

L'utilisation de mutants thermosensibles et avirulents du virus rabique comme vaccin vivant

F. BUSSEREAU, P. COULON et A. FLAMAND*

Résumé : Dans le cadre de nos recherches sur les causes de la virulence du virus rabique, nous avons isolé des mutants thermosensibles et avirulents de la souche CVS. La possibilité d'utiliser ces mutants comme vaccins vivants a été étudiée. Les résultats obtenus avec les mutants avirulents semblent plus prometteurs que ceux obtenus avec les mutants thermosensibles. La méthode utilisée pour sélectionner nos mutants avirulents consiste à isoler les survivants à la neutralisation par les anticorps monoclonaux N^{os} 248.8 et 194.2 puis à étudier leur pathogénicité par injection IC de souris adulte. Cette méthode est potentiellement applicable à toutes les souches de rage qui sont neutralisées par ces deux anticorps. Nous recherchons en ce moment si d'autres anticorps monoclonaux neutralisants permettent de sélectionner des mutants avirulents.

La possibilité de sélectionner des mutants avirulents conférant à l'animal une bonne protection contre la souche virulente d'origine, ouvre sans doute des perspectives nouvelles dans l'utilisation de vaccin vivant.

Pour étudier les bases moléculaires de la virulence du virus rabique, nous avons choisi deux approches complémentaires :

In vitro nous étudions l'effet de l'infection virale sur le métabolisme de cellules en culture (BHK-21, CER, neuroblastomes, cellules gliales). Pour déterminer quelle protéine virale est plus particulièrement responsable d'une altération cellulaire donnée, nous avons constitué une collection de mutants thermosensibles.

In vivo nous recherchons des mutants de la souche CVS qui ne tuent plus la souris adulte et qui diffèrent de la souche virulente pour une seule mutation. Nous possédons à l'heure actuelle deux mutants de la glycoprotéine qui sont totalement avirulents.

Une application pratique de notre travail consiste à utiliser les mutants thermosensibles et avirulents comme vaccin vivant. Comme on le verra dans les deux paragraphes suivants, les mutants avirulents ont donné des résultats

* Laboratoire de Génétique II, Bâtiment 400, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex (France).

plus prometteurs que les mutants thermosensibles. La possibilité de sélectionner des mutants avirulents à partir de n'importe quelle souche virale ouvre certainement des perspectives nouvelles pour l'utilisation de vaccins vivants.

I. — LES MUTANTS THERMOSENSIBLES*

Nous possédons 117 mutants ts qui ont été criblés de la même manière en culture de cellules : ils ne forment pas plaque à 38,5°C alors qu'ils forment plaque à 33,5°C. Cette non-aptitude reflète une modification de l'initiation à former plaque sous milieu gélosé, alors que la souche CVS dont ils sont issus a la même caractéristique aux deux températures (2). Ces mutants ne présentent pas le même degré d'inhibition de la multiplication en milieu liquide à 38,5°C. Ils ne présentent pas non plus le même degré d'inhibition à températures inférieure (37°C) ou supérieure (39,5°C). Un exemple est donné pour 5 mutants sur la Figure 1. Le résultat n'est pas étonnant puisque chaque mutant peut être issu d'une mutation ponctuelle à l'une des $1,4 \times 10^4$ bases que comporte le génome du virus de la rage. Les 75 mutants qui présentent une forte inhibition de la multiplication à 38,5°C ont été classés en 3 groupes à l'aide d'un test antigène-anticorps et d'une mesure de l'activité des synthèses virales (6). Ces 3 groupes reflètent la position de la mutation vis-à-vis des 5 protéines constitutives du virion :

— le groupe F^- : la mutation devrait affecter la transcriptase (13 mutants ts);

— le groupe $F^{-/+}$: la mutation devrait affecter une protéine impliquée dans la transcription et (ou) la réplication (60 mutants ts);

— le groupe F^+ : la mutation devrait affecter une des protéines d'enveloppe (3 mutants ts).

