout effet de la vaccination sur ces cellules et des cytokines peut potentiellement affecter le développement du fœtus.

Actuellement les femmes enceintes sont rarement vaccinées, il n’y a aucune évidence sur le fait que les vaccins sur le marché aient eu des effets toxiques sur la reproduction et par conséquent, peu de ces vaccins ont été sujets à des tests de toxicité sur la reproduction avant d’être administré chez l’homme (40).

Tableau 4 : Réactions locales et systémiques induite par certains adjuvants

| Manifestation toxique | Exemple d’adjuvants |
|--|-------------------------------------|
| <i>Réactions locales</i> | |
| Lyse, ulcération, nécrose | Emulsions à base d’huiles minérales |
| Granulome | Hydroxyde d’aluminium |
| Réaction d’Arthus | Vaccins contenant des toxines |
| Myofaciite à macrophage | Hydroxyde d’aluminium |
| <i>Réactions systémiques</i> | |
| Phase de réponse aigue de l’inflammation | LPS et dérivés, MDP |
| Syndrome de fuite capillaire | IL-2, GM-CSF |
| Induction ou complication de maladies auto-immunes | ACF, Squalènes |
| Allergies | Hydroxyde d’aluminium |

4.5 Impact de la voie d'administration

La voie d'administration choisie peut influencer le profil d'effets indésirables associé aux adjuvants.

4.5.1 Administration sous-cutanée

Avec la voie sous-cutanée, la dose est introduite dans un compartiment contenant de nombreuses cellules nerveuses sensorielles. L'induction d'une inflammation locale peut entraîner une irritation locale, des démangeaisons, un érythème et de la douleur. De plus, ce gonflement transitoire suite à l'inflammation localisée, peut devenir facilement palpable à travers la peau (34).

4.5.2 Administration intramusculaire

Avec la voie intramusculaire, le gonflement peut être moins facilement palpable car il est situé plus profondément dans le tissu. D'autre part, le compartiment musculaire est beaucoup moins innervé par les neurones sensoriels que dans la peau (34).

4.5.3 Administration intra-nasale

Avec la voie intra-nasale, il a été constaté chez l'animal des dommages de l'épithélium muqueux conduisant à la fois à l'absorption de l'antigène mais aussi à des lésions pouvant mener à des infections opportunistes secondaires. Une autre préoccupation est le passage potentiel de l'inoculum dans le cerveau à travers les voies olfactives. Chez l'homme, après l'introduction d'un vaccin antigrippal par voie nasale, il a été établi une association entre la paralysie du nerf facial et l'administration du vaccin (41).

4.5.4 Administration orale

L'administration orale des vaccins est une voie qui offre beaucoup d'intérêt de par sa facilité d'utilisation. Les vaccins contre le rotavirus aujourd'hui disponibles, sont associés à une augmentation faible du risque d'apparition d'invaginations intestinales. Le mécanisme mis en cause n'est pas complètement déterminé mais pourrait être lié soit à la réponse immunitaire induite par la vaccination soit au niveau d'excrétion virale suivant l'administration du vaccin (42).

Une association entre l'invagination intestinale et la vaccination contre le rotavirus a été évoquée pour la première fois en 1999 avec le vaccin Rotashield®. Ce premier vaccin

composé du virus vivant atténué adjuvanté avec une enterotoxine de *E. coli*, a été mis sur le marché en 1998 aux Etats-Unis et retiré en 1999 suite à l'évaluation d'apparitions d'invaginations estimées à 1 cas sur 10.000 doses de vaccin (43).

Néanmoins, le risque d'apparition de cet effet indésirable avec l'utilisation de RotaTeq® ou Rotarix® a été montré très faible, de l'ordre de 1 à 2 cas par 100.000 nourrissons vaccinés (42)

5 PROFIL DES PRINCIPAUX ADJUVANTS UTILISES SUR LE MARCHE

Introduction

Quelques dizaines d'années après l'introduction des sels minéraux, quatre nouveaux adjuvants ont été introduits et sont utilisés dans les vaccins à usage humain¹ :

- Le MF59 (émulsion huile dans eau) développé par Novartis Vaccines ;
- Les liposomes (émulsion huile dans eau) développé par Crucell ;
- Les systèmes adjuvants AS04 et AS03 développés par GSK Vaccines.

Tableau 5 : Principaux adjuvants utilisés dans les vaccins

| Adjuvant | Type | Vaccin |
|------------------|---------------|---------------------------------|
| Sels d'aluminium | Sels minéraux | Divers |
| Virosome | Liposome | Epaxal™ / Inflexal V™ |
| MF59 | Emulsion H/E | Grippe (H5N3, H5N1) |
| AS03 | Emulsion H/E | Grippe pandémique (Prepandrix™) |
| AS04 | MPL+Aluminium | Cervarix™ |

¹ Il faut noter que :

- L'adjuvant AF03 (émulsion à base de squalène) faisant partie de la formulation de Humenza®, vaccin contre la grippe A H1N1 utilisé au cours de la pandémie de 2009, n'est plus autorisé sur le marché à l'heure actuelle ;
- Les sels de calcium ont été abandonnés au profit des sels d'aluminium.

De ce fait, ces 2 adjuvants ne seront pas développés ici.

5.1 Sels d'aluminium

Les adjuvants de la famille des sels d'aluminium, représentés par l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium, sont les composés les plus largement utilisés dans les vaccins actuellement sur le marché du fait de leur sécurité d'utilisation, leur faible prix et leur capacité adjuvante en combinaison à un grand nombre d'antigènes. Leurs effets ont été découverts en 1926 par Glenny mais plus clairement établi dans les années 1930.

Dans le Tableau 6 sont détaillés les différents sels d'aluminium utilisés dans les vaccins.

Tableau 6 : Sels d'aluminium utilisés dans les vaccins

| Formule chimique | Nom | Vaccins |
|--|---------------------------------------|-------------------------|
| $\text{Al}(\text{OH})_3$ | Hydroxyde d'aluminium | Diphtérie, Tétanos, |
| AlPO_4 | Phosphate d'aluminium | Coqueluche, HBV, HAV |
| $(\text{Al})_2\text{PO}_4\text{SO}_4\text{OH}$ | Sulphate d'aluminium hydroxyphosphate | HPV |

5.1.1 Propriétés des sels d'aluminium

5.1.1.1 Préparation

La méthode de préparation la plus communément utilisée est l'adsorption de l'antigène sur un gel d'aluminium préformé. L'adsorption est menée en mélangeant le gel et l'antigène à un pH optimal, sous agitation lente. L'adsorption des antigènes sur l'aluminium dépend des caractéristiques physiques et chimiques de l'antigène, du type d'adjuvant aluminique et des conditions d'adsorptions. Ces conditions sont à prendre en compte car un adjuvant aluminique mal formulé ne donne pas son caractère adjuvant optimal (44).

5.1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques de l'aluminium permettent de jouer sur l'effet de l'adsorption de l'antigène. On distingue 2 types (45) :

- L'hydroxyde d'aluminium est de l'oxy-hydroxyde d'aluminium, $\text{AlO}(\text{OH})$ et a une structure cristalline. L'hydroxyle lié à un métal a des propriétés différentes d'un alcool. Il s'agit d'un hydroxyde métallique qui a la capacité d'accepter un proton et de présenter

une charge positive ou de donner un proton et de présenter une charge négative. De ce fait, l'hydroxyde métallique présente un point isoélectrique de 11,4 et est chargé positivement à pH interstitiel (pH 7,4) favorisant l'adsorption des antigènes chargés négativement.

- Le phosphate d'aluminium est une forme amorphe d'aluminium hydroxyphosphate $\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$. Ce gel est chargé négativement ou alors sans charge à pH neutre. La nature amorphe de ce composé lui confère une surface spécifique importante et une grande capacité d'adsorption des protéines.

5.1.1.3 Morphologie

L'aluminium hydroxyde est un agrégat de particules primaires. Ces particules primaires sont en forme de fibres de la dimension du nanomètre. Les agrégats sont poreux et forment des formes irrégulières de 1 à 20 μm de diamètre.

La morphologie des adjuvants aluminiques contribue à la distribution uniforme des antigènes dans le vaccin après leur mélange. Au cours de la production du vaccin, le mécanisme de formation de ces agrégats est responsable de la distribution des antigènes de façon uniforme dans le vaccin (45).

Dans la Figure 8 et la Figure 9 ci-dessous, sont représentés les adjuvants aluminiques sous forme d'hydroxyde et de phosphate, respectivement.

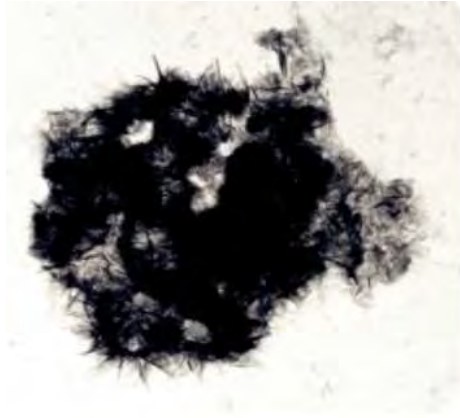


Figure 8 : Micrographie de l'hydroxyde d'aluminium obtenue par microscopie électronique à transmission (x 100 000) (45)

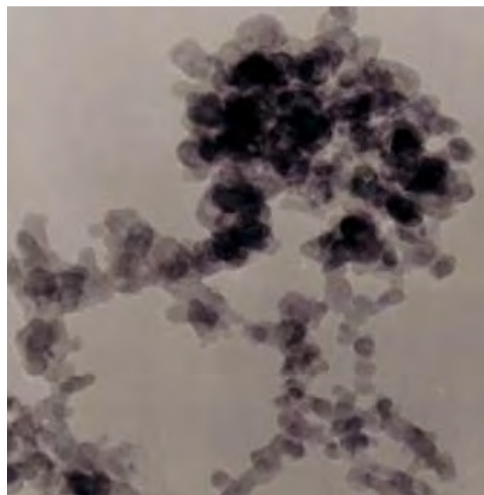


Figure 9 : Micrographie du phosphate d'aluminium obtenue par microscopie électronique à transmission (x 100 000) (45)

5.1.1.4 Mécanisme d'adsorption

Du fait de la structure complexe des antigènes, de nombreux mécanismes sont susceptibles d'intervenir dans le phénomène d'adsorption. Ces mécanismes comprennent les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes, les échanges de ligands, et les forces de van der Waals.

Néanmoins, deux mécanismes prédominent et définissent le résultat de l'adsorption. Ces deux mécanismes sont les interactions électrostatiques et les échanges de ligand.

Les interactions électrostatiques se produisent lorsque l'antigène et l'adjuvant ont des charges opposées. Ces interactions sont favorisées dans un milieu ayant des forces ioniques faibles. Le point isoélectrique des 2 adjuvants aluminiques peuvent être ajustés par traitement (exemple d'une solution phosphate) afin de favoriser l'adsorption.

Les échanges de ligands sont des forces d'adsorption très fortes et peuvent se produire même quand les interactions électrostatiques ont lieu entre l'antigène et l'adjuvant. C'est une interaction covalente qui se produit quand les phosphates de l'antigène se substituent au groupement hydroxyle de l'adjuvant. Les 2 adjuvants peuvent entraîner des échanges de ligand avec des antigènes phosphorylés.

Comprendre le mécanisme prédominant est important car l'élution après administration et exposition au fluide interstitiel dépend du mécanisme d'adsorption. Les antigènes adsorbés par les interactions électrostatiques sont élués plus facilement que les antigènes adsorbés par échange de ligands.

L'adsorption optimale de l'antigène va être dépendante du pH du fait des propriétés physiques différentes des adjuvants aluminiques (charge de surface), de la taille de l'antigène ainsi que de la texture de l'adjuvant qui connaît de grandes variations selon l'encombrement stérique et les sites de liaison disponibles en surface.

Ce phénomène d'adsorption a des impacts directs sur l'activité du vaccin en influençant la réponse immunitaire (45).

