

## Rôle des adjuvants :

Les vaccins ont pour but d'induire chez un hôte, sans lui nuire, les réactions immunes protectrices qu'il développe en générale en réponse à une attaque par un agent pathogène. Tout vaccin contient une partie antigénique spécifique de l'agent pathogène, cible fondamentale du vaccin, qui provoque une réponse des lymphocytes T (réponse cytotoxique) et B (anticorps) spécifique ainsi que la production de cellules mémoire. Ces réponses constituent la réponse d'immunité adaptative. Cette réaction est provoquée par une stimulation concomitante des lymphocytes induite par ces trois signaux :

- 1- Ag (avec le couple récepteur TCR/CMH ou BcR)
- 2- Costimulation (avec les couples CD80-86/CD28 ou CD40/CD40L ICAM /LFA ....)
- 3- Cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes CPA dont l'expression est induite par les TLR, CLR, inflammasome (entre autres) ...

Donc, pour être efficace, le vaccin doit stimuler les mécanismes de l'immunité innée qui ont pour rôle d'activer les cellules qui produisent la réponse immune acquise adaptative : c'est le but des adjuvants.

### Molécules immunostimulantes.

La découverte de la capacité du système immunitaire inné de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes, les « PAMPs » (Pathogen-associated molecular patterns), par le biais de récepteurs spécialisés, les récepteurs TLR (Toll-like receptors) et NLR (NOD-like receptors), a eu des conséquences importantes pour le développement de nouveaux adjuvants. Le système immunitaire inné joue un rôle de sentinelle : les cellules qui le constituent (notamment les cellules dendritiques) sont activées au contact des PAMPs, ce qui déclenche leur maturation qui leur permet de présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T, dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (système HLA). En même temps, elle déclenche l'émission de signaux d'alarme à base de cytokines et chimiokines qui vont attirer davantage de lymphocytes T au point d'inflammation et pousser ceux-ci à se différencier en effecteurs polarisés. Cette découverte a tout naturellement poussé à l'utilisation des PAMPs comme adjuvants.

Les adjuvants permettent donc d'augmenter le pouvoir immunogène du vaccin à travers la stimulation de la réponse innée. En particulier, et selon les cas, les adjuvants permettent :

- De garantir l'efficacité de la réponse immunitaire qu'apporte l'antigène constituant le vaccin contre la maladie infectieuse visée en augmentant la réponse immunitaire induite car sans adjuvant de nombreuses molécules étrangères du soi (antigènes du soi) sont peu ou pas immunogènes, un adjuvant est donc nécessaire pour améliorer la réponse immune. C'est même une « obligation » absolue, et non pas seulement une « aide », pour obtenir des anticorps contre un peptide ou contre un haptène (une partie de l'antigène dont la structure varie avec chaque antigène et dont dépend sa spécificité).

- Un Ag seul → réponse incomplète ou nulle
- Un Ag + un adjuvant → réponse complète
- Donc utilité/nécessité d'un adjuvant)
  - De réduire la quantité d'antigène par dose de vaccin tout en conservant une réponse optimale)
  - D'élargir le spectre de protection du vaccin à des souches dérivés à celle présente dans le vaccin (phénomène de clade cross observé dans cet article <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2694854/>)

#### **4 groupes différents :**

Végétal (saponine, extrait de glucane)

Bactérien (monophosphoryl lipide A...)

Chimique (aluminium, hydroxyde surfactants, micro et nano particules)

Cytokines (IFN $\gamma$  GM-CSF, DHEA)

#### **Propriétés requises d'un adjuvant :**

Non toxique ou toxicité négligeable

Stimule la réponse humorale et/ou l'activation des LT

Permet la production de cellules mémoires

N'induit pas une réaction auto-immune

Non mutagène/carcinogène/térogène

Non pyrogénique

Stabilité

#### **Mécanisme de la stimulation immune :**

On peut également classer les adjuvants en fonction de leur capacité d'induction de cellules, du type de réponse qu'ils initient :

##### Immunité innée :

- Un mécanisme est la formation de dépôt que l'on observe avec de l'aluminium, à base d'émulsion, et des adjuvants insolubles (connues comme adjuvants particulaires) , où les

antigènes et les adjuvants sont séquestrés au niveau du site d'injection et sont libérés au cours du temps pour stimuler les cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les macrophages et, en particulier les cellules dendritiques .

