

Virus de l'hépatite B et vaccination

Les vaccins contre le virus de l'hépatite B dérivés d'antigène HBs purifié du plasma ont fait la preuve de leur efficacité, mais leur production en masse pose des problèmes économiques et de disponibilité de la matière première. Deux types de vaccin ont été produits par génie génétique, dans la levure et dans les cellules de mammifère. Le vaccin de levure ne contient que la région S alors que le vaccin produit dans des cellules de hamster contient également la région pré-S2. Celle-ci est un immunogène puissant et augmente de plus l'immunogénicité de la région S associée. Les contrôles génétiques de la réponse immune aux polypeptides pré-S2 et S sont différents chez la souris. Ce nouveau type de vaccin pourrait donc permettre d'améliorer la réponse de sujets qui répondent mal à la région S seule, notamment les cirrhotiques et les immunodéprimés.

Françoise Degos
François Tron
Jean-Pierre Benhamou

ADRESSES

F. Degos : *Praticien hospitalier*. J.-P. Benhamou : *Professeur à l'université Paris VI, faculté Xavier Bichat*. Service d'hépatologie et unité de recherche de physiopathologie hépatique, Inserm U. 24, hôpital Beaujon, 100, boulevard du Général-Leclerc, 92110 Clichy, France. F. Tron : *Professeur*. Laboratoire d'immunologie, hôpital Charles-Nicolle, 76000 Rouen, France.

m/s n° 10 vol. 4, décembre 88

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est actuellement un problème de santé publique d'importance mondiale. En effet, dans les pays du Sud-Est asiatique et d'Afrique tropicale, la prévalence de l'infection liée au VHB est d'environ 10 % de la population et la mortalité due à une cirrhose du foie est importante. Par ailleurs, les études épidémiologiques puis les études de biologie moléculaire ont montré l'importance du VHB dans le développement des cancers primitifs du foie. A titre d'exemple, on estime que l'incidence du cancer primitif du foie en Chine est d'environ 500 000 à 1 000 000 nouveaux cas par an [1].

Dans les pays tempérés, l'infection par le VHB ne prend pas une telle importance et reste en principe limitée aux populations à risque que sont les personnels de santé, les sujets toxicomanes, les homosexuels à partenaires multiples et les malades immunodéprimés. On dispose, environ depuis 1980, de vaccins très effi-

caces contre l'infection par le VHB [2]. Ces vaccins sont préparés à partir de la particule de surface du VHB ou AgHBs et, quel que soit le produit employé, l'immunisation est obtenue chez environ 95 % de la population.

Une meilleure connaissance de la structure du VHB et le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis la mise au point de vaccins produits par génie génétique et potentiellement plus immunogènes que les vaccins de première génération.

Structure du VHB

Au cours de l'infection par le VHB, les particules virales sont présentes en grande quantité dans le sérum. Il peut s'agir soit de l'enveloppe virale (particules de surface), vide, soit de virions complets, les particules de surface restant en large excès. La particule de surface est constituée de sphères ou de filaments de 22 nanomètres (nm) de diamètre [3,

4]. Le virion complet est formé, outre l'enveloppe, d'une nucléocapside contenant une molécule circulaire d'ADN, une ADN polymérase et une protéine kinase uniquement détectée par son activité. L'enveloppe porte l'antigène de surface (AgHB_s) et la capside l'antigène nucléaire ou HBc (core) (figure 1). Lorsque les virions sont présents dans le sérum, c'est-à-dire lors de la phase de multiplication du VHB dans l'organisme, on y détecte généralement un antigène soluble, lié à la nucléocapside, l'antigène HBe, et l'ADN du VHB. On considère qu'à ce stade le malade est particulièrement contagieux. L'antigène HBs est constitué d'un déterminant antigénique « a » et de sous-déterminants, appelés d, y, w, r. Les sérotypes les plus fréquents sont adw, adr et ayw, et ont une répartition géographique particulière. En effet, on ne trouve pas le sous-déterminant y en Asie, ni le sous-déterminant r en Afrique.