5.1.2 Mécanisme d'action

La compréhension du mécanisme d'action des adjuvants aluminiques est restée pendant très longtemps méconnue, ce n'est que depuis quelques années que ce mécanisme a été élucidé. Plusieurs effets de ces adjuvants ont été décrits dans la littérature :

- 1) Une fonction de dépôt au site d'injection permettant une exposition prolongée de l'antigène au système immunitaire (46) ;
- 2) L'activation des cellules du système immunitaire inné en favorisant la capture et la présentation de l'antigène par les CPA conduisant à une réponse type Th2 et à la production d'anticorps (47) ;
- 3) Un effet cytotoxique menant à la libération d'acide urique agissant comme un motif moléculaire associé au danger (DAMP) activant les cellules immunitaires innées (48) ;
- 4) La liaison aux récepteurs Nod-Like (NLR) intracellulaires active l'inflammasome NLRP3 (complexe protéique) et conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β) qui favorise un environnement pro-inflammatoire local et la production d'anticorps (49) ;
- 5) Favorise la production d'éosinophiles qui médie la production précoce d'IgM par les lymphocytes B (46).

5.1.3 Profil d'effets indésirables

5.1.3.1 Profil de sécurité

L'utilisation ancienne des sels d'aluminium a permis de statuer sur le bon profil de sécurité de ces adjuvants. Leur utilisation a montré la réduction de la fréquence et la sévérité des réactions inflammatoires locales et systémiques induites par les antigènes, probablement grâce à leur effet de relargage progressif.

Les principaux effets indésirables rencontrés sont des réactions inflammatoires transitoires et l'induction de granulomes au site d'injection, surtout lorsque celle-ci est sous-cutanée.

Aucun autre adjuvant ne peut égaler les cohortes très complètes disponibles pour les adjuvants aluminiques en termes de données sur les profils de sécurité et d'efficacité, qui couvre plus d'un demi-siècle d'utilisation (50).

5.1.3.2 Aluminium et MMF

Depuis quelques années, la sécurité d'utilisation des adjuvants à base d'aluminium a été remise en question en France suite à l'observation de la persistance de l'aluminium de façon prolongée au site d'injection dans des macrophages rassemblés autour des fibres musculaires en une lésion histologique microscopique nommée « myofasciite à macrophages » (MMF). Cette observation a été faite sur des biopsies musculaires pratiquées sur des patients présentant des symptômes de myalgies et fatigue, en association avec un large éventail d'autres symptômes et entités nosologiques de nature auto-immune.

Afin d'identifier une association éventuelle entre cette image histologique de MMF et une maladie systémique, des études des caractéristiques cliniques, biologiques et surtout épidémiologiques ont été menées mais sont restées négatives. À ce jour, les éléments disponibles montrent que l'aluminium vaccinal peut persister au site d'injection pendant des années (« tatouage vaccinal ») mais ne reflète pas l'existence d'une atteinte inflammatoire musculaire diffuse et n'est pas associé à une maladie systémique spécifique (36).

5.1.3.3 Aluminium et Autisme

Plusieurs controverses mettent en cause les vaccins adjuvantés à l'aluminium dans l'apparition de cas d'autisme chez les enfants. A l'heure actuelle aucun travail n'a démontré de lien de causalité. Les quelques recherches publiées montrant un lien ont été scientifiquement réfutés par les groupes d'experts [(51) (52)].

5.1.4 Les limitations d'utilisation des adjuvants aluminiques

Plusieurs facteurs limitent l'utilisation des sels d'aluminiums dans les vaccins à usage humain (50).

5.1.4.1 Limitations liées au type de la réponse immunitaire

Certaines maladies nécessitent des réponses spécifiques telles que le besoin d'un profil d'anticorps particulier, la stimulation des lymphocytes T et la réponse cytotoxique impliquant les CTL ou encore l'induction d'un profil cytokinique particulier.

Les adjuvants aluminiques sont des stimulateurs de la réponse Th2 or cette réponse n'est pas susceptible de protéger contre les maladies nécessitant une immunité de type Th1 et l'activation des CTL (exemple de la tuberculose).

5.1.4.2 Limitations liées à l'intensité de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire induite lors de la vaccination avec certains vaccins adjuvantés avec des sels d'aluminiums peut être insuffisante pour permettre une protection efficace contre la maladie. Ce phénomène a été observé avec le vaccin de la grippe ou celui de la fièvre typhoïde.

5.1.4.3 Limitations liées aux types d'antigènes

Des études indiquent que les sels d'aluminium ne sont pas les meilleurs adjuvants à utiliser pour les peptides de petite taille (protéines recombinantes et vaccins sous-unitaires). En effet, l'adsorption peut être la cause de la dénaturation d'une partie des épitopes de ces antigènes.

D'autre part, ces adjuvants sont peu efficaces dans l'augmentation du titre en anticorps ou dans l'induction d'une réponse protectrice avec des peptides conjugués. Ceci s'est observé notamment avec les peptides antigéniques de la malaria et du virus de l'herpès (HSV).

5.2 Le MF59

L'adjuvant MF59, développé par Novartis Vaccines, existe sur le marché Européen depuis 1997. Il a été utilisé en premier lieu dans le vaccin contre la grippe saisonnière indiqué chez les sujets âgés. Plus tard, son efficacité a aussi été démontrée pour la grippe pandémique et son indication a été élargie pour les enfants et les populations à risque.

Aujourd'hui l'adjuvant MF59 est autorisé dans le vaccin de la grippe dans plus de 30 pays.

5.2.1 Structure

Le MF59 est une émulsion huile dans eau (H/E), constitué de petites microvésicules (environ 160 nm de diamètre), homogènes et stables, formant une gouttelette lipidique stabilisée par 2 surfactants non-ioniques (53).

5.2.1.1 Les émulsions

Les émulsions consistent en deux phases liquides non miscibles comme l'eau et l'huile. Le composant minoritaire (phase dispersée) est dispersé dans le composant majoritaire (phase continue) et l'émulsion est stabilisée avec des molécules amphiphiles appelées émulsifiants ou tensio-actifs. Deux types d'émulsions ont été développés et sont représentés en Figure 10, les émulsions huile dans eau (A) et les émulsions eau dans huile (B) (53).

Les émulsions huile dans eau sont plus réactogènes et ont, de ce fait, un bon profil adjuvant dans les vaccins.

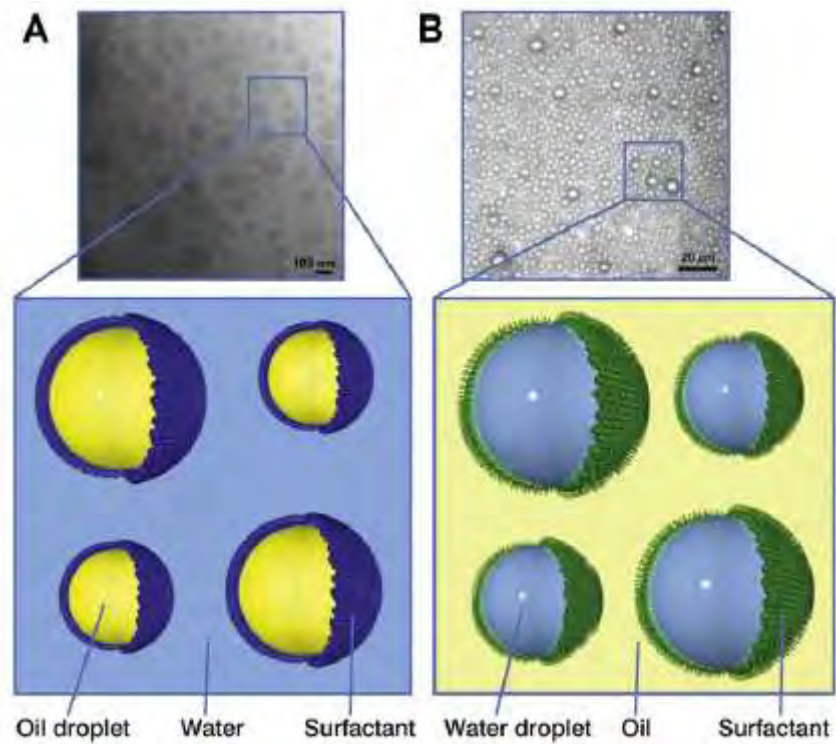


Figure 10 : Structure des émulsions (53)

5.2.1.2 Structure du MF59

Le MF59 possède une partie huileuse composée de squalènes (composant naturel du corps humain, complètement métabolisé) obtenue à partir de foie de requin. Les gouttelettes de squalènes sont stabilisées avec deux surfactants non-ioniques ayant une faible balance hydrophile-lipophile, le polysorbate 80 (Tween 80) et le sorbitan triolate (Span 85), voir Figure 11 (53).

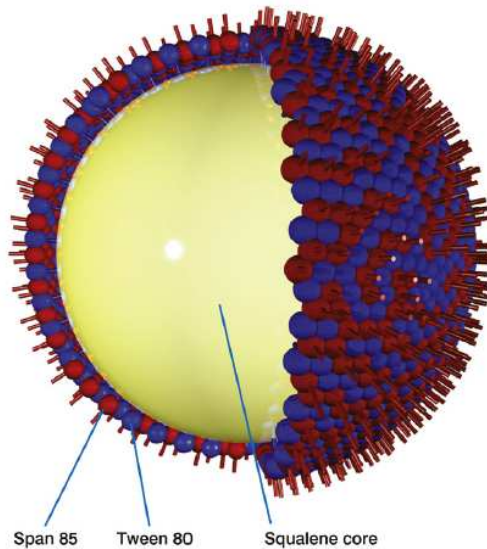


Figure 11 : Structure du MF59 (53)

5.2.2 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'adjuvantité précis du MF59 n'est pas encore complètement déterminé mais plusieurs études ont cherché à élucider ce mécanisme [(54), (55)].

Initialement, le MF59 était classé dans les systèmes de délivrance mais il a été montré qu'il ne créait pas d'effet dépôt au site d'injection. D'autre part, l'antigène ne se lie pas aux gouttelettes d'émulsion, ceci montre que la liaison n'est pas nécessaire pour obtenir un effet adjuvant puissant (contrairement à l'aluminium).

L'adjuvant MF59 induit la création d'un « environnement immunocompétent » au site d'injection. Un mélange de cytokines, chimiokines et autres facteurs sont produits par les cellules résidentes (macrophages et cellules musculaires). Les facteurs chimioattracteurs entraînent le recrutement des cellules immunitaires au site d'injection (macrophage et cellules dendritiques). Le contact avec le MF59 conduit à amplifier le gradient de chimiokines et ce mécanisme amplifie le recrutement des cellules phagocytaires au site d'injection. L'augmentation du nombre de cellules disponibles localement augmente la probabilité d'interactions entre les CPA et les antigènes et accroît le transport des antigènes vers les ganglions lymphatiques. Il en résulte un meilleur déclenchement de la réponse T.

5.2.3 Profil d'effets indésirables

Le MF59 est largement utilisé comme adjuvant dans le vaccin antigrippal. Son large recul d'utilisation et l'étendue des études de pharmacovigilance menées n'ont pas identifié d'effets indésirables sérieux en comparant le vaccin antigrippal adjuvanté avec du MF59 et le vaccin non adjuvanté.

D'une manière générale, aucun effet secondaire grave n'a été relaté jusqu'ici avec les adjuvants huile dans eau et seuls des effets d'intensité faible à modérée, du type douleur, rougeur, induration au point d'inoculation, ou maux de tête et fièvre passagère, ont été reportés [(56), (57)].

5.3 Les systèmes adjuvants (AS)

Les systèmes adjuvants consistent en une combinaison de plusieurs types d'adjuvants dans le but d'augmenter et d'orienter la réponse immune aux antigènes. La famille des AS est développée par GSK Vaccines.

Le premier de la famille est représenté par l'AS04 dans le vaccin contre le papillomavirus Cervarix® enregistré en Europe, aux Etats-Unis, au Japon et à l'international, mais aussi dans un vaccin contre l'hépatite B enregistré uniquement en Europe. Le deuxième est l'AS03 utilisé dans le vaccin pandémique enregistré en Europe et à l'international.

5.3.1 L'AS04

5.3.1.1 Composition

L'AS04 est composé de deux adjuvants : un sel d'aluminium (phosphate ou hydroxyde) et le Monophosphoryl Lipide A (MPL).

5.3.1.1.1 Monophosphoryl Lipide A (MPL)

Le MPL est un dérivé du LPS (lipopolysaccharides) qui est un composé de la membrane des bactéries gram-négatif. Il s'agit d'un motif important reconnu par le système immunitaire inné. Cet adjuvant a la propriété d'être un agoniste des TLR4. Sa structure est représentée dans la Figure 12.