- Les adjuvants favorisent également une meilleure phagocytose des Ag par les CPA, via la reconnaissance de certains motifs (PAMP, « pathogen-associated molecular pattern » ou motifs moléculaires associés aux pathogènes) par des récepteurs présents sur les CPA, les PRR ( « pattern recognition receptor » ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires) . Par exemple, le récepteur du mannose lie des composés contenant du mannose (par exemple, les mannanes), des N- acétylglucosamine ou du fucose (par exemple des saponines) et des oligosaccharides sulfatés. La liaison de ces complexes antigène-adjuvant sur un PRR initie une endocytose médiée par le récepteur PRR plus efficace que la pinocytose d'un Ag seul. De plus, la liaison d'un PAMP sur son PRR induit des voies de signalisation conduisant à l'activation de facteur de transcription nucléaire (par exemple NF- $\kappa$  B) dans les CPA, ce qui est traduit par l'expression de gènes de cytokines, la production de molécules co-stimulatrices (telles que B7-1 ligands (CD80) et B7-2 (CD86)). Certains PRR sont membranaires, d'autres localisés dans des vésicules (les TLR) ou dans le cytoplasme (l'inflammasome ou les CLR) des CPA. On peut donc utiliser différents adjuvants qui pourront cibler différents PRR et ainsi déclencher la réponse initiale du système immunitaire inné, qui en cascade déclenche et contrôle la réponse du système immunitaire adaptatif. La plupart des PAMPs des pathogènes contenus dans les vaccins inactivés ont une faible affinité pour leurs PRRs et, par conséquent, les adjuvants qui sont fortement reconnus par les PRRs (un adjuvant est aussi un PAMP) pourraient être nécessaires pour la reconnaissance spécifique du ligand . Exemple de PAMPs / adjuvant : le LPS, le lipide A monophosphorylé et lipoarabinomannan, qui sont des composants de parois de cellules bactériennes, ou le glucane de polysaccharide de levure (toutes ces molécules se fixent sur TLR4, et sont donc « équivalentes » en terme d'adjuvant) ; CpG ADN bactérien qui est un ligand de TLR9 ; différents sels d'aluminium comme l'hydroxyde d'aluminium ou le disulfate d'aluminium et de potassium (=alun) qui sont reconnus par les différents composants de l'inflammasome.

Immunité adaptative : produits synthétiques et naturels tel que :

- les cytokines qui sont un des trois signaux de l'activation de l'immunité adaptative et vont donc participer à son activation.
- le tucaresol : il permet le recrutement de plusieurs récepteurs (par pontage non spécifique) et permet de s'affranchir d'une co-stimulation spécifique d'un ligand.

Voir l'article *Source : Vaccine adjuvants : role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity* pour plus d'information sur ce mécanisme p.7

Schéma avec : action des adjuvant

- sur les récepteurs des cytokines des lymphocytes

- en substitution du signal de costimulation
- est accumulé au site d'injection délivrant petit à petit l'antigène
- reconnaissance par les PRR

## Les différents types d'adjuvants utilisés dans les vaccins :

### 1- Les adjuvants aluminiques

Ils sont particulièrement efficaces pour induire la réponse immunitaire (processus décrit par la suite), ils sont utilisés depuis plus de 80 ans, les effets indésirables recensés sont locaux et bénins, tels que des douleurs et un gonflement au point d'injection, de la fièvre ou des maux de tête. Des effets plus graves ont été suspectés mais jamais démontrés comme la toxicité neuronale ou une auto immunité.

*Leem.org*

Ils sont administrés sous 2 formes : **l'hydroxyde d'aluminium et l'hydroxyphosphate d'aluminium.**

Ex : le Vaccin Diphtérique et Tétanique adsorbé produit par Sanofi Pasteur contient le phosphate d'aluminium, l'Avaxim produit également par Sanofi Pasteur est un vaccin dirigé contre l'Hépatite A qui contient l'hydroxyde d'aluminium, le Twinrix (produit par GlaxoSmithKline) est un vaccin contre l'Hépatite A et B qui contient à la fois l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium. De manière générale, l'hydroxyde d'aluminium est dissout très lentement dans le tissu interstitiel après injection intra-musculaire, alors que le phosphate d'aluminium se dissout beaucoup plus rapidement. [http://www.infovaccin.fr/teneur\\_aluminium.html](http://www.infovaccin.fr/teneur_aluminium.html)

Ils forment des agrégats d'aluminium fortement liés par liaison H et leur dissolution n'est possible qu'à pH2 qui n'est pas un pH physiologique donc pas de risque de libération de nanoparticules aluminiques dans l'organisme.

(diapo : schéma à pH 7 = pH du corps humain pas de libération dans l'organisme contrairement à pH 2)

La dose tolérable est de 1mg/kg de poids. La dose dans un vaccin est de 0.85mg maximum. Après 1 à 3j, la quantité d'aluminium rejoint son niveau basal. Ce taux post-vaccinal est de l'ordre de 0,1 mg Al, beaucoup plus bas que les 4 mg, taux estimé pour une dose toxique minimale.