La composition protéique et la séquence de la particule de surface ont été précisées par Gerlich en 1983. L'enveloppe est faite de trois protéines appelées respectivement la protéine majeure, la protéine moyenne et la grande protéine (figure 2, p. 631). La protéine majeure, constituée de 226 acides aminés, est codée par le gène S et existe sous deux formes, glycosylée (GP27) et non glycosylée (P24) [5]. La protéine moyenne, faite de 281 acides aminés, est codée par les régions pré-S2 et S. C'est une glycoprotéine présente sous deux formes, GP33 et GP36. Les 55 acides aminés codés par la région pré-S2 sont hydrophiles et contiennent un épitope prédominant situé à la surface de l'enveloppe. Cet épitope apparaît comme plus immunogène que les épitopes de la protéine majeure. La séquence codée par le gène pré-S2 contient un récepteur pour l'albumine humaine polymérisée. Les hépatocytes possèdent aussi un récepteur pour l'albumine humaine polymérisée, et il est possible que cette albumine polymérisée soit le médiateur de l'adhésion et de l'entrée du VHB dans les hépatocytes [6].

La grande protéine codée par les gènes pré-S1, pré-S2 et S est présente sous les deux formes, glycosylée (GP42) et non glycosylée (P39). La

longueur de cette protéine varie avec le sous-type du VHB en cause. Il est possible que l'antigène pré-S1 soit aussi impliqué dans la pénétration du VHB à l'intérieur de l'hépatocyte. Une meilleure connaissance de cette structure de la particule d'enveloppe du VHB a permis d'envisager et de mettre au point un vaccin recombinant utilisant au mieux les caractéristiques de chacune des structures clonées.

Les vaccins contre le VHB

Si on le compare aux autres vaccins antiviraux conventionnels, le vaccin contre le VHB est très particulier car il ne peut être obtenu de cultures de tissus. Le vaccin est préparé à partir du plasma de porteurs sains du VHB. Il est fait de particules d'antigène HBs de 22 nm (et non du virion complet), purifiées et additionnées d'alumine comme adjuvant. Les résultats de nombreux essais clini-

ques des vaccins dérivés du plasma sont maintenant disponibles avec un recul d'environ dix ans, démontrant à la fois l'efficacité et l'innocuité de ces vaccins qui induisent une immunisation chez 95 % des sujets sains ; en outre, l'immunogénicité du vaccin dérivé du plasma a été démontrée à la fois dans des populations à risque et chez les nouveau-nés [7]. Néanmoins, il devient nécessaire de développer d'autres méthodes de production de vaccin car les quantités de sérum humain nécessaires à la préparation de tels vaccins sont, par définition, limitées et la préparation à partir de dérivés sanguins, malgré toutes les garanties de purification, reste potentiellement non satisfaisante ; en outre, des tests d'innocuité sur chimpanzés, difficiles et coûteux, sont exigés pour chaque lot de vaccin commercialisé. De plus, le coût de préparation de tels vaccins ne pourra diminuer notablement et reste bien supérieur aux possibilités financières des pays d'endémie virale, pour les