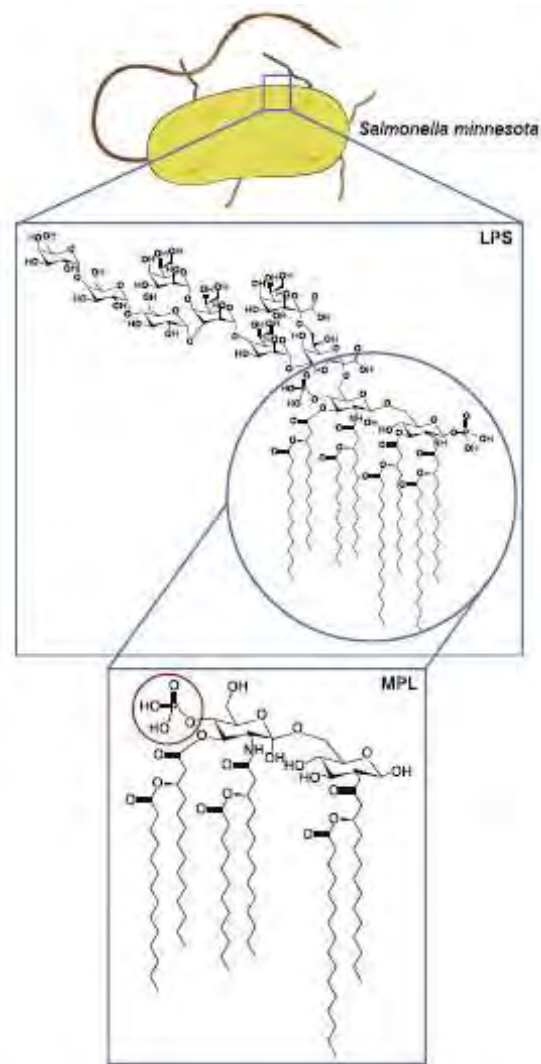


Figure 12 : Structure du MPL (47)

5.3.1.1.2 L'aluminium

Le deuxième composant de l'AS04 est l'aluminium qui est développé dans la section 5.1 - Sels d'aluminium.

La combinaison du MPL avec l'aluminium permet d'améliorer l'efficacité adjuvante et d'orienter la réponse immune.

5.3.1.2 Mécanisme d'action

Le MPL est une nouvelle classe d'adjuvant qui permet de cibler la voie des TLR responsable d'une réponse immune innée localisée conduisant à améliorer la réponse immune adaptative.

Cette formulation est responsable de l'activation des cellules dendritiques et de l'expression des récepteurs TLR4 capable de reconnaître le MPL. Il a été montré avec ce type de formulation que :

- L'activation des CD est plus importante en comparaison à l'aluminium seul ;
- La capture des antigènes par les CD est très améliorée et amplifie la production de cytokines.

L'activation des CD facilite la migration des CPA dans les ganglions lymphatiques. La réponse adaptative induite se traduit par la maturation des cellules T de façon plus importante que lorsque l'aluminium est utilisé seul.

L'utilisation de l'AS04 induit une réponse immunitaire plus forte et plus spécifique. Ceci se traduit par la synthèse d'anticorps spécifiques et la mise en place de la mémoire par les lymphocytes B.

Aucun effet synergique entre MPL et aluminium n'a été démontré. Des études suggèrent que l'aluminium prolongerait la réponse cytokinique de l'AS04 au site d'injection menant à l'activation optimale des CPA [(58) (59)].

5.3.2 L'AS03

5.3.2.1 Structure

L'AS03 est une combinaison de vitamine E (α -tocopherol), de squalène et d'un surfactant (polysorbate 80) dans une émulsion huile dans eau. Cet adjuvant a été initialement utilisé dans le vaccin de la grippe pandémique.

La vitamine E est un lipide soluble antioxydant possédant des propriétés de stimuler le système immunitaire et naturellement présent dans le corps humain.

La structure de l'AS03 est représentée dans la Figure 13 ci-dessous.

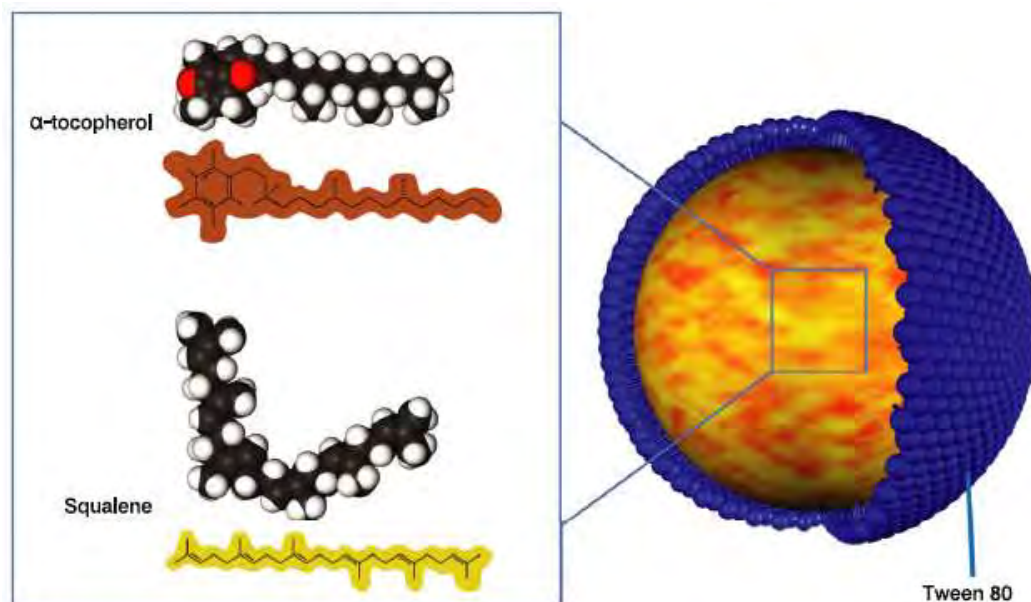


Figure 13 : Structure de l'AS03 (53)

5.3.2.2 Mécanisme d'action

L'AS03 a un impact direct sur le recrutement des monocytes et macrophages dans les ganglions lymphatiques et induit une réponse cytokinique et chimiokinique transitoire entraînant la migration des CPA et leur activation. L'activation des LT CD4+ supporte l'induction de la réponse des cellules B. L'AS03 induit une réponse importante et persistante des anticorps. L'activation des cellules T et B est indirecte.

La présence de la vitamine E dans la formulation de l'AS03 joue un rôle unique en :

- Augmentant le titre en anticorps en comparaison à une formulation sans vitamine E ;
- Favorisant le recrutement des monocytes
- Favorisant la capture de l'antigène par les CPA

La présence de l'AS03 dans le vaccin contre la grippe pandémique a montré qu'il améliorait la persistance des anticorps et induisait une réponse fortes des cellules T et B. D'autre part, cet adjuvant induit le développement d'une immunité croisée contre les souches dérivées du virus qui ne font pas partie du vaccin (60).

5.3.3 Profil de sécurité des AS

5.3.3.1 Sécurité de l'AS04

Les études de sécurité non clinique, clinique ainsi que les études post-marketing menées montrent un profil de sécurité acceptable. L'effet indésirable le plus rapporté est une douleur au site d'injection [(61), (62)].

L'éventualité d'une majoration du risque de survenue de diverses maladies auto-immunes a été examinée à partir des données de deux études épidémiologiques réalisées en France et n'ont pas montré d'association significative entre la vaccination avec le vaccin HPV contenant l'AS04 et le risque de ces maladies auto-immunes. Néanmoins, le recul sur son utilisation ne permet pas encore de statuer sur son profil de tolérance à long terme (63)

5.3.3.2 Sécurité de l'AS03

Le vaccin pandémique adjuvanté avec de l'AS03, Pandemrix™ a été introduit en 2009. En 2010 des inquiétudes quant à l'association possible entre la narcolepsie et le vaccin Pandemrix™ ont été soulevées. En Finlande, une étude de cohorte a été menée et fait état d'un risque

multiplié par 13 de narcolepsie après la vaccination chez les enfants et les jeunes âgés de 4-19 ans (64).

Néanmoins, cette association n'a pas encore été confirmée et l'autorité de santé européenne conseille de restreindre l'utilisation uniquement chez les personnes de moins de 20 ans en l'absence de vaccins saisonniers contre la grippe. D'autres études plus poussées doivent être menées afin de confirmer ou non cette association. (65).

5.4 Liposomes / Virosomes

5.4.1 Structure

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques renfermant un compartiment aqueux. Ce sont des systèmes de délivrance avec des propriétés physico-chimiques qui peuvent être modifiées en ajustant la composition lipidique, la méthode de préparation et en ajoutant des composants immunopotentialisants qui peuvent être associés, encapsulés ou intercalés dans la membrane lipidique (66).

Le virosome est un liposome avec des glycoprotéines d'enveloppe virale et les antigènes viraux les plus importants pour la réponse immunitaire. Il imite le virus intact (67).

Plusieurs vaccins adjuvés avec des virosomes sont approuvés et commercialisés en Europe pour la vaccination contre l'hépatite A (Epaxal™) et contre la grippe (Inflexal V™ et Invivac™).

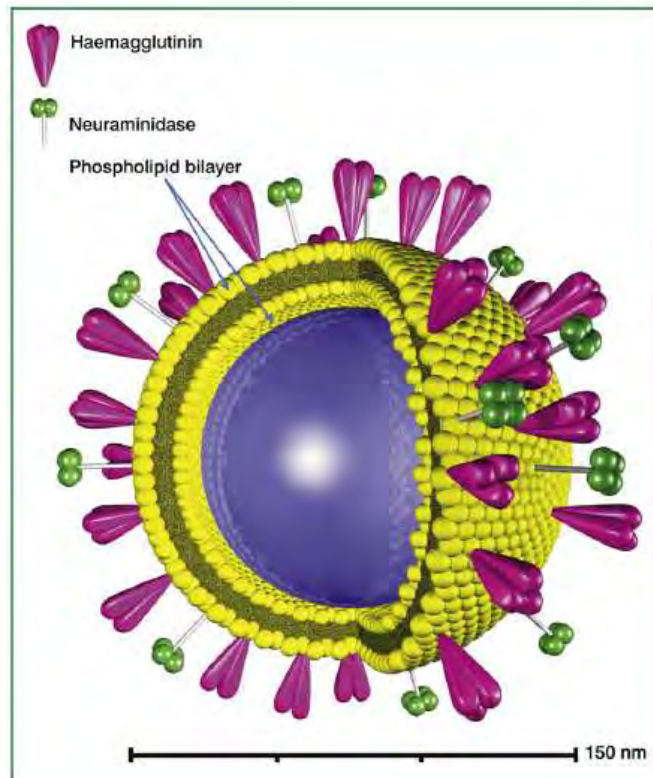


Figure 14 : Structure d'un virosome (53)

5.4.2 Mécanisme d'action

Les virosomes ont deux fonctions :

- Une fonction transport, l'antigène est stabilisé et protégé ;
- Une fonction d'immunostimulation du système immunitaire.

La taille et la structure des virosomes leur permettent d'être internalisés par les CPA et imitent les voies naturelles de présentation au système immunitaire. Ils entraînent l'activation, soit des voies de différenciation de cellules B productrices d'anticorps spécifiques, soit une réponse des cellules T cytotoxiques, suivant le type pathogène [(67), (68)].

5.4.3 Profil de sécurité

L'utilisation de virosome dans le vaccin Epaxal® a montré une amélioration de la tolérance locale en comparaison à l'utilisation des sels d'aluminium dans un vaccin contenant la même formulation en antigène. Les effets indésirables les plus rapportés sont des douleurs locales, des indurations et des rougeurs au site d'injection (66).

Les liposomes sont des systèmes de délivrance qui intéressent beaucoup les chercheurs. Plusieurs adjuvants de ce type sont rapportés dans la littérature et sont actuellement en développement (exemple de l'AS01).

**CHAPITRE 3 : ENVIRONNEMENT
REGLEMENTAIRE DES
ADJUVANTS**

INTRODUCTION

Le développement de nouveaux adjuvants, soutenu par de meilleures connaissances dans les réponses immunitaires, motivé par la nécessité de potentialiser l'immunogénicité des antigènes et par le besoin de répondre aux attentes de certaines populations ayant une réponse immunitaire faible, se heurte à de nombreux défis :

- Les préoccupations de sécurité et de réactogénicité ;
- Les difficultés au niveau de la production (mise à l'échelle, qualité de chaque lot et stabilité) ;
- La sélection des critères d'efficacité et de sécurité clinique ;

Malgré le fait que la recherche et le développement de nouveaux adjuvants se poursuit depuis une dizaine d'années, très peu de composés sont actuellement autorisés sur le marché. Les sels d'aluminium ont été les premiers à recevoir une autorisation de mise sur le marché et sont de ce fait, les plus couramment utilisés dans un grand nombre de vaccins.