Des travaux du début des années 2000 ont montré qu'après vaccination intramusculaire avec un vaccin aluminique, une réaction locale inflammatoire est initiée par le complexe « antigènes-sels d'aluminium », permettant un recrutement spécifique des cellules de l'immunité (monocytes, macrophages, éosinophiles). Localement, la libération de certains de ces médiateurs (notamment l'acide urique) couplée à la présence même d'hydroxyde d'aluminium induit une cascade de signaux intracellulaires dans les cellules dendritiques (activation de l'inflammasome NLRP3 et de la Caspase-1) permettant ainsi la sécrétion de 2 cytokines : l'IL-1 et l'IL-18 sous leur forme active. Dans cet environnement, certaines des cellules recrutées (monocytes CD11b+) se différencient en cellules spécialisées (cellules dendritiques), capables de migrer vers les organes secondaires spécifiques (ganglions lymphatiques) et d'y présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T, initiant ainsi la réaction immunitaire adaptative. Des études in vitro ont montré que les macrophages « chargés en

aluminium » acquièrent un phénotype de « cellules dendritiques » ainsi que les fonctions de cellules présentatrices de l'antigène et pourraient ainsi participer au processus vaccinal

## 2- Les adjuvants non aluminiques :

Les sels d'aluminium ne conviennent pas à tous les antigènes, et ne favorisent pas toujours l'induction de réponses à médiation cellulaire de type Th1 (immunité cellulaire). De nouveaux adjuvants non aluminiques ont donc été recherchés.

### A-Phosphate de calcium

Contrairement aux réactifs aluminiques, il ne provoque pas une inflammation au point d'injection mais des réactions locales d'intensité modérée et de durée beaucoup plus courte. Cependant, son pouvoir adjuvant paraît souvent beaucoup plus faible que celui des sels d'aluminium.

Article qui confirme ces observations mais pas de mécanisme connu :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95982/>

Renseignement sur les cytokines et les différentes réponses TH1 et TH2:

<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/reponse-immunitaire/comprendre/immunité-innée/cd-et-orientation-de-la-reponse-adaptative-version-bis>

### B-Liposomes

Les recherches se sont concentrées, au début, sur le concept d'effet « dépôt » et l'on a développé de nouvelles formulations d'adjuvants, dont les liposomes, les virosomes [liposomes hérissés de spicules des glycoprotéines HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase) du virus grippal], et les émulsions huile-dans l'eau (ainsi que les ISCOMs chez l'animal), tous permettant de ralentir la libération de l'antigène et sa diffusion dans l'organisme. Les **virosomes** sont utilisés comme adjuvants dans les vaccins grippe (**Inflexal™**) et hépatite A (**Epaxal™**) de Crucell.

### C-Émulsions huile-dans-l'eau.

C'est un mélange non homogène d'huile et d'eau, qui contient du squalène, qui est un précurseur de la vitamine D. On le retrouve par exemple dans l'huile de foie de requin. Le squalène, sert de base à l'adjuvant huile-dans-l'eau **MF59™**, utilisé dans les vaccins anti-grippaux (**FluAd™** et **Focetria™**). En plus d'augmenter la réponse anti-grippale chez le sujet âgé, le MF59™ élargissait le spectre de protection du vaccin H5N1 à des souches non présentes dans le vaccin mais toutefois proches (protection « cross-clade »). De plus, ces émulsions huile-dans-eau permettent de diminuer considérablement la dose d'antigène nécessaire à l'obtention de réponses protectrices (effet « dose-sparing »).

### D- Autres molécules immunostimulantes

Longue est la liste des molécules immunostimulantes. Elle comporte notamment les oligodésoxynucléotides riches en **séquences CpG** (Cytosine phosphorothioate Guanine), que l'on

trouve en quantité dans l'ADN des microorganismes, et qui sont des agonistes du TLR9. Ils ont par exemple été utilisés dans le vaccin hépatite B (**Engerix™**) de GSK Biologicals [44].

