

NOTE D'EXPERTISE GRAND PUBLIC

SUR LES VACCINS AYANT RECOURS AUX TECHNOLOGIES OGM

Septembre 2020

Dr Christian VELOT

Généticien moléculaire à l'Université Paris-Saclay

Président du Conseil scientifique du CRIIGEN

I. Rappels de quelques notions et de terminologie

1. La cellule, l'ADN, l'ARN, les protéines

L'ADN est le support de l'information génétique. Il est localisé dans un compartiment particulier de chaque cellule de l'organisme, le noyau, lequel est séparé du reste de la cellule (le cytoplasme) par une membrane biologique appelée membrane nucléaire et contenant des ouvertures (les pores nucléaires). Chaque cellule est elle-même délimitée par une membrane biologique appelée membrane plasmique et constituée d'une bicouche de lipides (Figure 1). L'information génétique est identique dans toutes les cellules du corps d'un même individu, et est répartie sur plusieurs entités appelées chromosomes. Chez les humains, le nombre de chromosomes différents est de 23. Ils sont présents en double dans chaque cellule (à l'exception des spermatozoïdes et des ovules où ils ne sont qu'en un seul exemplaire), soit 46 chromosomes (23 paires comprenant chacune un chromosome provenant du père et l'autre provenant de la mère). L'ensemble des chromosomes d'un organisme vivant constitue son génome. Chaque chromosome est constitué de deux brins parallèles entourés autour d'un axe pour former une double hélice : la double hélice d'ADN. Chacun des deux brins de cette double hélice est lui-même constitué de l'enchaînement de quatre molécules plus petites, les nucléotides, que l'on désigne par leurs initiales respectives, c'est-à-dire quatre lettres : A, G, C, T (Figure 1).

Les gènes sont des segments de chromosomes (des morceaux de séquences en quatre lettres) qui détiennent une (ou des) information(s) biologique(s) permettant aux cellules de fonctionner. Un même gène chez une même espèce peut exister sous différentes formes, avec de légères modifications de séquence : ce sont les différents allèles d'un gène. Les allèles de l'ensemble des gènes d'un individu déterminent son génotype. Pour l'essentiel des gènes que nous connaissons aujourd'hui (et qui ne représentent qu'une toute petite partie d'un génome), les gènes détiennent le secret de fabrication des protéines. Les protéines sont de grosses molécules constituées par l'enchaînement linéaire, non pas de quatre, mais de 20 molécules différentes : les acides aminés (Figure 1). Le passage d'un gène à une protéine correspond donc au passage d'un langage en quatre lettres (A,G,C,T : le langage génétique) à un langage en 20 lettres (les 20 acides aminés : le langage protéique). Ce processus s'appelle d'ailleurs la traduction.

Toutefois, le passage du gène à la protéine n'est pas direct : il nécessite une molécule intermédiaire, constituée elle aussi de l'enchaînement de quatre nucléotides (langage génétique A,G,C,U au lieu de A,G,C,T) et formée d'un seul brin (simple hélice). Il s'agit d'une molécule d'ARN, appelée aussi *transcrit* car elle est le résultat d'un processus appelé transcription (passage de l'ADN à l'ARN) qui a lieu dans le noyau. Cette molécule d'ARN va ensuite sortir du noyau par les pores nucléaires pour rejoindre le cytoplasme où elle sera traduite en protéine. L'expression d'un gène codant une protéine se fait donc en deux étapes, la première (nucléaire) étant la transcription, et la seconde (cytoplasmique) la traduction (Figure 1).

Précisons que tous les gènes ne codent pas des protéines. Autrement dit, l'expression des gènes ne comprend pas toujours une étape de traduction mais, en revanche, passe systématiquement par une étape de transcription. Les transcrits ne sont donc pas toujours des intermédiaires mais peuvent être les produits finis de l'expression génique.