L'approche réglementaire actuelle suivie par les autorités de santé n'est pas harmonisée. L'Agence de santé Européenne pour les produits de santé (*European Medicines Agency*, EMA) est relativement ouverte quant aux nouveaux adjuvants candidats à la commercialisation tandis que l'Agence de santé Américaine (*Food and Drug Administration*, FDA) adopte une attitude plus prudente, s'appuyant sur l'assurance de la bonne connaissance d'adjuvants plus anciens.

On compte à l'heure actuelle cinq adjuvants autorisés en Europe qui sont les sels minéraux, le MF59, l'AS04, l'AS03 et les virosomes (détaillés dans la partie II).

Seul deux de ces adjuvants sont autorisés dans les vaccins par la FDA. Il s'agit des sels l'aluminium et depuis 2009 de l'AS04.

1 CADRE REGLEMENTAIRE DES ADJUVANTS

1.1 Contraintes réglementaires et freins au développement

1.1.1 Le manque d'universalité des adjuvants

Le manque d'universalité dans la réponse immunitaire induite et dans les structures des adjuvants, constitue le principal obstacle à l'utilisation de nouveaux adjuvants dans les vaccins. Il est à l'origine de difficultés de prédiction et soulève alors la question de la sécurité d'utilisation.

1.1.2 Approche au cas par cas

Lors du développement du vaccin, les données de sécurité et d'efficacité obtenues avec l'utilisation d'une combinaison vaccin/adjuvant ne peuvent pas être utilisées pour remplacer et établir le profil de sécurité et d'efficacité d'une autre combinaison ou d'une même combinaison administrée par une voie différente. Il s'agit d'une approche au cas par cas pour obtenir une autorisation d'utilisation car c'est la combinaison vaccin/adjuvant ainsi que la voie d'administration qui sont évalués et autorisés (69).

1.1.3 La sécurité au centre des préoccupations

En raison de la complexité de l'interaction antigène-adjuvant, la mise en place de lignes directrices réglementaires applicables aux vaccins est également difficile. La prudence reste la priorité des autorités. Grace aux études précliniques et cliniques il est possible de détecter précocement une réactogénicité importante et rédhibitoire pour une utilisation à grande échelle. Pour ce faire, des échantillons de population de plus en plus importante sont exigés (69).

1.2 Accès aux adjuvants : Initiatives Internationales

La nécessité de rechercher de nouveaux adjuvants a entraîné une réelle prise de conscience dans le domaine de la recherche ces dernières années et de nombreuses organisations privées et publiques s'y sont impliquées. Ce domaine de recherche est maintenant reconnu comme une discipline scientifique indépendante grâce à des initiatives récentes.

1.2.1 En Europe

En 2003, un comité consultatif européen pour les adjuvants a été mis en place, il s'agit de l'*European Adjuvant Advisory Committee* (EAAC). L'EAAC comprend essentiellement des sociétés de biotechnologie et les grands fabricants de vaccins, ainsi que des groupes académiques. Il a été créé pour agir en tant que voie de consensus pour ceux qui travaillent dans la recherche sur les adjuvants en Europe, et a pour ambition de supporter la formation d'un environnement de recherche européen sur les adjuvants (70).

1.2.2 A l'échelle internationale

Afin de promouvoir l'accès au savoir-faire et aux technologies des adjuvants aux développeurs de vaccins du secteur public et les fabricants de vaccins des pays en développement, le *Global Adjuvant Development Initiative* (GADI) a été créé. Le GADI est hébergé par l'OMS et a pour objectif de faciliter l'évaluation des nouveaux adjuvants, de promouvoir et de faciliter l'accès aux adjuvants et aux informations sur les adjuvants ainsi que de promouvoir les transferts de technologies. Les connaissances et les formations liées à l'utilisation des adjuvants générées par GADI sont mises à disposition du secteur public à travers un réseau d'instituts de développement de vaccins et de laboratoires. Ce réseau, appelé AdjuNet, est créé pour faciliter le partage des données afin de minimiser la duplication des études et de s'assurer que les vaccins utilisant des adjuvants fournis par GADI sont mis à la disposition des pays en développement à des prix abordables (71). Cette organisation permettrait notamment de créer et de maintenir une base de données publique pour la formulation et l'analyse des systèmes adjuvants prometteurs permettant ainsi à divers laboratoires de formuler des vaccins candidats de manière optimale et reproductible (25).

1.3 Les acteurs de la réglementation des adjuvants

1.3.1 L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

- Présentation :

Le rôle et les responsabilités de l'OMS dans le domaine de la vaccination sont les suivants (72) :

- Soutenir et faciliter la recherche et le développement ;
- Améliorer la qualité et l'innocuité des vaccins ;
- Elaborer des recommandations générales et des stratégies afin d'optimiser l'utilisation des vaccins et de permettre au plus grand nombre d'en bénéficier ;
- Faciliter l'élimination des obstacles financiers et techniques à l'introduction des vaccins et des technologies ;
- Aider les pays à acquérir les compétences voulues et à développer l'infrastructure nécessaire pour offrir des services de vaccination au plus grand nombre et parvenir à éradiquer les maladies ;
- Fournir une assistance technique le cas échéant ;
- Développer et pérenniser la collaboration entre les partenaires ;
- Contrôler la réalisation des objectifs mondiaux en matière de vaccination.

- Actions :

Grâce à son approche consultative, l'OMS identifie et regroupe les opinions consensuelles actuelles sur les principales questions de réglementation, et les communique aux autorités nationales et aux fabricants par le biais de documents d'orientations portant sur des questions générales et des produits spécifiques. A travers ce mécanisme, les autorités réglementaires nationales sont informées des connaissances scientifiques nécessaires à l'évaluation des questions critiques, et sont conseillées sur les approches réglementaires et méthodologiques optimales pour assurer l'approvisionnement mondial de médicaments biologiques de qualité et d'efficacité élevées (73)

L'OMS a eu un rôle important dans la mise en place d'une réglementation autour de l'utilisation de nouveaux adjuvants en facilitant le dialogue entre la communauté scientifique,

les industriels et les organismes de réglementation. Cette organisation permet de centraliser les données de sécurité et sert de référentiel en assurant le dialogue et le conseil pour la définition des normes scientifiques et techniques relatives aux adjuvants et leur sécurité ce qui a permis ainsi de garantir une réglementation cohérente (74).

1.3.2 Réglementation européenne

1.3.2.1 La Pharmacopée Européenne

- Présentation :

La Pharmacopée Européenne (PE) est un ouvrage de référence pour le contrôle de la qualité des médicaments au sein des pays signataires de la Convention (75) relative à son élaboration. Elle a été créée en 1964 dans le but de normaliser la qualité des médicaments et de les certifier. Les produits concernés sont les principes actifs, les produits biologiques et les vaccins. Les normes officielles qui y sont publiées fournissent une base juridique et scientifique au contrôle de la qualité pour le développement, la production ou la commercialisation des produits. Tous les produits doivent répondre aux normes de qualité de la PE pour être mis sur le marché des Etats signataires (76).

- Contenu :

La monographie 0153 relative aux « vaccins à usage humain » est présentée dans la PE. Celle-ci autorise l'utilisation d'adjuvants autres que les sels d'aluminium et de calcium, mais des exigences spécifiques sont établies uniquement pour les adjuvants adsorbants. Cette monographie spécifie également qu'un ou plusieurs adjuvants peuvent être inclus dans la formulation ou peuvent être présentés séparément.

Les monographies spécifiques (2.5.13 pour l'aluminium et 2.5.14 par le calcium) indiquent les essais auxquels doivent satisfaire ces adjuvants.

Des spécifications sont établies pour chaque adjuvant, seuls ou combinés avec un ou plusieurs antigènes. Elles décrivent notamment les caractéristiques moléculaires et biologiques jugées les plus utiles pour assurer la sécurité et l'efficacité. Elles insistent également sur le fait que la stabilité de chaque adjuvant seul ou en combinaison avec des antigènes doit être démontrée, particulièrement pendant les étapes critiques des études de développement (77).

1.3.2.2 L'Agence Européenne du Médicament (EMA)

- Présentation :

La mission principale de l'EMA est la protection et la promotion de la santé publique et animale en Europe. L'EMA est l'organe de l'Union Européenne (UE) chargée de coordonner les ressources scientifiques existantes mises à sa disposition par les Etats Membres pour l'évaluation, la surveillance et la pharmacovigilance des médicaments. Parmi toutes ces missions, l'EMA formule des recommandations indépendantes fondées sur des preuves scientifiques et sur l'état des connaissances actuelles (78). Au sein de l'EMA, le comité des médicaments à usage humain CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) est responsable de la préparation des opinions de l'Agence sur toutes les questions concernant les médicaments à usage humain, conformément à la réglementation CE n°726/2004 (79).

- Réglementation :

C'est en 2002 que la question d'une réglementation autour des adjuvants s'est posée en Europe après un document de réflexion rédigé par le CPMP (*Committee for Proprietary Medicinal Product*, ex-CHMP). Ce premier document sur les exigences pour l'évaluation des nouveaux adjuvants dans les vaccins, met en évidence le développement prometteur de nouveaux vaccins et d'adjuvants issus de nouvelles technologies ainsi que l'absence de lignes directrices réglementaires pour l'évaluation de ces nouveaux adjuvants (80).

Le CHMP a mis en place un groupe d'experts sur les vaccins appelé le VEG (*Vaccine Expert Group*) qui supervise certaines questions en rapport avec les vaccins, notamment sur le développement de nouveaux adjuvants. Ce groupe a publié en 2005 la première ligne directrice relative aux adjuvants dans les vaccins sur les sujets de qualité, de sécurité non-clinique et d'efficacité clinique « *Guideline on Adjuvants in Vaccines* » (81). Cette ligne directrice est applicable à la fois pour les adjuvants déjà connus et les nouveaux.

La liste des adjuvants couverts par cette ligne directrice inclut :

- Les sels minéraux d'aluminium et de calcium ;
- Les émulsions eau dans huile et huile dans eau, tel que le MF59 et le Montanide ;
- Les particules, telles que les nano/microparticules, ou des sphères, dendrimères, véhicules inertes, les adjuvants à base de lipide (liposomes, virosomes, ...) ;
- Les dérivés microbiens (CpG oligodeoxynucléotides, muramyl dipeptide, MPL, endotoxines bactériennes,...) ;

- Les immunomodulateurs endogènes humains (facteurs de stimulation des colonies granulocyte-macrophage et interleukines) ;

Néanmoins, tout autre adjuvant en développement non cité dans la ligne directrice doit répondre à ces exigences.

En plus des adjuvants, cette ligne directrice est applicable aux immunomodulateurs. Ils sont définis comme des composés pouvant être administrés séparément du vaccin et qui agissent exclusivement sur le système immunitaire. De façon similaire, une note explicative publiée en 2006 statue que les principes appliqués aux adjuvants dans les vaccins sont applicables aux immunomodulateurs (82)

1.3.3 L'Agence de Santé Américaine (FDA)

- Présentation :

La FDA (*Food and Drug Administration*) est responsable aux Etats-Unis de la protection de la santé publique en assurant la sécurité, l'efficacité et l'innocuité des médicaments à usage humain et vétérinaire, des vaccins et autres produits biologiques, des dispositifs médicaux, des cosmétiques, des suppléments alimentaires, de l'approvisionnement alimentaire, et des produits dégageant de la radioactivité.

Le centre de la FDA pour l'évaluation des produits biologiques et de la recherche ou CBER (*Centre for Biologics Evaluation and Research*), est responsable de la réglementation des vaccins aux Etats-Unis. Le CBER a pour mission de protéger et d'améliorer la santé publique, en assurant la sécurité, l'efficacité et la disponibilité de ces produits. Il fournit également l'information au public pour promouvoir leur bonne utilisation (83).

- Réglementation

Pour les vaccins, les requis réglementaires sont principalement décrits dans la section 351 de la loi de santé publique (*Public Health Service Act*) et dans certains articles spécifiques de la loi fédérale (*Food, Drug and Cosmetic Act*).