Nous avons pensé pouvoir utiliser cette multiplication résiduelle à la température des mammifères susceptibles d'être infectés par le virus de la rage pour obtenir l'établissement d'une immunité. Une nouvelle voie d'approche pour rechercher un virus vaccin vivant était possible. Un projet de recherches a été proposé à l'INSERM ayant pour titre « Prophylaxie de la rage chez les animaux : vaccination par voie orale ». Un contrat de recherche libre a été obtenu (F.B.) sur ce projet en 1980 portant sur trois années et comportant une collaboration entre le laboratoire d'Orsay et le Centre de Malzéville dirigé par Louis Andral. Notre travail consiste à trouver parmi la collection des 117 mutants ts (3) celui qui possède le pouvoir protecteur le plus élevé tout en étant totalement apathogène. L'utilisation d'un virus vivant modifié par une seule mutation nous permet d'obtenir une souche de virus génétiquement plus homogène que lorsque le virus est rendu apathogène par passages successifs sur des animaux peu susceptibles à la rage. Cependant, il y a un obstacle à vaincre car il faut être sûr que le virus ne pourra ni se modifier (par une mutation supplémentaire) ni réacquérir une pathogénicité (par une muta-

* par F. Bussereau.

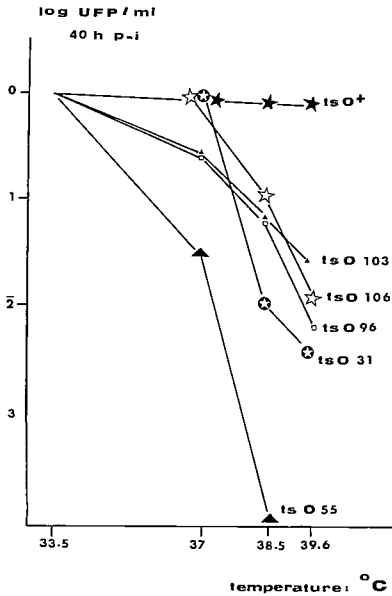


FIGURE 1

Inhibition de la multiplication de 5 mutants ts par rapport à la souche CVS d'origine (ts O⁺)

La multiplication des 6 souches a été étudiée sur cellules CER en culture (jusqu'à 40 heures post infection) à chacune des 4 températures (en abscisse). Le surnageant de ces cultures infectées a été titré en UFP/ml. En ordonnée est représentée l'inhibition (en log du nombre d'UFP/ml) au point 40 h p.i.; la température de 33,5°C est prise comme référence.

tion réverse). Il faudra procéder à de nombreux essais pour étudier ces points avant de répandre notre virus vaccin par appât dans la nature.

Nous ne pouvons pas cribler les mutants ts sur renard pour trois raisons : 1) il est difficile d'obtenir des renards, 2) l'animalerie où sont maintenus les renards enrégés serait trop petite, 3) le coût de revient d'un renard est trop élevé malgré le financement accordé par l'INSERM. Nous avons décidé d'effectuer un premier crible des mutants ts sur souris avant de faire des expériences sur renard.

Nous désirions fournir le virus vaccin par voie orale. Cependant, comme il est difficile de contrôler la prise sur souris, nous avons décidé d'utiliser tout d'abord la voie intramusculaire faisant l'hypothèse que, quelle que soit la voie d'entrée du virus, le mécanisme de protection est le même.

Il n'était pas nécessaire de cribler nos 117 mutants mais a priori nous ne pouvions pas déterminer si une bonne caractéristique d'activité chez la souris était due :

— *hypothèse 1* : à une multiplication plus inhibée de mutants ts par rapport aux autres mutants ts;

— *hypothèse 2* : à une fonction virale précise touchée par la mutation.

Nous avons décidé de faire trois expériences en choisissant des mutants des trois groupes : 9 F⁻ sur 13, 17 F^{-/+} sur 60, 3 F⁺. Pour chaque mutant les pouvoirs pathogène, immunogène et protecteur ont été mesurés. La première expérience a été relatée lors d'une réunion de la Société de Microbiologie à Cambridge en mars 1980 et a fait l'objet d'une publication (1), la seconde expérience a été relatée lors du Congrès international de Virologie à Strasbourg en août 1981. En attendant les résultats de la 3^e expérience qui est en cours nous pouvons donner les résultats suivants :

— Tous les virus testés (souche d'origine ts O⁺ et souches mutantes) peuvent tuer les souris. C'est une question de dose. Les 16 mutants se classent en deux groupes (Fig. 2) : ceux qui tuent la souris comme la souche d'origine et qui ne présentent aucun intérêt pour la vaccination et ceux qui sont moins pathogènes (5 d'entre eux) dont l'analyse peut être poursuivie.