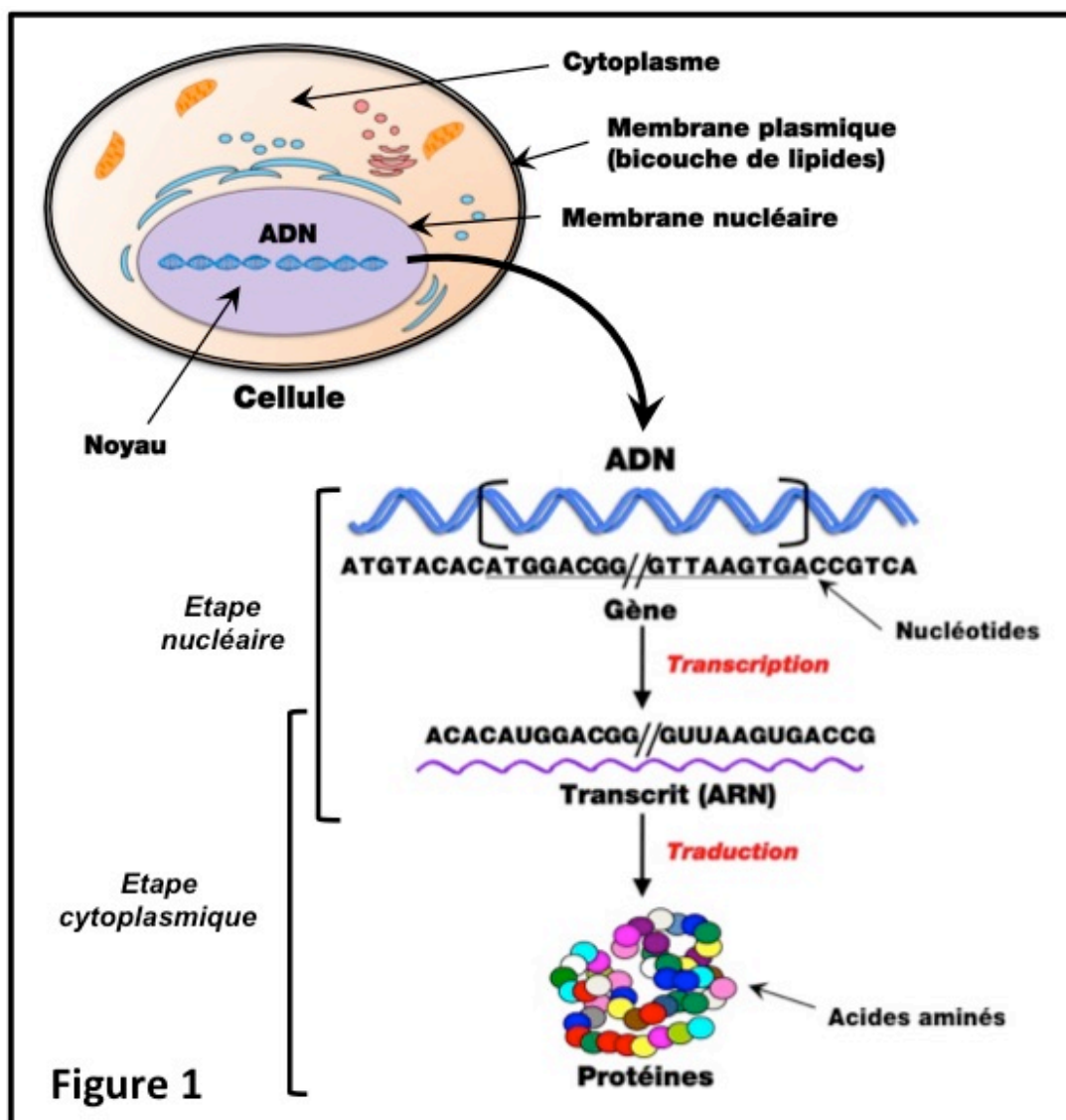


Figure 1

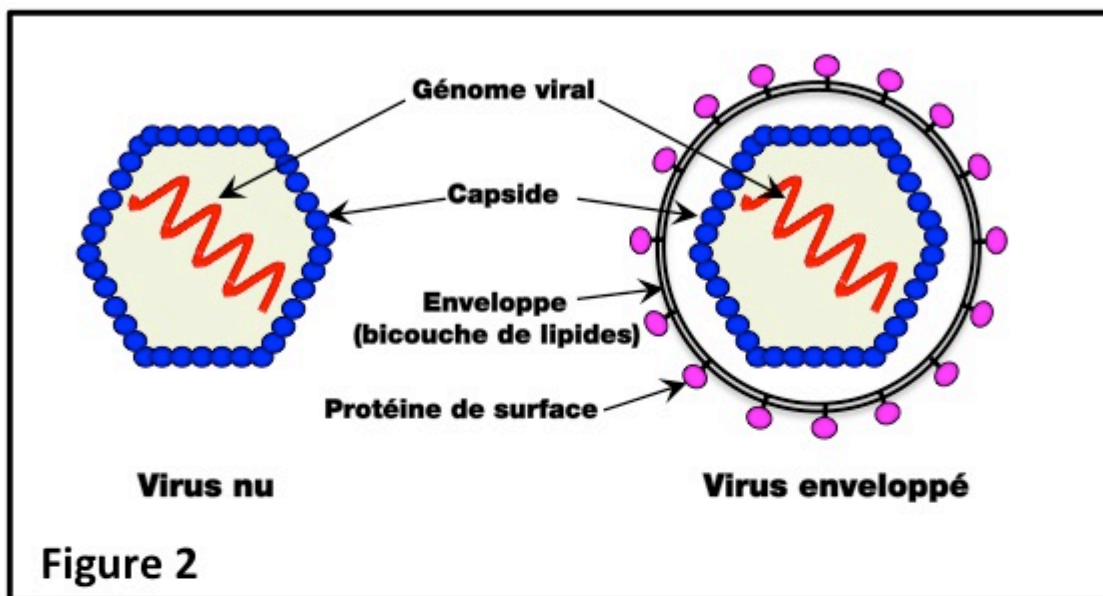
2. Les virus

Les virus sont des agents infectieux constitués d'une coque protéique appelée capsid, constituée de la juxtaposition d'un grand nombre d'exemplaires d'une protéine virale, et renfermant le matériel génétique du virus (Figure 2) qui est soit de l'ADN soit de l'ARN. De nombreux virus sont en plus entourés d'une enveloppe qui est constituée d'une bicouche de lipides correspondant à celle de la membrane plasmique de leurs cellules hôtes (les cellules qu'ils infectent) et contenant des protéines qui y sont enchâssées : les protéines de surface du virus (Figure 2). Les virus possédant une enveloppe sont appelés des virus enveloppés ; ceux n'en possédant pas sont les virus nus (Figure 2). Le virus SARS-CoV-2, responsable de la Covid-19, est un virus enveloppé, de même que le virus de la grippe ou le VIH, responsable du SIDA.

Les virus n'ont pas la capacité de se reproduire seuls et doivent nécessairement infecter des cellules hôtes dont ils détournent l'activité au profit de leur propre multiplication. Pour cela, les virus injectent leur matériel génétique dans les cellules qu'ils infectent. Celles-ci vont alors multiplier ce matériel génétique et exprimer les gènes viraux qu'il contient afin de

produire en grand nombre les protéines virales. De nombreuses particules virales vont alors se reconstituer à l'intérieur de la cellule infectée.

Pour les virus nus, la reconnaissance des cellules hôtes se fait par l'intermédiaire des protéines de la capsidie qui vont interagir spécifiquement avec une ou plusieurs protéine(s) située(s) dans la membrane plasmique des cellules hôtes. Cette interaction permet l'encrage du virus à la surface de la membrane plasmique puis sa pénétration dans les cellule ainsi infectées. Dans le cas des virus enveloppés, la reconnaissance et l'encrage se fait par la protéine de surface, et la pénétration du virus par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule hôte.



Une fois à l'intérieur de la cellule infectée, le matériel génétique viral va y être pris en charge selon des mécanismes différents en fonction notamment de sa nature : ADN ou ARN.