La section 610.15 du CFR (Code of Federal Regulation) (84) relative aux composants constituant les produits biologiques, décrit les exigences réglementaires spécifiquement applicables aux adjuvants. Il est précisé qu'un adjuvant, comme tout autre composant d'un vaccin, doit répondre aux normes de pureté et de qualité généralement acceptées. Ces

informations sont généralement fournies sous forme d'un certificat d'analyse qui répertorie les résultats des différents tests en vue de l'autorisation de mise en circulation du lot d'adjuvants qui sera utilisé dans la formulation du vaccin. Deuxièmement, il est stipulé qu'un adjuvant ne doit pas être introduit dans un produit à moins qu'il n'existe une preuve satisfaisante que l'adjuvant n'affecte pas négativement la sécurité ou la puissance du produit. La section 312.23 du CFR (85) relatif aux investigations non-clinique et clinique recommande et reconnaît l'utilisation des lignes directrices de l'OMS en vigueur.

Dans les instructions publiées par le CBER et destinées aux industriels "*Guidance for Industry for the Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies*", il est décrit que l'adjuvant est considéré comme un excipient faisant partie de la formulation, et doit de ce fait être compatible avec les autres composants. Dans le cas d'adjuvants adsorbants, le producteur doit montrer l'efficacité et la cinétique d'adsorption de chaque composant adsorbé par l'adjuvant (86). Seul le cas des vaccins contenant un adjuvant aluminique adsorbant est décrit dans cette ligne directrice.

2 ENREGISTREMENT DES VACCINS ADJUVANTES EN EUROPE

Un adjuvant seul n'a pas d'autorisation de mise sur le marché, c'est la formulation adjuvant/antigène qui est autorisée. Ceci implique que le développement d'un adjuvant est étroitement lié à celui d'un antigène dans une formulation spécifique.

Les procédures réglementaires relatives aux vaccins aux Etats-Unis et en Europe ne sont pas harmonisées, il n'existe pas de reconnaissance mutuelle des licences ou de libération des lots des vaccins. Les autorités de santé de ces 2 régions conseillent de prendre en considération les lignes directrices de l'*International Committee of Harmonization* (ICH), formant une base pour une harmonisation partielle.

L'ICH a été mise en place en 1990 réunissant les autorités réglementaires et les industries pharmaceutiques de l'Europe, des États-Unis et du Japon. Il fournit des lignes directrices pour les produits pharmaceutiques à usage humain, y compris les produits biologiques (81).

2.1 Format du dossier de soumission

2.1.1 Demande d'essai clinique : IMPD

Avant la demande de mise sur le marché, l'industriel est tenu de procéder à des études cliniques sur son produit en développement.

Les dossiers de demande d'essai clinique sont soumis auprès de l'autorité compétente. Ce dossier est l'IMPD en Europe (Investigational Medicinal Product Dossier) (87).

Les informations qui y sont présentées sont :

- La pharmacologie du produit chez l'animal et les études de toxicologies ;
- Les informations sur la composition, la production, la stabilité et le contrôle du produit testé ;
- Les protocoles d'essais cliniques et les informations sur l'investigateur.

2.1.2 Demande d'enregistrement : CTD

Le *Common Technical Document* (CTD) est un format commun de présentation du dossier de demande d'AMM initié par l'ICH. Le dossier présente les données de qualité, de sécurité et d'efficacité des produits de santé afin de faciliter l'évaluation et l'enregistrement des produits

de santé. Aujourd'hui, le dossier d'enregistrement est soumis dans un format électronique harmonisé (eCTD).

Le CTD est organisé en cinq modules. Le module 1, qui regroupe les informations administratives et les informations de prescription, est spécifique à chaque région. Les modules 2, 3, 4 et 5 sont eux communs à toutes les régions de soumission.

Le module 2 contient le résumé de chaque partie du CTD. Il fournit le résumé de la partie qualité (*Quality Overall Summary*) ainsi que le résumé détaillé de la partie non-clinique et clinique

Le module 3 contient les informations sur les sujets de qualité, le module 4 contient les rapports des études non-cliniques et le module 5 contient les rapports des études cliniques (88).

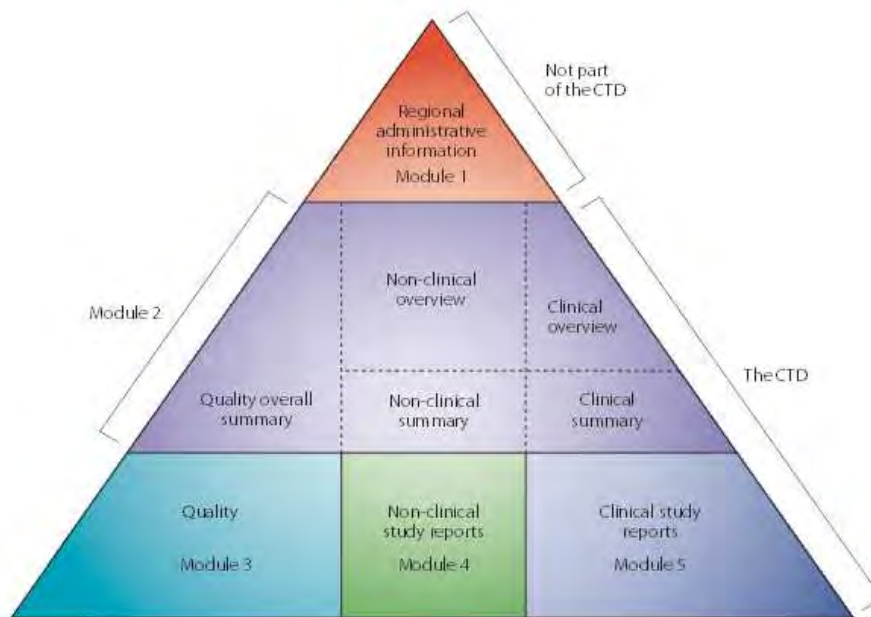


Figure 15 : Représentation schématique de la composition du dossier CTD

2.2 Rappel sur les procédures d'enregistrement en Europe

Les vaccins doivent obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour être vendus en Europe. Cette AMM est accordée après l'évaluation du rapport bénéfice/risque du vaccin basée sur des données de qualité, d'efficacité et de sécurité. Le respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF), de laboratoire (BPL) et cliniques (BPC) est également vérifié par les autorités de santé avant l'approbation de l'AMM (89).

2.2.1 La procédure centralisée

L'évaluation du vaccin par cette procédure est effectuée par l'EMA, basée à Londres. Une seule demande d'AMM est envoyée à l'EMA et évaluée par le CHMP. La décision finale est prise par la Commission Européenne (située à Bruxelles) qui émet l'AMM. L'AMM obtenue est valide dans les 28 pays de l'Union Européenne, ainsi qu'en Islande, au Liechtenstein et en Norvège.

Cette procédure est obligatoire pour les médicaments utilisant des procédés biotechnologiques innovants et peut être utilisée pour les produits présentant un intérêt à l'échelle européenne de santé publique tels que les vaccins pandémiques ou les vaccins en développements contre des affections graves telles que le VIH. Néanmoins, si le vaccin ne répond pas à ces critères, il ne peut pas être évalué par ce type de procédure.

2.2.2 Procédure de reconnaissance mutuelle (MRP)

Cette procédure est applicable pour la plupart des médicaments conventionnels. Il s'agit d'une procédure à deux étapes basée sur l'évaluation et l'approbation d'un dossier d'enregistrement par un « Etat membre de référence » et la reconnaissance de l'approbation de l'Etat membre de référence par les autres pays européens, les « Etats membres concernés ».

Les candidats peuvent choisir l'Etat membre de référence et les Etats membres concernés. Cette procédure permet d'obtenir des AMM nationales dans chacun des pays.

2.2.3 Procédure décentralisée (DCP)

Depuis 2005, la DCP est proposée en alternative à la MRP. Il s'agit d'une procédure de collaboration menée par un Etat membre de référence et vise essentiellement les nouveaux produits qui n'ont encore aucune autorisation. Cette procédure permet également d'obtenir des AMM nationales dans chacun des pays.

2.2.4 La procédure nationale

Lorsque l'enregistrement est souhaité que dans un pays uniquement, on parle de procédure nationale. Le produit est évalué par l'autorité compétente du pays. Avec l'Europe ce type de procédure est maintenant très peu utilisé.

3 ÉVALUATION RÉGLEMENTAIRE SCIENTIFIQUE DES NOUVEAUX ADJUVANTS

L'évaluation du dossier d'enregistrement se fait suivant trois axes principaux : la qualité, la sécurité et l'efficacité.

3.1 Evaluation de la qualité

3.1.1 Objectif

Le module 3 (module qualité) du dossier d'enregistrement au format CTD comprend les parties *3.2.S* et *3.2.P* qui sont respectivement relatives à la substance active et au produit fini du vaccin. Dans le cas d'un vaccin avec un nouvel adjuvant, l'adjuvant, par lui-même, est décrit, au même titre que le vaccin, avec un niveau de détail type CTD. Des parties *3.2.S* et *3.2.P* sont soumises.

Ce module décrit l'ensemble du procédé de fabrication de l'adjuvant depuis la provenance des matériaux primaires jusqu'à l'obtention de l'adjuvant final. La qualité et la reproductibilité du procédé doit être démontré par l'identification des étapes critiques de fabrication, la validation des équipements et par des tests de qualité tout au long du procédé.

3.1.2 Cadre réglementaire

Pour tout produit pharmaceutique, le producteur est tenu de prendre en compte les lignes directrices scientifiques adoptées par le CHMP. De plus, la partie qualité du dossier de soumission est tenue d'appliquer les monographies générales et les chapitres généraux de la PE.

Le procédé de fabrication d'un produit doit répondre aux exigences décrites dans la directive 2003/94/CE de la Commission qui établit les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain.

Les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication portent principalement sur le personnel, les locaux et les équipements, la production, la documentation, le contrôle de la qualité et l'étiquetage, le contrat d'entreprise ainsi que les inspections, les réclamations et les rappels de produits (90).

Plusieurs lignes directrices scientifiques publiées par l'EMA, l'ICH ou l'OMS sont disponibles exposant les exigences requises pour la démonstration de la qualité des vaccins.

3.1.3 Informations requises pour l'évaluation

Les principales informations prises en compte pour l'évaluation réglementaire d'un dossier concernent la caractérisation et la formulation de l'adjuvant.

3.1.3.1 Caractérisation de l'adjuvant

L'adjuvant doit être décrit en utilisant des méthodes de caractérisation. Des tests validés permettant l'identification du composé sont mis en place en routine à différentes étapes de la production ainsi qu'à la libération des lots. Ceci permet d'assurer la qualité et la reproductibilité de chaque lot.

La caractérisation de l'adjuvant doit comprendre :

- Une description complète de l'adjuvant ainsi que la fonction de chaque composant ;
- La composition qualitative et quantitative en adjuvant ;
- L'identification et le contrôle des paramètres jugés critiques pour l'obtention des propriétés désirées de l'adjuvant au cours du procédé de fabrication ;
- Les caractéristiques physiques, telles que l'apparence visuelle, la densité, la viscosité, le pH, la granulométrie, la charge de surface et l'hydrophobicité des particules ;
- Les caractéristiques biochimiques, telles que l'adsorption, la liaison ou couplage à l'antigène ;
- La pureté chimique et microbiologique (par exemple, le contenu en endotoxine, la biocontamination, les produits de dégradations ou résiduels).

Les tests effectués au cours de fabrication et les spécifications associées pour les produits intermédiaires, le vac, le produit fini et la durée de vie sont fixés en fonction des données analytiques obtenues sur des lots cliniques.

Dans les cas où l'adjuvant et l'antigène sont mis en contact au moment de l'administration, le procédé extemporané doit être validé par l'évaluation des effets de la variation des conditions du mélange. Pour les préparations multidoses, l'uniformité de dosage (de l'antigène et de l'adjuvant) au cours du temps devrait être étudiée. Une attention particulière doit être

accordée à la traçabilité de l'ensemble des composants du vaccin, y compris des adjuvants, afin de pouvoir évaluer des possibles conséquences sur la stabilité du produit fini.

3.1.3.2 Formulation adjuvant/antigène

La qualité d'une formulation adjuvant/antigène est évaluée à travers plusieurs aspects décrits ci-après :

- L'identification et le suivi des étapes critiques du procédé de fabrication qui peuvent avoir un impact sur la qualité de la combinaison adjuvant-antigène, telles que les propriétés d'adsorption ou de liaison ;
- La caractérisation du mécanisme d'association de l'adjuvant avec l'antigène doit être décrit et l'homogénéité de la liaison doit être évaluée ;
- Une caractérisation biochimique complète ;
- La démonstration de la compatibilité de l'adjuvant avec les composants antigéniques présents dans le vaccin ;
- La preuve d'une association cohérente et stable de l'antigène avec l'adjuvant ;
- L'effet de l'adjuvant sur la capacité d'analyse de l'antigène.