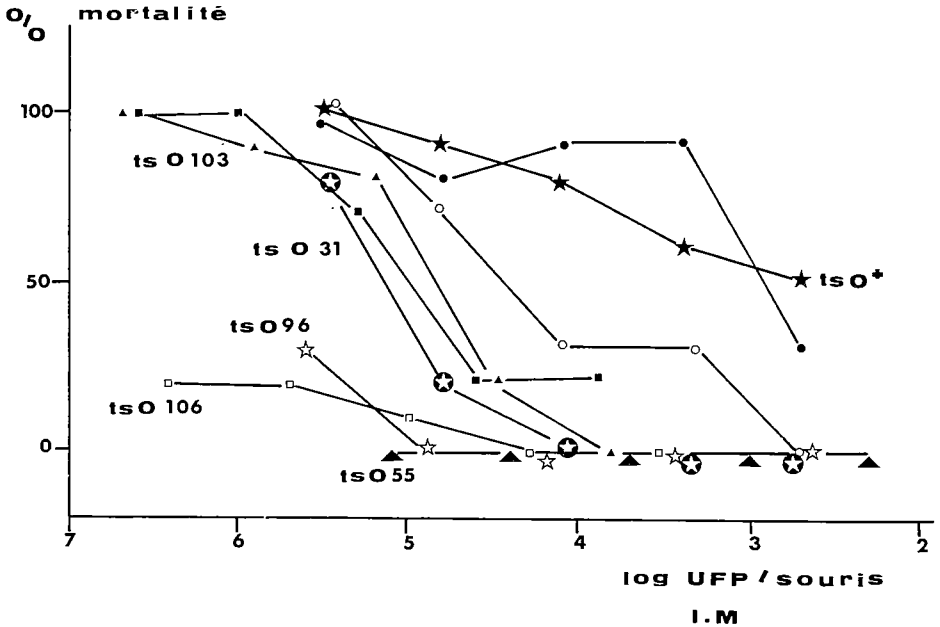


FIGURE 2

Pouvoir pathogène des souches : mortalité des souris infectées par voie intramusculaire avec 7 mutants ts et la souche CVS d'origine

- En abscisse : dose de virus inoculé par souris titré en UFP.
- En ordonnée : % de souris mortes.
- Chaque point représente 10 souris inoculées par dose, qui ont été observées pendant 30 jours.

— Les souris qui survivent se classent en deux groupes car elles sont ou non protégées (Fig. 3). La protection est aussi fonction de la dose de virus vaccin reçue mais elle n'est pas due aux seuls anticorps circulants. Ce résultat est en accord avec le fait que plusieurs mécanismes de défense immunitaire sont en jeu lors d'une infection par le virus de la rage.

Parmi les 5 mutants ts sélectionnés le ts O55 présente la meilleure caractéristique en souris : il protège bien; cependant ces résultats ne correspondent pas au virus idéal que l'on aurait souhaité trouver (Fig. 3). Ce mutant ts O55 a été choisi pour être testé sur renard utilisant les mêmes critères que sur souris; il ne s'est pas révélé meilleur que la souche d'origine. Ce résultat n'est pas étonnant si l'on réalise que la température interne d'un animal n'est pas la même dans tout le corps et varie d'un type d'animal à l'autre. Cette variation peut entraîner alors une augmentation de la multiplication résiduelle du virus mutant ts qui peut être fatale à l'animal si son immunité n'est pas suffisante.

L'ensemble des résultats ne nous encourage pas à poursuivre l'étude avec les autres mutants ts de la souche CVS, d'autant plus que nous ne savons pas pour quelle raison la même dose de virus tue ou protège (cf. hypothèses 1 et 2) : en effet, les 5 mutants sélectionnés sur souris ne sont pas inhibés au même degré à température de la souris (globalement 37°C, Fig. 1) et appartiennent à deux groupes différents (F^- et $F^{-/+}$).

II. — LES MUTANTS AVIRULENTS*

Dans un premier temps, nous avons sans succès essayé de sélectionner des mutants avirulents de la souche CVS à partir d'une population virale ayant subi une mutagenèse au 5 fluorouracile. Nous avons alors recherché une méthode de présélection permettant d'isoler des mutants ponctuels. Dans un deuxième temps, la virulence de ces mutants serait étudiée.