Pour les virus à ADN, l'ADN viral est directement pris en charge par la machinerie de la cellule infectée afin de le répliquer et d'exprimer ses gènes pour produire les protéines virales. Dans un certain nombre de cas, l'ADN viral peut aussi s'intégrer dans le génome des cellules infectées (c'est notamment le cas du papillomavirus responsable de cancers de l'utérus).

Concernant les virus à ARN, on distingue deux grands cas de figure.

Pour certains virus à ARN, comme le VIH, l'ARN viral est d'abord transformé en ADN sous l'action d'une enzyme virale, la transcriptase inverse, injectée dans la cellule infectée avec l'ARN viral. Cette étape est donc l'inverse d'une transcription, qui, elle, consiste à faire de l'ARN à partir d'ADN (Figure 1). L'ADN viral ainsi obtenu pénètre dans le noyau par les pores nucléaires et s'intègre alors au génome des cellules infectées. Cette seconde étape, pour se faire avec une grande efficacité, nécessite à nouveau une enzyme virale : l'intégrase. La cellule infectée peut alors prendre en charge l'ADN viral comme s'il s'agissait du sien et le transcrire en un grand nombre d'exemplaires, certains des transcrits seront traduits afin de produire les protéines virales.

Pour d'autres virus à ARN, comme le SARS-CoV-2, l'ARN viral est directement pris en charge par la machinerie cellulaire pour le traduire et ainsi fabriquer les différentes protéines virales, dont l'enzyme nécessaire à la répllication en un grand nombre d'exemplaires de cet ARN. Il n'y a donc pas dans ce cas présence ou production d'ADN viral, et donc pas d'intégration du génome viral dans les cellules infectées. C'est aussi le cas du virus de la grippe même si son ARN viral ne peut être traduit directement par la machinerie cellulaire et doit d'abord être répliqué en une copie complémentaire grâce à une enzyme virale directement libérée dans la cellule avec l'ARN.

II. La vaccination

La vaccination a pour but de stimuler les défenses immunitaires d'un humain ou d'un animal vis-à-vis d'un agent infectieux en l'exposant volontairement à cet agent (sous une forme atténuée ou inactivée) ou à l'un de ses composants appelé antigène (généralement une protéine).

Pour ce qui est des virus, la plupart des vaccins consiste jusqu'à aujourd'hui à injecter une forme atténuée (« vaccins vivants ») ou inactivée (« vaccins inactivés ») du virus entier.

L'atténuation est obtenue principalement selon deux procédés. Le premier consiste à faire passer le virus sur des cultures de cellules d'une autre espèce : il reste alors immunisant mais ne peut plus se multiplier chez l'homme. C'est le procédé utilisé notamment pour les vaccins contre la rougeole, les oreillons, la rubéole, la varicelle. Le second procédé consiste à utiliser soit des mutants thermosensibles du virus, soit des virus adaptés au froid après passages successifs en cultures cellulaires à basse température : ces virus ont alors une capacité très réduite à se multiplier à 37°C (et donc chez l'humain). Ce procédé a été utilisé notamment pour un ancien vaccin contre le virus de la grippe administré par voie nasale (Fluenz®, aujourd'hui retiré) et pour le vaccin contre le virus respiratoire syncytial (VRS). Les principaux inconvénients sont d'une part les risques d'apparition de révertants du virus (souche sauvage) par recombinaison entre la souche vaccinale et une souche pathogène présente chez l'hôte vacciné (c'est-à-dire une ré-acquisition de pathogénicité par la souche vaccinale initialement atténuée), et d'autre part une contre-indication chez les personnes immunodéprimées ou chez les femmes enceintes en raison d'un risque d'atténuation insuffisante pour ces personnes.

L'utilisation de virus inactivés est donc plus sûre (mais pas dénuée de tout risque pour autant : voir section suivante). L'inactivation est soit chimique (traitement au formaldéhyde essentiellement), soit physique (chaleur ou irradiation). Ce type de vaccins dits « inactivés » concerne notamment la grippe, l'hépatite A, la poliomyélite, la rage. Leur désavantage est qu'ils provoquent une réponse immunitaire plus faible, ce qui nécessite des injections multiples et répétées, ainsi que l'utilisation d'adjuvants tels que l'aluminium ajoutés pour potentialiser l'effet immunogène du vaccin, et susceptibles d'engendrer des effets toxiques.

Depuis les années 90, des vaccins sont obtenus en ayant recours aux biotechnologies. Actuellement, cela consiste principalement à faire produire à des cellules cultivées en laboratoire (essentiellement des cellules de bactéries, de levures ou de champignons filamenteux) une protéine d'un agent infectieux (antigène). Il s'agit donc de cellules transgéniques dans le génome desquelles a été inséré le gène de l'agent infectieux codant cet antigène. L'antigène en question est alors purifié et associé à divers adjuvants pour élaborer un vaccin qui sera injecté aux patients. C'est notamment le cas du vaccin Engerix™-B contre l'hépatite B où la protéine de surface de ce virus a été produite dans des cellules d'une levure transgénique (levure de boulanger) exprimant le gène viral en question. Le coût de production est relativement élevé en raison notamment de l'étape de purification de l'antigène à partir des cellules transgéniques qui le produisent.

Enfin, de nouvelles stratégies faisant également appel aux biotechnologie sont en cours de développement depuis plusieurs années. Elles consistent à faire produire l'antigène de l'agent infectieux directement par les cellules de l'hôte (de la personne que l'on cherche à vacciner) en lui injectant l'ADN ou l'ARN codant la protéine virale en question.