Le produit fini est sujet à des tests de puissance, d'identité et de stabilité respectant les exigences applicables en vigueur dans les lignes directrices du CHMP et de la PE. Des considérations spécifiques pour les tests et les études de stabilité doivent néanmoins être définies. En effet, l'adjuvant peut interférer sur l'antigène et avoir un impact sur certains tests standard réalisés sur le produit fini (91).

3.2 Evaluation de la sécurité

Actuellement, les évaluations précliniques et cliniques fournissent l'ensemble des informations de sécurité pour la mise sur le marché d'un nouveau vaccin. De plus, la compréhension du mécanisme d'action de l'adjuvant complète ces évaluations et apporte un éclairage sur le profil d'innocuité.

3.2.1 Sécurité préclinique

3.2.1.1 Objectif

Etant donné que les vaccins sont administrés à des sujets sains et majoritairement à des enfants, des études de sécurité précliniques sont requises. Il s'agit d'une étape importante avant de procéder aux études de développement clinique. Au cours de ces études, les modèles animaux sont utilisés pour identifier la dose optimale adjuvant/antigène, en mesurant les changements dans les paramètres hématologiques et immunologiques, et évaluer la toxicologie. Ceux-ci permettent d'évaluer l'efficacité ainsi que la toxicité du produit donnant ainsi des orientations pour la phase I des essais cliniques ou alors d'arrêter précocement le développement d'un composé trop toxique (32).

3.2.1.2 Lignes directrices

Compte tenu des progrès réalisés dans la conception de vaccins, des lignes directrices détaillées pour les expérimentations précliniques des vaccins ont été établies par les autorités de santé.

Une ligne directrice générale relative aux tests de pharmacologie préclinique et toxicologique a été publiée par le CPMP, la « *Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines* » (92).

Il y a principalement deux lignes directrices pour l'évaluation de la sécurité des adjuvants : « *Guideline on adjuvants in vaccines for human use* » (91) rédigée par le CHMP, et les, « *WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines* » (93) rédigées par l'OMS.

Le message principal qui ressort de ces textes est que l'évaluation et les études se font essentiellement au cas par cas.

3.2.1.3 Informations requises pour l'évaluation

Les autorités de santé demandent que la valeur ajoutée d'un adjuvant dans une formulation en comparaison à une forme non adjuvannée soit démontrée. La ligne directrice de l'EMA suggère d'établir un profil de sécurité pour une formulation non adjuvannée en parallèle de l'adjuvannée.

L'addition de l'adjuvant doit être justifiée en considérant 3 perspectives :

- Le bénéfice immunologique : comparaison de l'immunogénicité avec une formulation non adjuvannée ou utilisant un adjuvant connu (tel que l'aluminium) ;
- La réponse immune désirée ;
- Dans le cas de l'utilisation de plusieurs composés, l'évidence d'une valeur ajoutée.

La ligne directrice européenne mentionne de faire l'évaluation et la comparaison aux adjuvants bien connus sur des modèles non-cliniques. Tous ces aspects doivent être adressés avant les études cliniques chez l'homme.

D'autre part, l'évaluation de l'adjuvant seul, ainsi que de la combinaison adjuvant-antigène sont recommandées.

Les études non cliniques réalisées sur l'adjuvant seul incluent (91) :

- La toxicité à dose unique et la tolérance locale,
- L'induction d'une hypersensitivité et anaphylaxie,
- L'effet pyrogène,
- La toxicité à dose répétées pour évaluer l'atteinte systémique
- La toxicité de reproduction,
- Des études de génotoxicité

Dans le cas des études sur la combinaison adjuvant/antigène, des tests de tolérance locale et de toxicité à doses répétées sont effectués. De plus, la caractérisation de la nature et de l'étendue de la réponse immune doit être déterminée.

3.2.2 Sécurité clinique

Le profil de sécurité de l'adjuvant est également évalué à travers l'ensemble des quatre phases de développement clinique du vaccin.

On distingue trois phases dans le programme de développement clinique des médicaments. La phase I fait suite à la phase préclinique d'un vaccin candidat. Il s'agit principalement des études de sécurité et permettent également de valider le dosage. La phase II comprend la « démonstration du concept » d'immunogénicité (et de l'efficacité). La phase III permet de déterminer la capacité du vaccin candidat à produire l'effet clinique désiré à la dose optimale avec un profil de sécurité acceptable. Ces études sont menées en parallèle du développement des lots de consistance du vaccin (lots permettant de démontrer la qualité biologique et physicochimique ainsi que la reproductibilité du procédé de production).

En complément, les essais de phase IV permettent d'assurer la surveillance de la sécurité post commercialisation (pharmacovigilance). Ces études sont conçues pour détecter des événements indésirables très rares en raison du grand nombre de données disponibles dans des conditions normales d'utilisation et difficilement identifiables au cours des études cliniques.

La taille des essais cliniques peut ne pas être suffisamment grande pour évaluer le risque potentiel du vaccin pour provoquer un événement indésirable rare. Une évaluation claire des événements indésirables relativement rares, tels que ceux liés à l'auto-immunité, nécessitent une attention particulière. De ce fait, des rapports équilibrés entre les groupes traités et non traités, soit une randomisation un pour un, sont préférés. Si des ratios asymétriques sont utilisés, des difficultés potentielles dans l'interprétation des résultats cliniques d'innocuité peuvent survenir.

3.3 Evaluation de l'efficacité

3.3.1 Objectif

L'inclusion d'un adjuvant dans un vaccin doit démontrer un bénéfice en termes d'amélioration de la réponse immunitaire sans engendrer de réactions indésirables. L'efficacité est évaluée à travers les études de développement clinique du vaccin. Il est essentiel que les données cliniques démontrent que la quantité d'adjuvant utilisée dans le vaccin est appropriée pour renforcer la réponse immunitaire à l'antigène ou pour améliorer le profil de sécurité. Dans le cas d'un vaccin combiné, l'adjuvant doit améliorer la réponse à au moins un des antigènes sans exercer d'effets significativement défavorables sur la réponse immunitaire des autres antigènes.

3.3.2 Cadre réglementaire

Les essais cliniques au sein de l'Union Européenne font l'objet d'un cadre réglementaire très stricte. Les exigences pour la conduite des essais cliniques sont fournies dans la directive 2001/20/CE au sujet de l'application des bonnes pratiques cliniques dans la conduite des essais pour les médicaments à usage humain. De plus, la directive 2005/28/CE fixe les principes et les lignes directrices détaillées pour les bonnes pratiques cliniques utilisant des médicaments expérimentaux à usage humain et les exigences pour l'autorisation de production ou d'importation de ces produits (94).

Le producteur est tenu de prendre en compte les lignes directrices scientifiques publiées par la Commission Européenne et par le CHMP.

3.3.3 Informations requises pour l'évaluation

La ligne directrice de l'EMA concernant les adjuvants dans les vaccins humains (91), décrit les sections concernant :

- L'évaluation clinique d'un nouvel adjuvant dans un nouveau vaccin prophylactique ou déjà autorisé ;
- Les données cliniques nécessaires pour soutenir tout changement (suppression, ajout ou remplacement) du contenu en adjuvant dans un vaccin autorisé.

Qu'il s'agisse d'un nouveau composé ou d'un composé connu, des études préliminaires permettant de déterminer l'effet de l'adjuvant sur la nature de la réponse immunitaire à l'antigène doivent être menées permettant également de démontrer la dose adéquate en

adjuvant et antigène. Si plusieurs adjuvants sont utilisés dans un vaccin, une étude doit évaluer la combinaison de ces adjuvants sur les réponses des antigènes. De plus, pour un vaccin contenant plus d'une combinaison adjuvant/antigène, l'action de chaque adjuvant sur son antigène doit être documentée.

L'investigation du mécanisme immunitaire utilise des modèles *in vitro* et *in vivo* (type de cellules activées, identification des récepteurs et cellules cibles, aspect qualitatif et quantitatif de la réponse adaptative, lien entre réponse innée et adaptative). Cette information est maintenant nécessaire à tout nouvel enregistrement.

En général, les essais cliniques sont réalisés en double aveugle, randomisés et contrôlés. La conception de l'essai dépend des caractéristiques de la formulation adjuvant/antigène. Dans le cas d'un nouveau vaccin contenant un adjuvant (connu ou non), la *Note for Guidance on Clinical Evaluation of Vaccines* (95) s'applique.

Dans le cas d'un nouvel adjuvant dans un vaccin autorisé, au moins une étude de confirmation est nécessaire pour soutenir le changement. Si le changement est mené pour des raisons d'efficacité, l'essai devra démontrer la supériorité du produit modifié par rapport à celui existant. Si le changement est mené pour des raisons de sécurité, l'essai devra montrer la non-infériorité du vaccin modifié par rapport celui existant en terme de réponse immunitaire à chaque antigène.

L'immunogénicité du vaccin est évalué à travers les phases I, II et III. Les données obtenues permettent de démontrer l'efficacité clinique.

L'efficacité est mesurée dans les phases II et III à travers l'obtention d'une protection clinique.

Les conclusions d'un essai sont établies à travers l'efficacité du vaccin établi au cours des essais cliniques et/ou par l'effet de la vaccination au niveau de la population (en termes de couverture et de distribution du vaccin ainsi que sur son efficacité dans la prévention de la maladie). Les études d'immunogénicité sont souvent suffisantes pour démontrer l'efficacité du vaccin lorsque l'antigène et la concentration optimale en anticorps protecteurs sont connus (96).

3.4 Suivi post-commercialisation

Dans l'Union Européenne, des systèmes de pharmacovigilance sont établis en accord avec les exigences légales et les recommandations énoncées dans le Volume 9A de la réglementation des médicaments au sein de l'Union Européenne. Cette ligne directrice vise à renforcer la pharmacovigilance des vaccins pour la prophylaxie pré et post-exposition aux maladies infectieuses.

L'incorporation d'un adjuvant dans la formulation d'un vaccin peut être associée à l'apparition d'effets indésirables locaux et systémiques. L'adjuvant stimule spécifiquement la réponse immunitaire ce qui justifie une attention particulière aux effets spécifiques tel que les maladies auto-immunes et des réactions indésirables rare ou retardées. Alors que l'attention est mise sur la découverte de nouveaux adjuvants, le fabricant se doit de prendre en compte la possibilité d'apparition de nouveaux problèmes de sécurité.

La ligne directrice sur la conduite de la pharmacovigilance des vaccins publiée par le CHMP (97) spécifie que le mode d'action immunologique de tout nouvel adjuvant doit être décrit dans les spécifications de pharmacovigilance du plan de gestion des risques. Lorsque cela est nécessaire, il est recommandé de conduire des études ayant pour objectif d'identifier, caractériser ou quantifier un ou des risques, appelées *Post-authorization safety studies* (PASS) qui sont réalisées après l'obtention de l'AMM.

4 CONTROVERSES SUR LES ADJUVANTS

Les vaccins préventifs souffrent d'une mauvaise image auprès du grand public. En effet, des effets indésirables sévères ont été associés à la vaccination et ont conduit à leur retrait du marché (exemple du premier vaccin contre le rotavirus (Rotashield®) par voie orale associé à des cas d'invagination intestinale, retiré du marché en 1999 après 1 an de commercialisation (98) – voir partie II section 4.5.4 tolérance des adjuvants – impact de la voie d'administration).

Plusieurs controverses autour des adjuvants à base d'aluminium ont vu le jour. Des publications associent leur utilisation dans les vaccins à des syndromes autistiques (99), des syndromes de Guillain-Barré (100), des scléroses en plaques ou encore à l'apparition de myophaciite à macrophage (voir partie II section 5.1.3 Profil d'effets indésirables des sels d'aluminiums). Néanmoins, les liens de causalité pour l'ensemble de ces effets indésirables ont toujours été réfutés par les travaux scientifiques publiés et par les experts. Dans tous les cas, ces événements sont très rares (risque <1 cas sur 100 000) ce qui rend actuellement impossible la démonstration d'une éventuelle causalité. Le rapport bénéfice / risque reste très largement en faveur de la vaccination.

Toutes les controverses autour de la vaccination et des adjuvants conduisent à une crainte du public pouvant entraîner un recul de la vaccination et la réapparition de maladies. Les accusations sur les vaccins peuvent avoir des conséquences importantes sur la santé des populations. Les autorités de santé ont un rôle important à jouer en termes de communication ainsi que dans la mise en place de réglementations assurant la sécurité d'utilisation des vaccins (101).