E- Combinaisons de plusieurs molécules adjuvantes :

Puisque plusieurs molécules ont des propriétés adjuvantes différentes voire complémentaires, certains adjuvants sont composés de plusieurs molécules. C'est par exemple le cas de :

- l'**AS03™** qui est une émulsion huile dans l'eau à base de squalène dans laquelle on a ajouté de l'alpha-tocophérol (vitamine E), un anti-oxydant. Cet adjuvant a été utilisé dans les vaccins grippaux H1N1 pandémique (**Pandemrix™**) et H5N1 de GSK Biologicals ce qui a permis une économie considérable d'antigène par dose, et un élargissement notable du spectre de protection vis-à-vis de variants viraux génétiquement éloignés (protection « crossclade ») [37,38].
- De **AS04™**, une combinaison de sels d'aluminium et de Monophosphoryl lipid A (MPL), un dérivé du lipopolysaccharide (LPS) de la bactérie Gram-négative Salmonella minnesota, agoniste du TLR4. Cette formulation, est utilisée comme adjuvant dans les vaccins hépatite B (**Fendrix™**) et surtout papillomavirus (**Cervarix™**) de GSK Biologicals. Elle permet d'obtenir des réponses immunitaires plus rapides, plus fortes et de plus longue durée, ainsi qu'une réponse d'immunité cellulaire contre le virus de l'hépatite B chez les patients sous dialyse (40).
- De **AS01™**, une combinaison de MPL avec des liposomes et un surfactant, le triterpène glycoside QS21 obtenu à partir de la saponine (« Quil A »). Cette formulation est encore expérimentale mais très prometteuse. Par exemple, De tous les adjuvants testés avec le vaccin anti-paludéen en développement clinique, c'est l'**AS01™** qui s'est révélé le plus efficace.

#### F-Autres molécules en développement

Un autre adjuvant à base d'autres motifs CpG a été utilisé avec succès dans un vaccin expérimental contre le cytomégalovirus. La formulation expérimentale **AS15™**, qui comporte du CpG en mélange avec du MPL et du QS21 dans une préparation à base de liposomes, paraît constituer un adjuvant de choix pour les vaccins thérapeutiques anti-cancers, car elle permet d'induire de forts titres d'anticorps et de robustes réponses T en dépit des réponses immunosuppressives de la tumeur [45]. Des études cliniques de Phase III sont en cours avec un vaccin à base d'antigène de mélanome (MAGE-3) adjuvé à l'AS15. Plusieurs autres molécules, comme la flagelline, qui est un agoniste du récepteur TLR 5, ou la fraction de la toxine de Shigellas STxB, qui comporte le site de fixation au récepteur Gb3 des cellules dendritiques, ont été utilisées comme adjuvants en les liant de façon covalente, sous forme de protéines de fusion, aux antigènes de divers vaccins expérimentaux en cours d'étude. D'autres adjuvants à base de polymères synthétiques ont également fait leur apparition sur des « marchés locaux » ou sont au stade de développement clinique, tels les imidazoquinolines (**Imiquimod™**) ou le **Polyoxydonium™**.

[www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2013/10/adjuvants-vaccinaux-rapport-ANM1.pdf](http://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2013/10/adjuvants-vaccinaux-rapport-ANM1.pdf)

Une liste non exhaustive mais très complète de tous les adjuvant est présente sur ce document :

<http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversions/659b556d-b84f-4245-9162-990ea81b6cb1>

Toutes les molécules immunostimulantes utilisées comme adjuvant agissent aussi par l'intermédiaire des cytokines qui sont les protéines médiatrices de la réponse immunitaire. On peut donc aussi imaginer utiliser certaines d'entre elles directement comme adjuvant (Tableau 7) ou alors utiliser des inhibiteurs des cytokines ayant des réponses bloquant la réponse immune (immunosuppressives).

Cytokines	Influence sur la réponse immunitaire
<b>IL-1</b>	Stimulation des LT et de la maturation des LB
<b>IL-2</b>	Activation et division des LT, orientation vers Th1
<b>IL-4</b>	Orientation vers la voie Th2
<b>IL-12</b>	Orientation vers la voie Th1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Orientation vers la voie Th1
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Activation des cellules dendritiques (CPA)

Tableau 7 : Différentes cytokines pouvant être utilisées comme adjuvant <sup>74</sup>

Néanmoins, de nombreux obstacles compliquent l'utilisation des cytokines comme adjuvant. Tout d'abord, l'effet immunostimulant ou immunosuppresseur d'une cytokine dépend de sa dose et de l'antigène avec lequel il est associé. Il est donc difficile de prévoir son effet sur le système immunitaire. Ensuite, certaines cytokines sont spécifiques d'espèce ce qui rend leur utilisation difficile chez l'Homme. Par ailleurs, les recherches menées sur le sujet ont montré des effets indésirables sur la fonction circulatoire (notamment pour l'IL-2 et l'IL12). Enfin, comme souvent lorsque l'on essaie d'influencer le système immunitaire, le risque d'auto-immunité apparaît.<sup>74</sup>