L'introduction de ce matériel génétique dans les cellules de l'hôte nécessite d'utiliser des « véhicules » appelés vecteurs. Ces vecteurs sont soit dérivés de petites molécules d'ADN circulaire bactérien, appelées plasmides, et dans lesquelles a été introduit l'ADN viral codant la protéine antigénique, soit des nanoparticules de lipides dans lesquelles sont emprisonnées l'ARN codant cet antigène, soit encore des virus génétiquement modifiés dits « désarmés », c'est-à-dire rendus notamment incapables de se répliquer par élimination d'une partie de leur matériel génétique (ADN ou ARN), lequel est remplacé par le matériel génétique d'intérêt que l'on souhaite introduire dans les cellules de l'hôte. Dans ce dernier cas, on utilise alors la capacité naturelle des virus en question à injecter le matériel génétique qu'ils contiennent dans les cellules humaines.

III. Les projets de vaccins contre la Covid-19

Selon la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) actualisée au 22 septembre 2020 [1], 38 candidats vaccins font l'objet d'essais cliniques (de phase I, II ou III). Six d'entre eux utilisent le virus inactivé, tous les autres reposent sur des approches biotechnologiques et consistent à injecter soit a) une protéine du virus (antigène) ; b) des particules pseudo-virales ; c) l'ADN ou l'ARN codant l'antigène.

- a) Dans le cas où le vaccin consiste à injecter une protéine du virus, celle-ci est produite en laboratoire par des cellules transgéniques dans lesquelles a été introduit une construction génétique contenant le gène viral correspondant et permettant son expression en grande quantité dans les cellules en question. Ces cellules sont alors cultivées à grande échelle dans des fermenteurs (bioréacteurs) et la protéine est extraite des cellules et purifiée. Cela concerne 13 des 38 vaccins en cours d'essais
- b) Une particule pseudo-virale (VLP en anglais : *virus-like particle*) est en fait la capsid sans le génome viral, obtenue par l'assemblage spontané de la protéine de la capsid elle-même produite en laboratoire dans des cellules transgéniques. Dans ce cas précis (1 seul des 38 vaccins testés), il s'agit de cellules de plantes.
- c) Les 18 vaccins restants consistent donc à introduire du matériel génétique viral dans les cellules de la personne à vacciner (l'administration est essentiellement intramusculaire, voire intradermique dans deux des cas). Il s'agit soit d'ARN emprisonné dans des nanoparticules de lipides (6 cas), soit d'ADN inséré dans un plasmide (4 cas), soit encore d'ADN ou d'ARN délivré par un virus génétiquement modifié désarmé (8 cas).

IV. Analyse des risques liés à chaque type de candidat vaccin contre la Covid-19

1. Vaccins inactivés

Le fait qu'un vaccin utilise un virus inactivé ne signifie pas une absence de risques. L'effet immunisant de ce type de vaccins est moindre qu'avec un virus atténué. Il nécessite donc des injections répétées et l'ajout d'adjuvants, présentant potentiellement des effets toxiques, pour potentialiser l'effet immunogène (cf. partie II). Une étude suisse de 2004 [2] a montré qu'un vaccin inactivé de la grippe, en administration intra-nasale, provoquait chez un grand nombre de patients la paralysie de Bell (paralysie de l'ensemble des muscles du visage), sans qu'on en connaisse toutefois la raison exacte. Ce vaccin a depuis été retiré.

Par ailleurs, plusieurs études ont révélé une augmentation du risque d'infection (par le même virus ou d'autres) suite à une vaccination avec des vaccins inactivés. C'est le cas de vaccins de la grippe, Vaxigrip et Fluzone. Pour le premier il a été montré en 2012 qu'il augmentait chez des enfants de 6 à 15 ans le risque d'infection par d'autres virus respiratoires [3]. Le second s'est avéré augmenter le risque d'infection par la grippe chez des adultes obèses [4]. Plus récemment, en 2019, une étude révèle qu'un vaccin inactivé de la dengue augmente la taux d'infection par le même virus chez des macaques [5], ce qui avait déjà été observé auparavant avec un virus atténué chez des enfants non exposés à la dengue avant vaccination [6].

Des précautions toutes particulières doivent donc être prises avec des vaccins inactivés contre la Covid-19, d'autant plus que le virus qui en est responsable est totalement nouveau et que nous sommes loin d'en cerner tous les effets.

2. Vaccins contenant la protéine antigénique et vaccins VLP

Outre le coût qu'ils représentent en raison de l'étape plus ou moins lourde de purification de la protéine virale à partir des cellules transgéniques qui la produisent, ces vaccins s'avèrent être peu efficaces et peuvent présenter des effets toxiques dus essentiellement aux adjuvants (tels que l'aluminium ou le formaldéhyde par exemple) ajoutés justement pour pallier la faible efficacité et donc potentialiser la stimulation du système immunitaire, mais également éventuellement à l'antigène lui-même qui, en étant produit par des cellules transgéniques (qui ne sont donc pas celles qui le produisent normalement) peut présenter des différences structurelles ou chimiques qui pourront lui conférer des propriétés inattendues. En effet, si le message génétique contenu dans le gène viral (transgène) dicte aux cellules qui l'hébergent (cellules transgéniques), lors du processus de traduction, la nature et l'ordre d'enchaînement des acides aminés pour fabriquer la protéine virale (antigène), il n'est en revanche que très partiellement responsable de la manière dont la protéine doit se replier dans l'espace. Ce repliement dépend en partie de la nature et de l'ordre d'enchaînement des acides aminés (et donc du gène) mais essentiellement de l'environnement de la cellule dans laquelle la protéine est fabriquée (acidité, concentration en sels...). Or l'environnement cellulaire peut varier considérablement d'un type cellulaire à un autre, et on n'aura donc jamais la certitude que la protéine d'intérêt (ici l'antigène viral) est correctement repliée lorsqu'elle est artificiellement fabriquée par les cellules transgéniques, même lorsque cette protéine conserve l'activité biologique qui nous intéresse (ici, son caractère immunogène) [7]. Le mauvais repliement d'une protéine peut avoir des conséquences absolument imprévisibles et parfois très fâcheuses. N'oublions pas que les maladies à prions, par exemple (maladie de la vache folle, maladie de Creutzfeldt-Jakob, tremblante du mouton, etc...), sont dues à de simples défauts de repliement d'une protéine particulière. Certes, tous les défauts de repliement ne font pas des prions..., mais prions pour que la protéine virale se replie bien.