La Figure 16 montre l'efficacité d'un programme d'immunisation en fonction de la perception de la tolérance par le public.

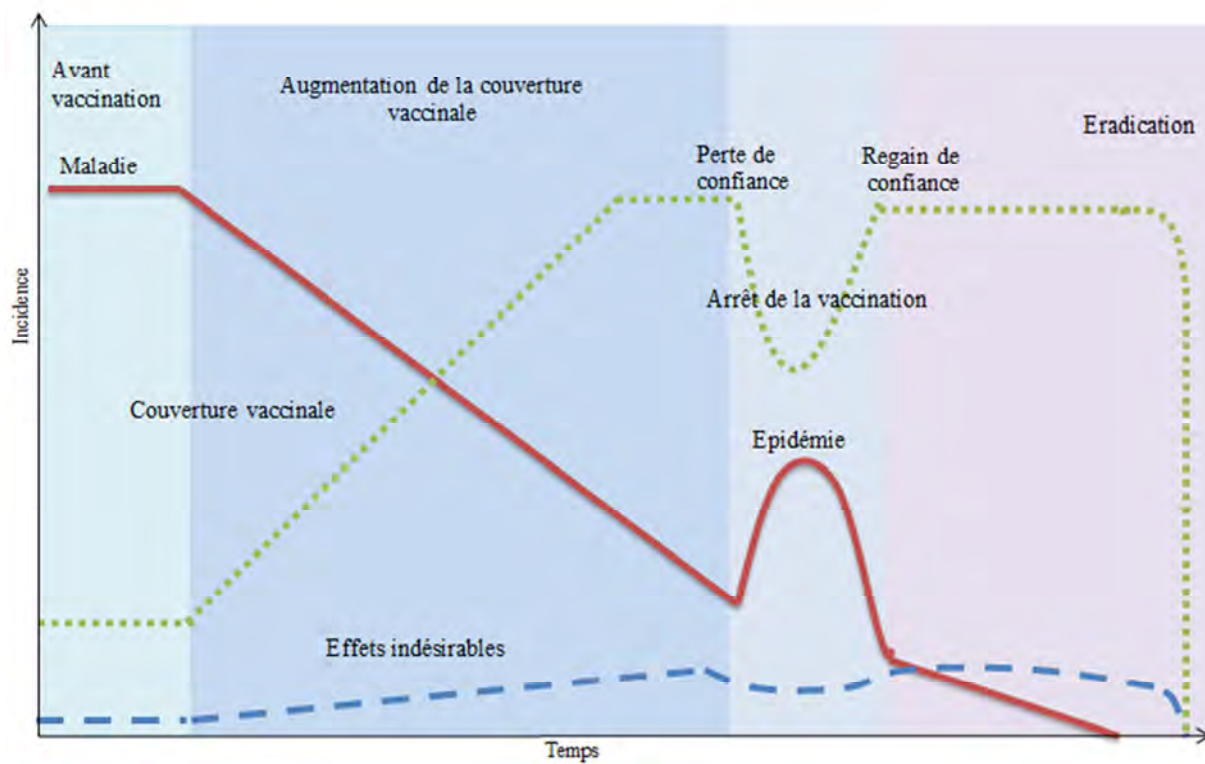


Figure 16 : Evolution d'un programme d'immunisation en fonction de la perception de sa tolérance (101)

CONCLUSION GENERALE

Avec le développement et l'évolution des vaccins ces dix dernières années, la recherche et le développement de nouveaux adjuvants ont pris une place croissante. De nombreux adjuvants ont été développés mais très peu sont aujourd'hui utilisés dans les vaccins commercialisés pour des raisons de sécurité (toxicité aigüe et possibilité de toxicité retardée). En effet l'absence de modèle animal fiable et l'impossibilité d'établir des liens de causalité pour les risques inférieurs à 1/100.000, impose un retour à la recherche fondamentale pour espérer lever un jour le statu quo actuel sur l'utilisation des adjuvants vaccinaux.

Les adjuvants aujourd'hui utilisés et développés sont d'origine et ont des mécanismes d'action très divers. Ceci rend difficilement prédictible le profil d'effets indésirables ainsi que la mise en place d'une évaluation réglementaire harmonisée. Le bénéfice de l'utilisation d'un adjuvant dans un vaccin doit être mesuré par rapport au risque de toute réaction indésirable qui lui est inhérent. L'attitude actuelle favorise la sécurité à l'efficacité. Il est important de retenir que le développement d'un adjuvant est étroitement lié à celui de l'antigène dans une formulation spécifique.

L'absence de cadre réglementaire il y a encore 10 ans autour des adjuvants a conduit à un travail important des autorités de santé afin d'apporter une meilleure appréhension des industriels pour le développement et la mise sur le marché de vaccins contenant des adjuvants novateurs et sûrs.

Toutes les controverses autour de la vaccination et des adjuvants peuvent être responsables de craintes dans le public entraînant un recul de la vaccination et la réapparition d'infections, comme la rougeole par exemple. Ceci a des conséquences importantes sur la santé des populations. De ce fait, les autorités de santé ont un rôle important à jouer en termes de communication et de politique vaccinale ainsi que dans la mise en place de réglementations assurant la sécurité d'utilisation des vaccins.

BIBLIOGRAPHIE

1. **DeFranco, Robertson, Locksley.** *La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires.* De Boeck, 2009.
2. **Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman.** *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.* Elsevier Masson, 2009.
3. **Neil A. Campbell, Jane B. Reece.** *Biology,* Pearson, Benjamin Cummings, 2005.
4. **Vacc.info.** Histoire de la vaccination. [En ligne] 2012. [Citation : 30 10 2012.] <http://www.vaccination-info.be/vaccination-bon-a-savoir/histoire-de-la-vaccination>.
5. **Direction générale de la santé.** Guide des vaccinations. *INPES.* [En ligne] 2012. [Citation : 23 06 2013.] http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide-vaccination-2012/pdf/GuideVaccinations2012_Principes_et_bases_immunologiques_de_la_vaccination.pdf.
6. *Les Vaccins - Stage à public désigné .* **Ottmann, Michèle.** Académie de Lyon : s.n., 2009.
7. **Bertrand Bellier .** Vaccins d'aujourd'hui et de demain : nouvelles technologies. *Revue francophone des laboratoires.* 2009, Vol. 417, 69-77.
8. **Lei Li, Fadi Saade et Nikolai Petrovsky.** The future of human DNA vaccines. *Journal of Biotechnology.* 2012, Vol. 2-3, 171-82.
9. **Claude Leclerc.** L'apport des nouvelles technologies en vaccinologie. *Medecine/Sciences.* 2007, Vol. 23, 386-90.
10. **Natasha Kushnir, Stephen J. Streatfield, Vidadi Yu.** Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccines.* 2012, Vol. 31, 58-83.
11. **Christine Trumfheller et al.** Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *Journal of internal medicine.* 2012, Vol. 2, 183-192.
12. **Dung T. Le, Drew M. Pardoll et Elizabeth M. Jaffee.** Cellular vaccine approaches. *Cancer Journal.* 16, 2010, Vol. 4, 304-310.
13. **World Health Organisation.** *World malaria report 2011.* http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf.
14. **Geert Leroux-Roels.** Unmet needs in modern vaccinology Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine.* 2010, Vol. 28S, C25-C36.
15. **Fred Zepp.** Principles of vaccine design — Lessons from nature. *vaccine.* 2010, Vol. 28S, C14-C24.
16. **Pierre Bégué et al.** Les adjuvants vaccinaux : quelle actualité en 2012 ? *Académie de médecine.* [En ligne] 2012. [Citation : 18 10 2012.] <http://www.academie-medecine.fr/Upload/adjuvants%20vaccinaux%20rapport%20ANM1.pdf>.

17. **C.A. Siegrist.** The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *Journal of Comparative Pathology*. 2007, Vol. 137, S4-S9.
18. **Daniela Weiskopf, Birgit Weinberger et Beatrix Grubeck-Loebenstein.** The aging of the immune system. *European society for organ transplantation*. 2009, Vol. 22, 1041-1050.
19. **P. Duchet Niedziolka et al.** Vaccination antivirale des adultes immunodéprimés, revue de la littérature. *La revue de médecine interne* 29 . 2008, Vol. 29, 554-567.
20. **Rajesh K. Gupta, George R. Siber.** Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995, Vol. 13, 1263-1276.
21. Gaston Ramon. *Institut Pasteur - Médiathèque scientifique*. [En ligne] [Citation : 11 10 2012.] <http://www.pasteur.fr/infosci/archives/ram0.html>.
22. **J.C. Aguilar, E.G. Rodriguez.** Vaccine adjuvant revisited. *Vaccine*. 2007, Vol. 25, 3752-3762.
23. **Bruno Guy.** Les adjuvants. *Canal U Médecine & Santé*. [En ligne] 2011. [Citation : 31 10 2012.] http://www.canal-u.tv/video/canal_u_medecine/cif_vaccinologie_2011_les_adjuvants.7093.
24. **Derek T. O'Hagan, Ennio De Gregorio.** The path to a successful vaccine adjuvant - the long and winding road. *Drug Discovery Today*. 2009, Vol. 14, 11/12.
25. **Steven G. Reed, Sylvie Bertholer, Rhea N. Coler and Martin Friede.** New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology*. 2008, Vol. 30, 1.
26. **Amy S McKee, Megan KL MacLeod, John W Kappler and Philippa Marrack.** Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge ? *BMC Biology*. 8, 2010, Vol. 37.
27. **Cornelia L. Dekker, Lance Gordon and Jerome Klein .** *Dose Optimization Strategies for Vaccines: The Role of Adjuvants and New Technologies*. s.l. : NVAC Subcommittee on Vaccine Development and Supply, 2008.
28. **Carl R. Alving.** Vaccine Adjuvant. [auteur du livre] Lawrence R. Stanberry Alan D. T. Barrett. *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases*. s.l. : Elsevier Inc., 2009.
29. **P. Chiarella, E. Massi, M. De Robertis, E. Signori, V.M. Fazio.** Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 7, 2007, Vol. 10, 1551-1562.
30. **Taro Kawai, Shizuo Akira.** TLR signaling. *Seminar in Immunology*. 2007, Vol. 19, 24-32.
31. **O. Pérez et al.** Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2012, Vol. 45, 681-692.
32. **B. Mastelic et al.** Mode of action of adjuvants: Implications for vaccine safety and design. *Biologicals*. 2010, Vol. 38, 594-601.
33. **World Health Organisation.** The Global Advisory Committee on Vaccine Safety. [En ligne] [Citation : 17 05 2013.] http://www.who.int/vaccine_safety/committee/en/.
34. **A. Batista-Duharte et al.** Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicology Letters*. 2011, Vol. 203, 97-105.

35. **Alexander Batista-Duharte et al.** Systemic immunotoxicity reactions induced by adjuvanted vaccines. *International Immunopharmacology*. 2014, Vol. 20, 170-180.
36. **Romain K. Gherardi and François-Jérôme Authier.** Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus*. 2012, Vol. 2, 184-189.
37. **Pier Luigi Meroni.** Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): old truths and a new syndrome? *Journal of autoimmunity*. 2011, Vol. 36, 1-3.
38. **Gribble EJ et al.** Toxicity as a result of immunostimulation by biologics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 3, 2007, Vol. 2, 209-34.
39. **M. Renee Prater et al.** Maternal treatment with a high dose of CpG ODN during gestation alters fetal craniofacial and distal limb development in C57BL/6 mice. *Vaccine*. 2006, Vol. 24, 263-271.
40. **Frank R. Brennan, Gordon Dougan.** Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine*. 2005, Vol. 23, 3210-3222.
41. **Mustsh M.M. et al.** Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's Palsy in switzerland. *The new england journal of medicine*. 2004, Vol. 350, 896-903.
42. **Jacqueline E. Tate et al.** Research priorities regarding rotavirus vaccine and intussusception: A meeting summary. *Vaccine*. 2012, Vol. 30S, A179-184.
43. **Professeur Philippe Lepage.** Rotavirus: Invagination intestinale. *Vaxinfo.org*. [En ligne] 14 04 2014. [Citation : 10 06 2014.]
<http://www.vaxinfo.be/spip.php?article1055&lang=fr%20:%20publi%C3%A9%20le%20lundi%2014%20avril%202014>.
44. **Rajesh K. Gupta.** Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced drug delivery reviews*. 1998, Vol. 32, 155-172.
45. **Stanley L Hem, Harm Hogen Esch.** Relationship between physical and chemical properties of aluminium-containing adjuvants and immunopotential. *Expert Review Vaccines*. 6, 2007, Vol. 5, 685-698.
46. **Philippa Marrack, Amy S. McKee and Michael W. Munks.** Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*. 9, 2009, Vol. 4, 287-293.
47. **Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H.** Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 2007, Vol. 25, 4575-4585.
48. **Kool M, Soullie T, et al.** Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *Journal of experimental medicine*. 2008, Vol. 4, 869-82.
49. **Eisenbarth SC, et al.** Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008, Vol. 7198, 1122-6.
50. **Erik B. Lindblad.** Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004, Vol. 22, 3658-3668.