L'existence d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine rabique (Wiktor et Koprowski, 1978; Flamand *et al.*, 1980) nous a fourni cette méthode de présélection. Nous avons recherché des mutants qui ne soient plus neutralisés par l'un ou l'autre de ces anticorps selon la méthode décrite par Koprowski et Wiktor (1980). Selon toute vraisemblance les mutants différents de la souche sauvage par un changement d'AA dans la glycoprotéine; ce changement d'AA a modifié le site antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal. A partir d'une suspension de CVS nous avons donc isolé une trentaine de mutants résistants à chacun des 10 anticorps monoclonaux qui neutralisent notre souche CVS. La virulence de ces mutants est en ce moment à l'épreuve, par injection intracérébrale de 10^3 unités formant plaque à des souris adultes. Cette méthode nous a déjà permis de sélectionner deux mutants qui sont totalement avirulents. Ils ont été appelés AvO₁ et AvO₂

* par P. Coulon et A. Flamand, avec la collaboration de MM. Sureau et Rollin (Institut Pasteur, Paris).

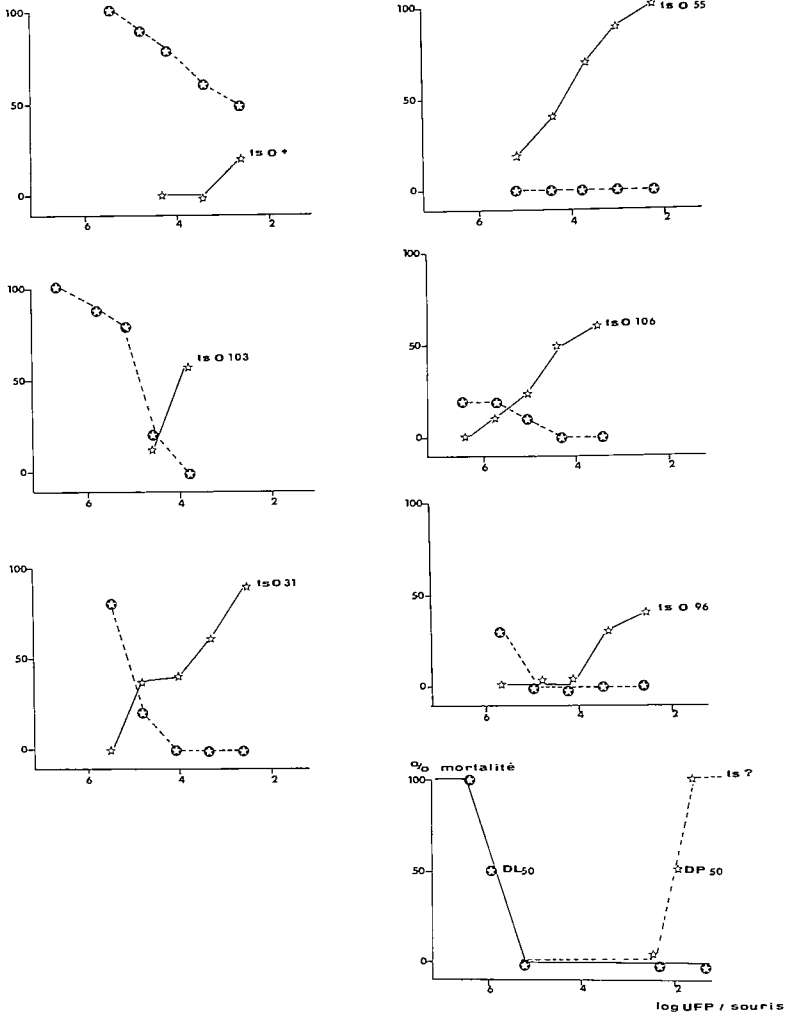


FIGURE 3
Pouvoirs pathogène et protecteur des souches

• En bas à droite : exemple de représentation de courbes théoriques permettant de déterminer les valeurs des DL 50 et DP 50 pour un virus-vaccin idéal. La dose choisie pour vacciner serait comprise entre 2 et 5 log UFP/souris.