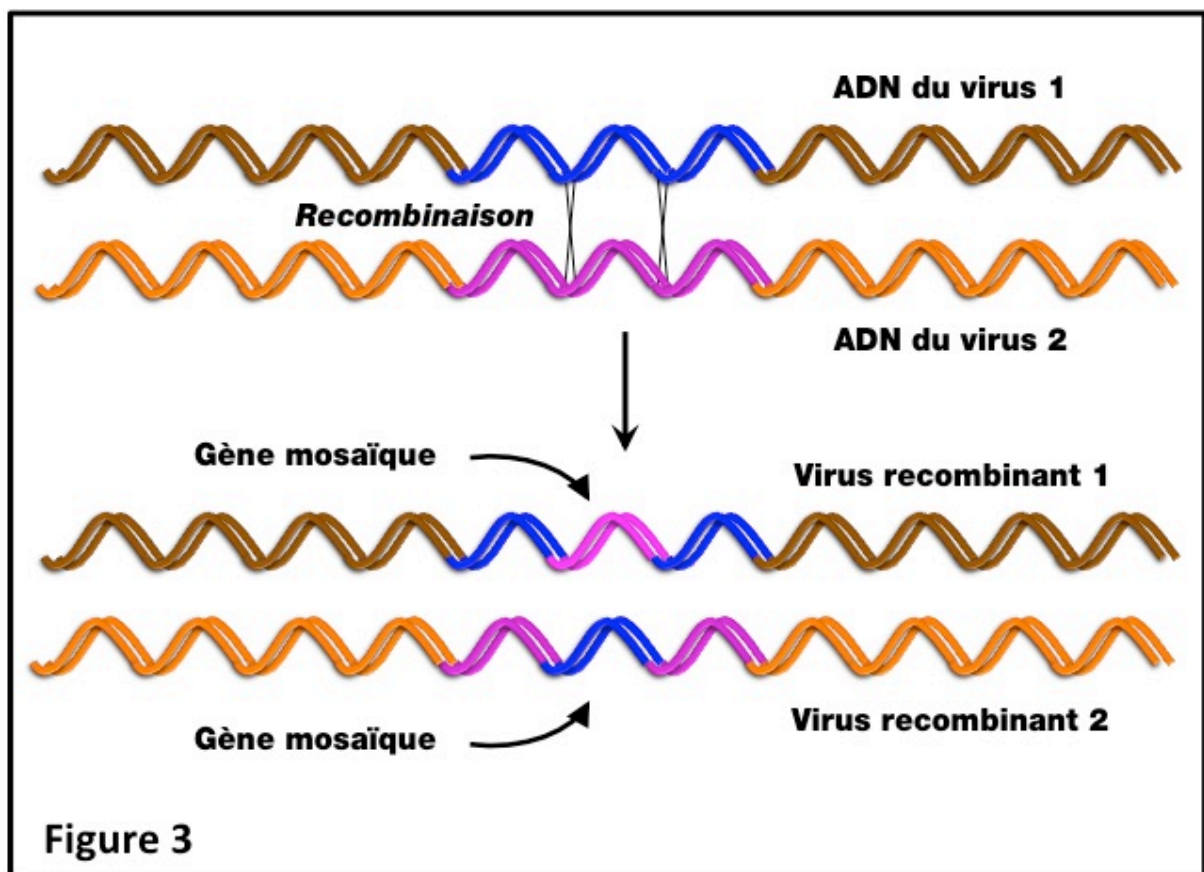
Par ailleurs, une fois son repliement terminé, la protéine peut faire l'objet de modifications chimiques secondaires (dites « post-traductionnelles ») tels que des ajouts de sucres, de phosphates, qui peuvent être nécessaires à sa fonctionnalité, à son activité, ou lui conférer des propriétés particulières telles que — justement — des propriétés immunogènes. Là encore, on n'aura jamais la certitude que ces modifications post-traductionnelles (qui ne sont pas « dictées » par le gène) mises en place dans les cellules transgéniques sont absolument identiques à ce qu'elles sont dans les cellules où la protéine est naturellement fabriquée (ici, les cellules naturellement infectées par le virus) [7].

3. Les vaccins délivrant l'ARN ou l'ADN codant la protéine antigénique

3.1. Le risque d'apparition de virus recombinants

Ce risque est indépendant du vecteur utilisé pour délivrer dans les cellules de l'hôte l'ADN ou l'ARN viral codant l'antigène protéique, qu'il s'agisse d'un vecteur plasmidique, d'une nanoparticule ou d'un virus génétiquement modifié. Toutefois, ce risque est encore plus grand dans le cas du recours à des virus génétiquement modifiés car ceux-ci apportent non seulement l'ADN ou l'ARN viral d'intérêt mais également une partie de leur propre génome.

Les virus ont une grande capacité à échanger des fragments de leur matériel génétique respectif dès lors que les génomes viraux concernés sont de même nature (soit ADN, soit ARN) et qu'ils partagent des séquences (des gènes) qui se ressemblent. Le processus bien connu qui régit ces échanges s'appelle la recombinaison (et lorsque cette recombinaison a lieu entre séquences d'ADN ou d'ARN qui se ressemblent, on parle de recombinaison homologue). Ce phénomène de recombinaison n'est pas réservé à l'ADN ou l'ARN viral mais les séquences virales sont connues pour faire l'objet de nombreuses recombinaisons (on dit qu'elles sont très « recombinogènes »). Il résulte de ces recombinaisons, entre matériels génétiques viraux, des virus dits « recombinants » dont le ou les gène(s) qui a (ont) été le site de ces échanges sont dits « mosaïques », c'est-à-dire constitués en partie de séquences provenant du virus 1 et de séquences provenant du virus 2 (Figure 3). La Figure 3 illustre la recombinaison entre ADN viraux mais ce phénomène peut se produire tout aussi bien entre ARN viraux.