51. **World Health Organization.** Global vaccine safety. *World Health Organization*; [En ligne] 27 07 2012. [Citation : 21 05 2013.]
http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/adjuvants/Jun_2012/en/.
52. **Paul A. Offit, Stanley A. Plotkin et Walter A. Orenstein.** Vaccine safety. [auteur du livre] Walter A. Orenstein, Paul A. Offit Stanley A. Plotkin. *Vaccines*. 2013.
53. **Nathalie Garçon, Geert Leroux-Roels, Wen-Fang Cheng.** Vaccine adjuvants. *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in vaccinology*. 2011, Vol. 1, 89-113.
54. **Elaine Tritto, Flaviana Mosca, Ennio De Gregorio.** Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2009, Vol. 27, 3331-3334.
55. **D.T. O'Hagan, G.S. Ott, E. De Gregorio, A. Seubert.** the mechanism of action of MF59: An innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 2012, Vol. 30, 4341-4348.
56. **Vesikari T, Karvonen A et al.** Immunogenicity and safety of MF59–adjuvanted H5N1 influenza vaccine from infancy to adolescence. *Pediatrics*. 2010, Vol. 126, 762-70.
57. **Tristan W. Clark and al.** Trial of 2009 Influenza A (H1N1) Monovalent MF59-Adjuvanted Vaccine. *The new England journal of medicine*. 2009, Vol. 361, 2424-35.
58. **Giannini, S.L.** Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006.
59. **Arnand M. Didierlaurent et al.** AS04, an Aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptative immunity. *The journal of immunology*. 2009, Vol. 183, 6186-6197.
60. **P. Moris and al.** H5N1 influenza vaccine formulated with AS03 induces strong cross-reactivity and polyfunctional CD4 T-cell responses. *Journal of clinical immunology*. 31, 2011, Vol. 3, 443-454.
61. **Tino F. Schwarz et al.** Four-year follow-up of the immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine when administered to adolescent girls aged 10-14 years. *Journal of adolescent health*. 2012, Vol. 50, 187-194.
62. **Nathalie Garçon et al.** The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: The AS04 experience. *Vaccine*. 2011, Vol. 29, 4453-4459.
63. **Haute Autorité de Santé.** Commission de la transparence - Avis Cervarix. HAS. [En ligne] 2012. [Citation : 20 05 2014.] <https://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004i-01t/has-com-transp-cervarix-01022012.pdf>.
64. **Elizabeth Miller and al.** Risk of narcolepsy in children and young people receiving AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine: retrospective analysis. *British Medical Journal*. 2013, Vol. 346, f794.

65. **Agency, European Medicines.** European Medicines Agency recommends restricting use of Pandemrix. *EMA*. [En ligne] 2011. [Citation : 20 05 2014.]
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2011/07/WC500109182.pdf.
66. **Camilla Foged, Jon Hansen, Else Marie Agger.** License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8+ CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, Vol. 45, 482-491.
67. **Maria Grazia Cusi.** The virosome as a novel concept for high pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus 5HP-PRRSV) vaccines. *Journal of integrative agriculture*. 2013, Vol. 7, 1215-1224.
68. **Kapoor D, Vyas RB, Lad C, Patel M.** A multipurpose and novel carrier for drug delivery and targeting virosomes. *Journal of drug delivery and therapeutics*. 2013, Vol. 5, 143-147.
69. **Dorothea Sesardic, Sjoerd Rijpkema and Brijesh Prakash Patel.** New adjuvants: EU regulatory development. *Expert Review*. 2007, Vol. 6, 849-861.
70. **Ali M. Harandi, Gwyn Davies, Ole F. Olesen.** Vaccine adjuvant: scientific challenge and strategic initiatives. *Expert Reviews Vaccines*. 8, 2009, Vol. 3, 293-298.
71. **World Health Organization.** Technology Transfert: Adjuvant. *World Health Organization*. [En ligne] [Citation : 3 2 2013.]
http://www.who.int/phi/implementation/techtransfer_vaccines_adjuvants/en/index.html.
72. **Organisation Mondial de la Santé.** Vaccination. *Organisation Mondial de la Santé*. [En ligne] [Citation : 7 12 2012.] <http://www.who.int/topics/immunization/about/fr/index.html>.
73. **World Health Organisation.** Vaccine regulation. *World Health Organisation*. [En ligne] [Citation : 7 12 2012.] http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_regulation/en/#.
74. **World Health Organisation.** *Weekly epidemiological record*. 16 July 2004. 29.
75. **Bureau des Traités.** Convention relative à l'élaboration d'une pharmacopée européenne. *Conseil de l'Europe*. [En ligne] [Citation : 01 04 2013.]
<http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous.asp?CL=FRE&NT=050>.
76. **EDQM.** Pharmacopée Européenne. *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare*. [En ligne] [Citation : 7 12 2012.] <http://www.edqm.eu/fr/accueil-DEQM-628.html>.
77. **Pharmacopée Européenne.** Vaccins à usage humain. 0153.
78. **European Medicine Agency.** *European Medicine Agency*. [En ligne] [Citation : 11 12 2012.]
<http://www.ema.europa.eu/ema/>.
79. **European Medicines Agency.** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *European Medicines Agency*. [En ligne] [Citation : 2013 02 2013.]
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000094.jsp.

80. **CPMP.** Concept paper on the development of a committee for proprietary medicinal product: note for guidance for the evaluation of new adjuvants in vaccines. *European Medicines Agency*. [En ligne] [Citation : 8 02 2013.] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003885.pdf.
81. **Emanuele Montomoli, Simona Piccirella, Baharak Khadang, Elisa Mennitto, Roberto Camerini, Alfonso De Rosa.** Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Reviews Vaccines*. 10, 2011, Vol. 7, 1053-1061.
82. **CHMP.** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Explanatory note on immunomodulators for the Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use (EMEA/CHMP/VWP/244894/2006). *European Medicine Agency*. [En ligne] [Citation : 2 03 2013.] www.emea.eu.int.
83. **U.S Food and Drug Administration.** *U.S Food and Drug Administration*. [En ligne] [Citation : 10 12 2012.] <http://www.fda.gov/default.htm>.
84. **U.S Food and Drug Administration.** CFR - Code of Federal Regulation Title 21. *Food and Drug Administration*. [En ligne] [Citation : 10 12 2012.] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=610.15>.
85. **U.S Food and Drug Administration.** CFR - Code of Federal Regulation Title 21. *Food and Drug Administration*. [En ligne] [Citation : 10 12 2012.] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=312.23>.
86. **CBER.** Guidance for Industry for the Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies. *Food and Drug Administration*. [En ligne] [Citation : 10 12 2012.] www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM175909.pdf.
87. **European Commission.** Clinical Trial Directive. *European Commission*. [En ligne] [Citation : 18 09 2013.] http://ec.europa.eu/enterprise/newsroom/cf/itemdetail.cfm?tpa_id=164&item_id=3303.
88. **ICH.** CTD. *ICH*. [En ligne] [Citation : 10 03 2013.] <http://www.ich.org/products/ctd.html>.
89. **Vaccines Europe.** EU regulatory framework for vaccines. *Vaccines Europe*. [En ligne] [Citation : 14 02 2013.] <http://www.vaccineseurope.eu/about-vaccines/eu-regulatory-framework-for-vaccines/>.
90. **European Commission.** News and updates on pharmaceuticals. *European Commission*. [En ligne] [Citation : 20 09 2013.] <http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/>.
91. **(CHMP), Committee for medicinal products for human use.** *Guideline on adjuvants in vaccines for human use*. 2005. EMEA/CHMP/VEG/134716/2004.

92. **European Medicine Agency.** Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines » (CPMP/SWP/465/95). *European Medicine Agency*. [En ligne] [Citation : 01 04 2013.]
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004004.pdf.
93. **World Health Organization.** WHO Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. *World Health Organization*. [En ligne] 13 02 2013.
http://www.who.int/biologicals/publications/nonclinical_evaluation_vaccines_nov_2003.pdf.
94. **European Commission.** Medicinal products for human use: clinical trials. *European Commission*. [En ligne] [Citation : 20 09 2013.] <http://ec.europa.eu/health/human-use/clinical-trials/>.
95. **European Medicine Agency.** Note for guidance on clinical evaluation of vaccines (EMEA/CHMP/VWP/164653/2005). *European Medicine Agency*. [En ligne] [Citation : 23 03 2013.]
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003875.pdf.
96. **World Health Organization .** *Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations*. 2004. WHO technical report, series No. 924, 2004.
97. **CHMP.** *Guideline on the conduct of pharmacovigilance for vaccines for pre- and post- exposure prophylaxis against infectious disease* . s.l. : European Medicines Agency, 2009.
EMEA/CHMP/PhVWP/503449/2007.
98. **Trudy V. Murphy, Philip J. Smith, Paul M. Gargiullo, Benjamin Schhartz.** The first rotavirus vaccine and intussusception: epidemiological studies and policy decisions. *The journal of infectious diseases*. 2003, Vol. 187, 1309-13.
99. **L. Tomljenovic, C. Shaw.** Do aluminum vaccine adjuvant contribute to the rising prevalence of autism? *Journal of inorganic biochemistry*. 2011, Vol. 105, 1489-1499.
100. **Tamar Lasky and al.** The Guillain-Barré syndrome and the 1992-1993 and 1993-1994 influenza vaccines. *The new england journal of medicine*. 1998, Vol. 339, 25.
101. **B. Soubeyrand.** Tolérance des vaccins : faits et spéculations. *Médecine et maladies infectieuses*. 2003, Vol. 33, 287-299.

SUMMARY

Vaccines adjuvants: current states and news

Vaccination plays an important role in public health but the development of new vaccines meets numerous practical obstacles. To achieve effective and safe vaccines for the prevention of not yet controlled or re-emergent infectious diseases, it is important to have immunological adjuvants that allow inducing a protective immune response with an appropriate safety profile. Since 1926 aluminum adjuvants have been used in human vaccines, and only 4 new compounds have been registered in the last 10 years. Although there was lot of proposed candidates, the toxicity is the main factor that has limited their use.

The lack of regulatory environment around adjuvants 10 years ago, led to the establishment of new regulatory requirements in order to supervise their development and use to ensure vaccines quality, efficacy and security.

In this work the current situation on adjuvants used in vaccines is assessed, and the evolution of the compounds and their impacts on the regulation are discussed.

Utilisation des adjuvants dans les vaccins : état des lieux et actualités

Toulouse, le 4 juillet 2014

Christelle Merlo

2014 / T0U3 / 2059

RESUME

La vaccination tient une place importante en matière de santé publique mais le développement des nouveaux vaccins rencontre de nombreux obstacles pratiques. Dans le but de réaliser des vaccins efficaces et sûrs pour la prévention de maladies infectieuses non contrôlées ou ré-émergentes, il est nécessaire d'avoir des adjuvants immunologiques qui permettent d'induire une réponse immune protectrice avec un profil de sécurité approprié. Depuis 1926 les adjuvants aluminiques sont utilisés dans les vaccins humains et seuls 4 nouveaux composés ont été enregistrés ces 10 dernières années. Bien qu'un grand nombre de candidats ait été proposé, leur toxicité est le facteur principal qui a limité leur utilisation.

L'absence de cadre réglementaire il y a encore 10 ans autour des adjuvants a conduit à la mise en place de nouvelles exigences réglementaires dans le but d'encadrer leur développement et leur utilisation afin d'assurer qualité, efficacité et sécurité des vaccins.

Dans ce travail, l'état des lieux des adjuvants utilisés dans les vaccins est dressé, et l'évolution des composés utilisés et leurs impacts sur les réglementations sont discutés.

Titre et résumé en Anglais : Vaccines adjuvants: current states and news

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Adjuvant, vaccin, réglementation

Directeur de thèse : Professeur Christophe Pasquier

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, chemin des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex 09
France**