• Autres cases : courbes expérimentales obtenues avec la souche CVS d'origine et 5 mutants ts. Pour chacune de ces cases la courbe de l'effet pathogène présentée sur la Fig. 2 est de nouveau représentée : \odot --- \odot Suite à l'expérience représentée sur la Fig. 2, les souris survivantes de chaque lot ont été infectées intracrâniellement avec une dose létale de virus pour la souris. La mortalité correspondant à une non protection a été suivie; le % est représenté \star — \star

(Fig. 4). Ces mutants induisent une forte réponse immunitaire chez la souris (Fig. 5). Ils protègent l'animal contre une surinfection par voie intramusculaire de $10^{3.4}$ DL 50 de la souche GS (issue de glande salivaire de renard) (Fig. 6) ainsi que contre une injection intracrânienne de 40 DL 50 de CVS. Outre leur totale innocuité, AvO₁ et AvO₂ ont donc un bon pouvoir immunogène et protecteur.

Les deux mutants AvO₁ et AvO₂ ne sont plus reconnus par les anticorps N^{os} 248.8 et 194.2. Nous faisons l'hypothèse que ces deux anticorps se lient avec une région de G qui est directement impliquée dans le mécanisme de virulence. Une autre observation renforce cette hypothèse : la souche HEP, qui n'est pas virulente pour la souris adulte, n'est pas reconnue par 248.8 et 194.2. Un dérivé virulent d'HEP a été isolé par Clark par passage en cerveau de souris. Ce dérivé virulent lie 248.8 et 194.2. Ceci constitue la seule différence antigénique qui a pu être mise en évidence, tant sur la glycoprotéine que sur la nucléocapside, entre les formes virulente et avirulente d'HEP.

Cette hypothèse est en ce moment à l'étude. Nous essayons aussi de comprendre pourquoi un changement de configuration de la région de G reconnue par 248.8 et 194.2 entraîne la perte de la virulence.

CONCLUSIONS

Nous proposons ici une méthode de sélection de mutants avirulents à partir de la souche CVS du virus rabique. Cette méthode est potentiellement applicable à n'importe quelle souche de rage, en particulier aux souches vaccinales, à condition qu'elles soient neutralisées par les hybridomes N^{os} 248.8 et 194.2.

Nous recherchons en ce moment si d'autres anticorps monoclonaux neutralisants permettent de sélectionner des mutants avirulents.

REMERCIEMENTS

Le travail décrit ci-dessus a été fait dans le laboratoire de Monsieur Ph. Vigier, Professeur à l'Université de Paris-Sud. Nous lui sommes reconnaissants pour ses conseils.

Nous remercions vivement le Centre national d'études sur la rage, en particulier son directeur, M. L. Andral, ainsi que MM. Aubert et Blancou, qui ont réalisé la plus grande partie des expériences *in vivo* sur souris et toutes les expériences sur renard.