Dans un certain nombre de cas, ces virus recombinants sont beaucoup plus virulents que les virus d'origine et peuvent donc provoquer des viroses aggravées. Ce phénomène a été

largement démontré chez des plantes transgéniques dans lesquelles un gène viral a été volontairement introduit dans leur génome, et infectées par un virus apparenté à celui d'où provient le transgène viral [8-16]. Un exemple très médiatisé de virus recombinant pouvant provoquer des viroses aggravées chez l'humain est celui du virus H1N1 de 2009, recombinant entre trois souches de virus de la grippe : une souche porcine, une souche humaine et une souche aviaire [17, 18].

Bien sûr, ce phénomène ne peut se produire que si du matériel génétique provenant d'au moins deux virus se retrouve dans les mêmes cellules, ce qui est fort heureusement extrêmement rare dans la nature puisque cela implique que des mêmes cellules soient co-infectées par au moins deux virus. Mais sous l'effet de la main de l'homme, ce phénomène peut devenir beaucoup plus courant. C'est bien sûr le cas, comme mentionné précédemment, des plantes transgéniques dans lesquelles a été introduit un transgène viral où il suffit alors que ces plantes soient infectées par un seul virus pour que de tels événements de recombinaison aient lieu. Mais c'est aussi le risque que l'on fait courir chez les humains dès lors que l'on génère des vaccins délivrant dans les cellules des patients de l'ARN ou de l'ADN viral. Les vaccins anti-Covid-19 de ce type faisant l'objet d'essais cliniques sont administrés en intramusculaire ou en intradermique. Les cellules cibles sont donc des cellules musculaires, des cellules de la peau, des fibroblastes (cellules du tissu conjonctif, c'est-à-dire du tissu de soutien qui enveloppe les organes, les tissus, et notamment les faisceaux musculaires) mais aussi des cellules du sang circulant et des cellules endothéliales (qui tapissent les vaisseaux sanguins), autant de cellules qui peuvent être la cible d'infections par d'autres virus. Par exemple des entérovirus (virus nus à ARN) ont été détectés dans des cellules musculaires [19], le virus Zika infecte les cellules de la peau [20], le Chikungunya a pour cible les cellules musculaires satellites (cellules souches du tissu musculaire) [21], mais aussi les cellules endothéliales et les fibroblastes [22]. Et ce ne sont là sans doute que quelques exemples...

La vaccination contre le Covid-19, si elle devient réalité, sera une vaccination de masse à travers le monde entier. La probabilité que ce genre d'évènements survienne est donc loin d'être nulle même si elle reste sans doute faible en terme de fréquence. Une telle vaccination de masse avec ce type de vaccins pourrait devenir une fabrique à grande échelle de nouveaux virus recombinants. N'oublions pas qu'il suffit qu'un seul nouveau virus apparaisse quelque part dans le monde pour que les conséquences sanitaires, environnementales, sociales, soient mondiales et colossales...

3.2. Le risque de mutagenèse insertionnelle (génotoxicité)

La mutagenèse insertionnelle est une mutation (modification de l'information génétique) par insertion d'une séquence à l'intérieur d'un génome, cette insertion pouvant alors inactiver ou modifier l'expression d'un ou plusieurs gène(s).

Ce risque de génotoxicité pour les cellules humaines cibles de la vaccination (dont le génome est bien sûr de l'ADN) ne concerne donc que les vaccins délivrant de l'ADN viral, que le vecteur soit un plasmide ou un virus génétiquement modifié. Toutefois, ce risque peut également concerner les vaccins délivrant de l'ARN par le biais d'un vecteur viral génétiquement modifié à ARN du type du virus du sida (VIH, très utilisé comme vecteur) si celui-ci n'a pas été correctement dépourvu de sa transcriptase inverse et du gène la codant. En effet, la transcriptase inverse virale peut alors convertir l'ARN délivré en ADN, lequel ira s'intégrer dans le génome des cellules cibles.

Les virus génétiquement modifiés sont également très utilisés à des fins de thérapies géniques pour délivrer dans ce cas la version normale d'un gène humain qui s'avère défaillant (muté) chez le patient traité. En 2002, trois ans après un essai de thérapie génique (chez des

enfant atteints d'une immunodéficience sévère due à une mutation sur un gène du chromosome X) utilisant un virus à ARN génétiquement modifié comme vecteur, deux des 10 enfants traités ont développé une leucémie due à l'insertion de l'ADN réparateur délivré par le vecteur viral à proximité d'un proto-oncogène (gène de cancer), provoquant une perturbation sévère de l'expression de celui-ci [23]. Plusieurs études ont montré les effets de mutagenèse insertionnelle provoqués par différentes familles de virus à ARNs (dont le VIH) [24]. De même, plusieurs études réalisées chez des souris ont montré que la délivrance de gènes par des vecteurs dérivés du virus adéno-associé (AAV, petit virus à ADN non pathogène) résultent en une mutagenèse insertionnelle [25]. En 2016, une étude sur les effets génotoxiques des vecteurs viraux dérivés du VIH et du AAV, utilisés à des fins de thérapie génique, conclut que « *une connaissance approfondie de la biologie virale et des progrès en génétique cellulaire sont nécessaires pour élucider la nature de la sélection des sites d'intégration des vecteurs viraux et les risques associés* » [26].

4. Risques spécifiquement liées à l'utilisation de vecteur viraux modifiés : immunotoxicité

Outre les risques d'apparition de virus recombinants et de mutagenèse insertionnelle (surtout lorsque le matériel génétique délivré est de l'ADN), les vecteurs viraux étant eux-mêmes immunogènes, ils peuvent engendrer d'importants effets d'immunotoxicité.