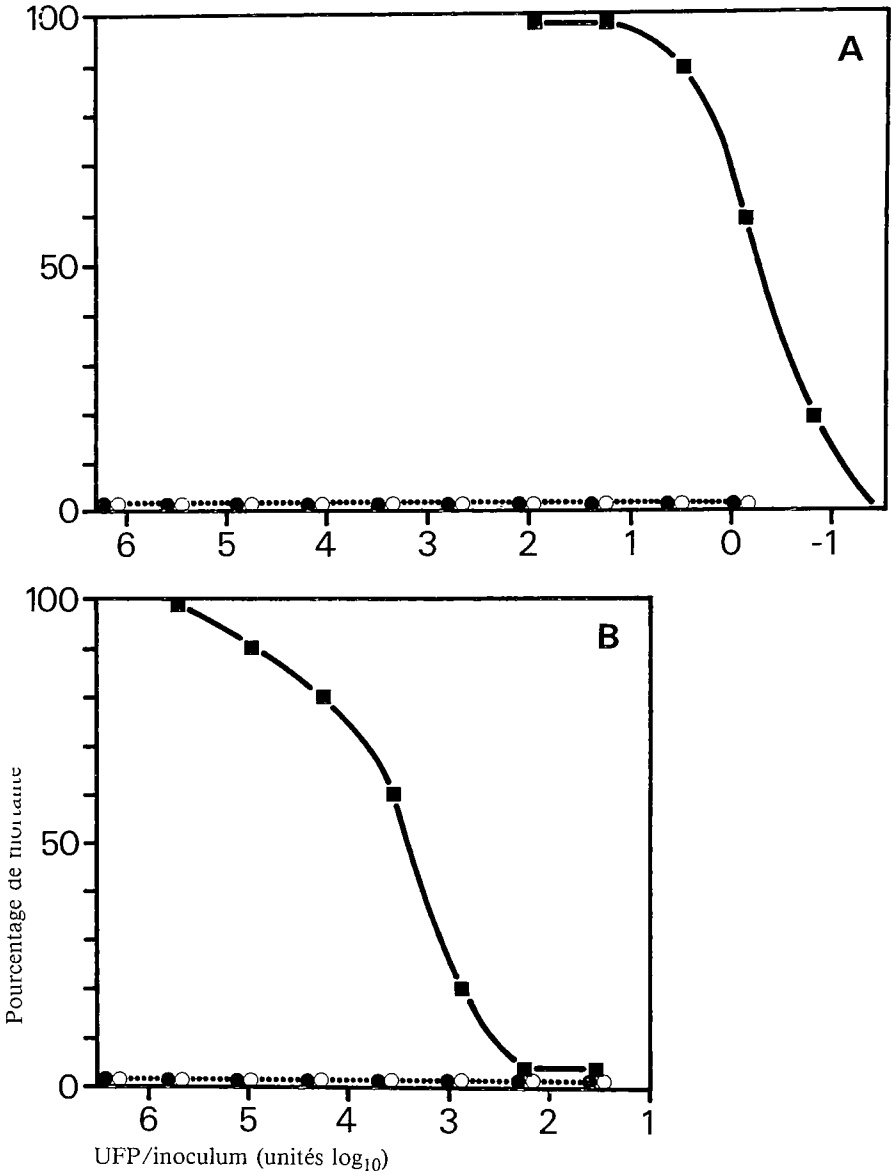


FIGURE 4. — Absence de virulence des mutants AvO₁ (●) et AvO₂ (○) pour des souris adultes, par injection intracérébrale (A) ou intramusculaire (B), par comparaison avec la souche parentale CVS (■).

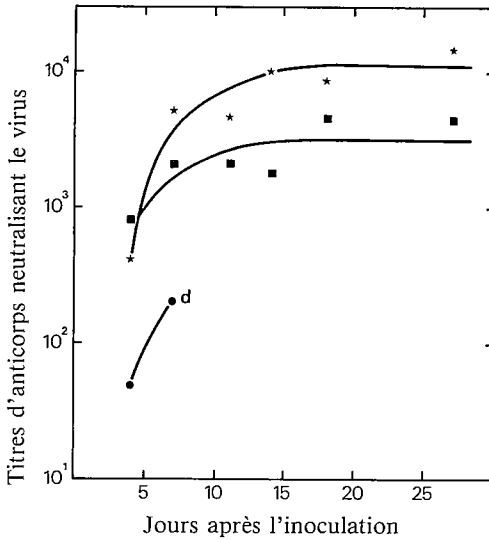


FIGURE 5. — Induction d'anticorps circulants dans des souris injectées intracérébralement avec CVS (●), AvO₁ (★) ou AvO₂ (■). (10³ UFP/animal).

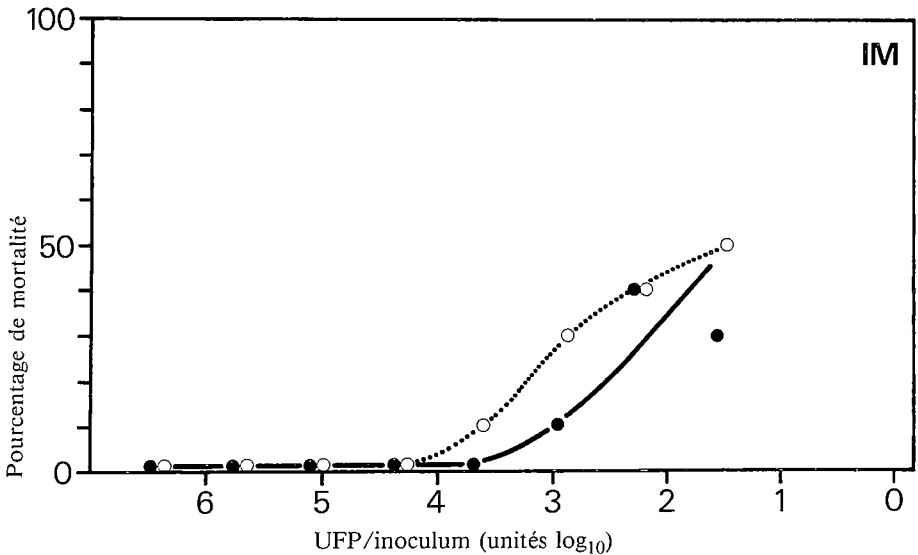


FIGURE 6. — Mortalité de souris injectées intramusculairement avec des doses croissantes d'AvO₁ (●) ou AvO₂ (○), après inoculation d'épreuve intramusculaire de 10^{3.4} LD 50 de la souche GS.

USE OF TEMPERATURE SENSITIVE AND AVIRULENT MUTANTS OF THE RABIES VIRUS AS A LIVE VACCINE. — F. Bussereau, P. Coulon and A. Flamand.

Summary : Within the framework of research into causes of virulence of the rabies virus, temperature sensitive and avirulent mutants of the CVS strain were isolated. The possibility of using these mutants as live vaccines was studied. Results obtained with avirulent mutants appeared more promising than those with temperature sensitive mutants. The method used to select avirulent mutants consisted in the isolation of those which survived neutralisation by monoclonal antibodies Nos. 248.8 and 194.2; then, their pathogenicity was studied by intracerebral inoculation to adult mice. This method has potential for application to all rabies strains which are neutralised by the above two antibodies. Further research is being conducted into the possibility of using other neutralising monoclonal antibodies to select avirulent mutants.

The possibility of selecting avirulent mutants which confer satisfactory protection to the animal against the original virulent strain undoubtedly gives way to new prospects for the use of live vaccine.

*
* *

USO DE MUTANTES TERMOSENSIBLES Y AVIRULENTOS DEL VIRUS RÁBICO COMO VACUNA VIVA. — F. Bussereau, P. Coulon y A. Flamand.

Resumen : En el marco de nuestras investigaciones sobre las causas de la virulencia del virus rábico, hemos aislado mutantes termosensibles y avirulentos de la cepa CVS. Se estudió la posibilidad de usar estos mutantes como vacunas vivas. Según parece, los resultados obtenidos con los mutantes avirulentos son más prometedores que los conseguidos con los mutantes termosensibles. El método empleado para seleccionar nuestros mutantes avirulentos consiste en aislar a los supervivientes de la neutralización mediante los anticuerpos monoclonales N^{os} 248.8 y 194.2, estudiando después su patogenicidad por inyección IC de ratón adulto. Potencialmente se puede aplicar este método a todas las cepas de rabia que son neutralizadas por ambos anticuerpos. Estamos ahora investigando si otros anticuerpos monoclonales neutralizantes permiten seleccionar mutantes avirulentos.

La posibilidad de seleccionar mutantes avirulentos que confieran al animal una correcta protección contra la cepa virulenta de origen, abre sin duda nuevas perspectivas en el uso de vacuna viva.

*
* *

BIBLIOGRAPHIE

1. AUBERT M.A., BUSSEREAU F. et BLANCOU J. (1980). — Pathogenic, immunogenic and protective powers of ten temperature sensitive mutants of rabies virus in mice. *Ann. Virol. (Institut Pasteur)*, **121 E**, 217-228.
2. BUSSEREAU F. et FLAMAND A. (1978). — Negative strand viruses and the host cell. Edited by M.W.J. Mahy and R.D. Barry, Academic Press, London, New York, San Francisco, 701-708. (Isolation and preliminary characterization of ts mutants of rabies virus.)

3. BUSSEREAU F., BENNEJEAN J. et SAGHI N. — Isolation and study of temperature sensitive mutants of rabies virus. *J. gen. Virol.* (sous presse).
 4. FLAMAND A., WIKTOR T.J. et KOPROWSKI H. (1980). — Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. II. The glycoprotein. *J. gen. Virol.*, **48**, 105-109.
 5. KOPROWSKI H. et WIKTOR T.J. (1980). — Monoclonal antibodies against rabies virus. In : *Monoclonal Antibodies* (Eds. Kennet, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B.), Plenum Press, New York, 335-351.
 6. SAGHI N. et FLAMAND A. (1979). — Biochemical characterization of temperature sensitive mutants. *J. Virol.*, **31**, 220-230.
 7. WIKTOR T.J. et KOPROWSKI H. (1978). — Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization : detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3939-3942.
-