En 2002, une expérience pilote de thérapie génique, réalisée chez 18 garçons souffrant d'un grave trouble métabolique dû à un gène défaillant situé sur le chromosome X, a conduit au décès d'un jeune homme de 18 ans en raison d'une réponse inflammatoire systémique fatale provoquée par le vecteur viral (virus à ADN humain désarmé) : des séquences d'ADN du vecteur ont été retrouvées dans la plupart de ses tissus [27]. Le fait que les 17 autres individus traités n'ont absolument pas manifesté ce type de réponse montre à quel point ce risque est difficilement prévisible et donc maîtrisable. En Belgique, plusieurs essais cliniques d'immunothérapie pour lutter contre des cancers et utilisant un virus désarmé où plus de 15% de son génome a été remplacé par deux gènes humains (codant un antigène présent à la surface des cellules cancéreuses et une interleukine, protéine de communication entre cellules immunitaires) ont montré une activation non spécifique du système immunitaire liée au vecteur résultant en une réaction inflammatoire et une réponse auto-immune [28]. De nombreux autres études ont montré des effets d'immunotoxicité de divers vecteurs viraux utilisés à des fins de thérapie génique ou de vaccination [29-33]. Dans le cas des vecteur viraux utilisés à des fin de vaccination, l'immunité anti-vecteur peut aussi directement interférer avec l'efficacité vaccinale recherchée (l'immunogénocité du vaccin) [34].

V. Considérations générales relatives à l'évaluation des risques liés à ces vaccins

Le recours à des vaccins délivrant du matériel génétique viral (ADN ou ARN) est nouveau ou récent. L'utilisation de virus génétiquement modifiés comme vecteurs, notamment à des fins de thérapie génique ou d'immunothérapie a montré à quel point les effets indésirables sont variés, non maîtrisés et peuvent être graves. Si les tentatives de l'immunothérapie sont relativement récentes, les échecs de la thérapie génique depuis près de 35 ans sont là pour nous le rappeler. Ces échecs s'expliquent en grande partie par la recherche du scoop au détriment de l'efficacité et/ou la biosécurité. Une telle démarche ne permettra jamais de répondre à l'attente et aux besoins en terme de soin.

Mais l'utilisation de ces mêmes vecteurs à des fins de vaccination revêt encore une autre dimension. En effet, la thérapie génique ou l'immunothérapie concernent non seulement un nombre limité de personnes mais des personnes gravement malades. Par conséquent, non seulement les éventuels effets secondaires concernent un nombre restreint d'individus mais la gravité de leur état de santé et la situation d'urgence sanitaire dans laquelle ils se trouvent permet sans doute d'accepter une certaine prise de risques. Dans le cas de vaccins, nous sommes dans une démarche de prévention. Cela concerne donc un nombre considérable de personnes dont la grande majorité est en bonne santé (en tout cas vis-à-vis de la pathologie de laquelle le vaccin est censé nous protéger). Des effets secondaires non maîtrisés auraient donc des retombées considérables, surtout dans une campagne de vaccination de masse telle que celle destinée à lutter contre la Covid-19. Ces retombées pourraient être désastreuses sur le plan sanitaire bien sûr mais également sur le plan environnemental (dans le cas par exemple de la propagation de nouveaux virus recombinants : voir section IV.3.1.). Et le fait qu'il s'agisse d'une démarche de prévention n'autorise aucune prise de risque.

Par conséquent, ces candidats vaccins nécessitent une évaluation sanitaire et environnementale approfondie incompatible avec l'urgence, qu'il s'agisse de celle résultant de la pression des autorités décisionnelles et sanitaires ou celle des profits des industries pharmaceutiques embarquées dans cette course au vaccin. Dans sa note de cadrage du 23 juillet 2020 sur la stratégie vaccinale contre la Covid-19 [35], la Haute Autorité de Santé (HAS) déclare : « *Dans le cadre de la pandémie de Covid-19, l'enjeu est donc de concevoir un vaccin le plus efficace et le plus sûr possible en un temps record* ». Cette allégation est un non sens et une aberration de la part d'une autorité telle que la HAS.

Les dangers liés aux caractéristiques des vecteurs viraux génétiquement modifiés ou à leur éventuelle dispersion ou dissémination doivent être traités dans le cadre d'une évaluation des risques environnementaux extrêmement contraignante.

Au contraire, les articles 2 et 3 du tout récent règlement européen 2020/1043 selon lesquels tout essai clinique de médicaments contenant des OGM ou consistant en de tels organismes et destinés à traiter ou à prévenir la Covid-19 échappe aux évaluations préalables sur la santé et l'environnement ouvre la porte au plus grand laxisme en terme d'évaluation et va totalement à l'encontre du principe de précaution.

De plus, ce règlement, remet en cause, de fait, la législation de confinement qui s'applique aux micro-organismes et aux virus génétiquement modifiés. Cette réglementation définit 4 niveaux de confinement (identifiés de 1 à 4, le confinement étant d'autant plus contraignant que le chiffre est plus élevé). La manipulation de virus pathogènes exige un confinement minimal de 2, très souvent de 3, voire 4. Les dispositions du règlement 2020/1043 ouvrent la porte à un confinement zéro avant même d'avoir apporté la preuve de la sécurité sanitaire et environnementale des virus génétiquement modifiés en question.

VI. Références

1. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines
<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

2. Mutsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen RT., Linder T., Spyr C., Steffen R. (2004). Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.* 350, 896-903
3. Cowling B.J., Fang, V.J., Nishiura H., Chan K.-H., Ng S., Ip D.K.M., Chiu S.S., Leung G.M., Peiris J.S.M. (2012). Increased risk of noninfluenza respiratory virus infections associated with receipt of inactivated influenza vaccine. *Clin. Infect. Diseases.* 54, 1778-1783
4. Neidich S.D., Green W.D., Rebeles J., Karlsson E.A., Schultz-Cherry S., Noah T.L., Chakladar S., Hudgens M.G., Weir S.S., Beck M.A. (2017). Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. *Int. J. Obes.* 41, 1324-1330
5. Borges M.B., Marchevsky R.S., Carvalho Pereira R., da Silva Mendes Y., Almeida Mendes L.G., Diniz-Mendes L., Cruz M.A., Tahmaoui O., Baudart S., Freire M., Homma A., Schneider-Ohrum K., Vaughn D.W., Vanloubbeeck Y., Lorin C., Malice M.P., Caride E., Warter L. (2019). Detection of post-vaccination enhanced dengue virus infection in macaques: An improved model for early assessment of dengue vaccines. *PLoS Pathog.* 15, e1007721
6. Sridhar S., Luedtke A., Langevin E., Zhu M., Bonaparte M., Machabert T., Savarino S., Zambrano B., Moureau A., Khromava A., Moodie Z., Westling T., Mascareñas C., Frago C., Cortés M., Chansinghakul D., Noriega F., Bouckennooghe A., Chen J., Ng S.P., Gilbert P.B., Gurunathan S., DiazGranados C.A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N. Engl. J. Med.* 379, 327-340
7. Vélot C. (2009). OGM, tout s'explique. Ed Goutte de Sable. ISBN : 978-2-917904-01-5
8. Latham J. and Steinbrecher R. (2004). Horizontal gene transfer of viral inserts from GM plants to viruses. *EcoNexus (Technical Paper)*.
9. Lommel S.A. and Xiong Z. (1991). Reconstitution of a functional red clover necrotic mosaic virus by recombinational rescue of the cell-to-cell movement gene expressed in a transgenic plant. *J. Cell. Biochem.* 15A, 151.
10. Gal S., Pisan B., Hohn T., Grimsley N. and Hohn B. (1992). Aginfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology* 187, 525-33.
11. Wintermantel W.M. and Schoelz J.E. (1996). Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* 223, 156-64.
12. Green A.E. and Allison R.F. (1994). Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263, 1423.
13. Frischmuth T. and Stanley J. (1998). Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. *J Gen Virol* 79, 1265-71

14. Borja M., Rubio T., Scholthof H.B. and Lackson A.O. (1999). Restoration of wildtype virus by double recombination of tombusvirus mutants with a hosttransgene. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 153-162
15. Adair T. and Kearney C.M. (2000). Recombination between a 3-kilobas tobacco mosaic virus transgene and a homologous viral construct in the restoration of viral and nonviral genes. *Archives of Virology* DOI: 10.1007/s007050070062
16. Varrelmann M., Palkovics L. and Maiss E. (2000). Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of *plum pox virus*. *Journal of Virology* 74, 7462-7469.
17. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) virus Investigation Team. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360 ,25
18. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivaller P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., López-Gatell H., Olivera H., López I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., Dotson P.D. Jr, Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I., Cox N.J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 325, 197-201
19. Douche-Aourik F., Berlier W., Féasson L., Bourlet T., Harrath R., Omar S., Grattard F., Denis C., Pozzetto B. (2003). Detection of enterovirus in human skeletal muscle from patients with chronic inflammatory muscle disease or fibromyalgia and healthy subjects. *J. Med. Virol.* 71, 540-547
20. Hamel R., Dejarnac O., Wichit S., Ekchariyawat P., Neyret A., Luplertlop N., Perera-Lecoin M., Surasombatpattana P., Talignani L., Thomas F., Cao-Lormeau V.M., Choumet V., Briant L., Desprès P., Amara A., Yssel H., Missé D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880-8896
21. Ozden S., Huerre M., Riviere J.P., Coffey L.L., Afonso P.V., Mouly V., de Monredon J., Roger J.C., El Amrani M., Yvin J.L., Jaffar M.C., Frenkiel M.P., Sourisseau M., Schwartz O., Butler-Browne G., Desprès P., Gessain A., Ceccaldi P.E. (2007). Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One.* 2, e57
22. Sourisseau M., Schilte C., Casartelli N., Trouillet C., Guivel-Benhassine F., Rudnicka D., Sol-Foulon N., Le Roux K., Prevost M.C., Fsihi H., Frenkiel M.P., Blanchet F., Afonso P.V., Ceccaldi P.E., Ozden S., Gessain A., Schuffenecker I., Verhasselt B., Zamborlini A., Saïb A., Rey F.A., Arenzana-S.F., Desprès P., Michault A., Albert M.L., Schwartz O. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 3, e89
23. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T.,

- Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302, 415-419
24. Nowrouzi A., Glimm H., von Kalle C., Schmidt M. (2011). Retroviral vectors: post entry events and genomic alterations. *Viruses*. 3, 429-455
25. Chandler R.J., Sands M.S., Venditti C.P. (2017). Recombinant Adeno-Associated Viral Integration and Genotoxicity: Insights from Animal Models. *Hum. Gene Ther.* 28, 314-322
26. Gil-Farina I., Schmidt M. (2016). Interaction of vectors and parental viruses with the host genome. *Curr. Opin. Virol.* 21, 35-40
27. Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M., Batshaw M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148-158
28. Goossens M., Pauwels K., Willemarck N., Breyer D. (2013). Environmental risk assessment of clinical trials involving modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 13, 413-420
29. Brehm M., Samaniego L.A., Bonneau R.H., DeLuca N.A., Tevethia S.S. (1999). Immunogenicity of herpes simplex virus type 1 mutants containing deletions in one or more alpha-genes: ICP4, ICP27, ICP22, and ICP0. *Virology*. 256, 258-269
30. Ramírez J.C., Gherardi M.M., Esteban M. (2000). Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J. Virol.* 74, 923-933
31. Liu Q., Muruve D.A. (2003). Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 10, 935-940
32. Liu Q., Zaiss A.K., Colarusso P., Patel K., Haljan G., Wickham T.J., Muruve D.A. (2003). The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 14, 627-643
33. Sauter S.L., Rahman A., Muralidhar G. (2005). Non-replicating viral vector-based AIDS vaccines: interplay between viral vectors and the immune system. *Curr HIV Res.* 3, 157-181
34. Pinschewer D.D. (2017). Virally vectored vaccine delivery: medical needs, mechanisms, advantages and challenges. *Swiss Med. Wkly.* 147, w14465
35. HAS-Stratégie vaccinale contre le covid-19.
https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-07/note_de_cadrage_strategie_vaccinale_contre_la_covid_19.pdf