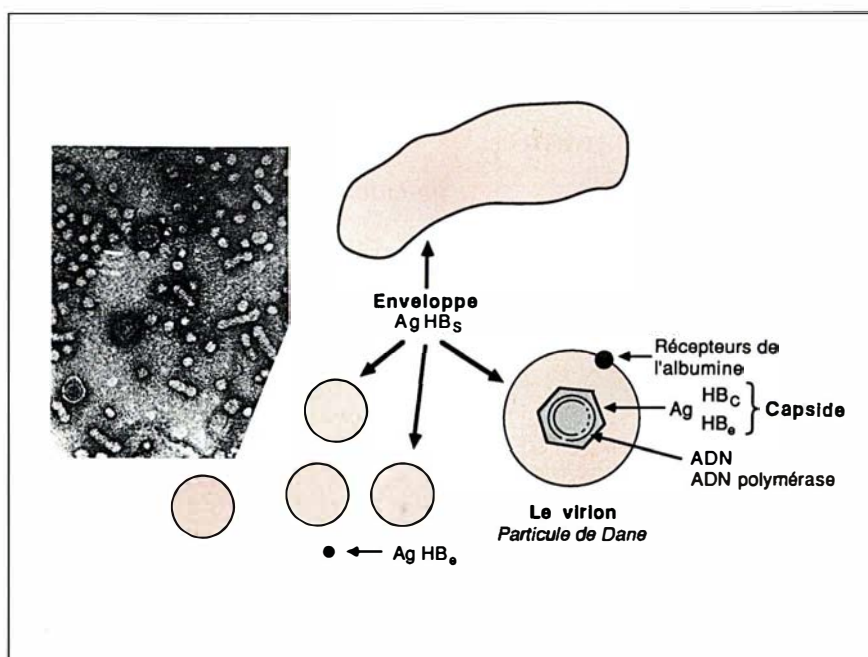


Figure 1. **Structure du virus de l'hépatite B.** Les particules du virus de l'hépatite B. **A gauche :** photo en microscopie électronique du sérum d'un porteur chronique du VHB en phase de multiplication virale ; nombreux filaments et particules sphériques de 22 nm ; un virion complet. **A droite :** représentation schématique de la particule virale. (Schéma communiqué par le Pr. Pierre Tiollais.)

m/s n° 10 vol. 4, décembre 88

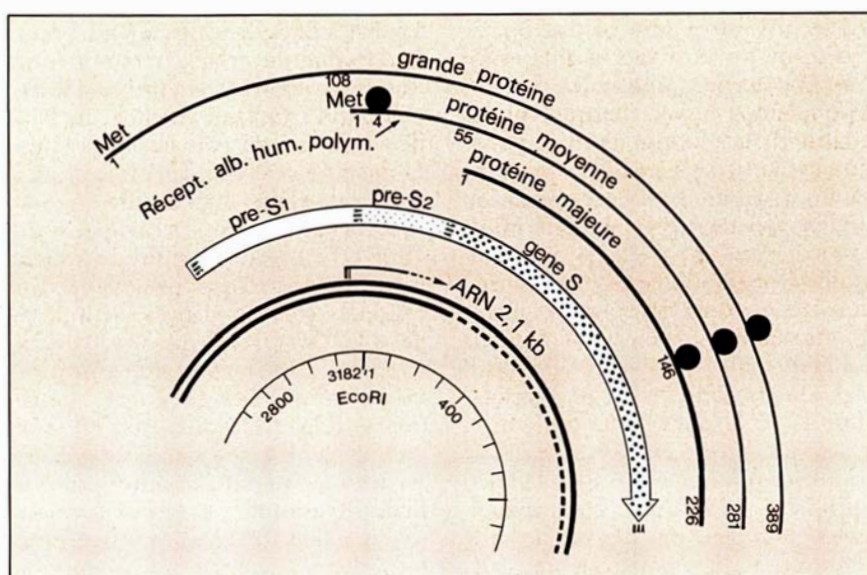


Figure 2. **Structure et organisation du génome du virus de l'hépatite B. La région S et pré-S ; les différentes protéines ainsi définies.** (Schéma communiqué par le Pr. Pierre Tiollais.)

quels la vaccination des enfants à la naissance est une nécessité.

Une large utilisation des vaccins de première génération a permis l'élaboration de stratégies de vaccination qui sont maintenant admises par tous. Celles-ci doivent tenir compte de l'épidémiologie du virus, réservant la vaccination aux groupes à risque dans les pays tempérés, faiblement contaminés, et entreprenant une vaccination de masse des nouveau-nés dans les pays de forte endémie.

En effet, lorsqu'une mère est porteuse du VHB au moment de la naissance, elle a plus de 90 % de risques de contaminer son enfant si elle est elle-même en phase de multiplication virale active (présence de l'AgHBe et de l'ADN VHB dans le sérum), les chances étant moindres lorsqu'il n'existe pas de multiplication virale (anticorps anti-HBe négatif) [8]. Or un enfant contaminé à la naissance deviendra porteur chronique du VHB dans plus de 90 % des cas. Chez les porteurs chroniques de VHB le risque relatif de carcinome hépatocellulaire est 217 fois supérieur à celui des sujets AgHBs négatif [1].

Les groupes à risque sont bien individualisés en Europe et dans les pays tempérés (Tableau I, p. 633) : la pré-

valence du portage chronique du VHB en France est de 0,5 %. Ce chiffre est de 1,5 % dans le personnel hospitalier, 5 % dans les groupes de prostituées, d'homosexuels, 10 % dans les prisons et chez les toxicomanes et d'environ 10 % dans les institutions pour enfants retardés mentaux. Parmi les patients hospitalisés, les groupes à risque sont constitués des patients traités dans les services d'hématologie (5 %) (leucose aiguë, maladie de Hodgkin, hémophiles). Chez ces malades la contamination se fait par l'administration de produits sanguins. Avant la vaccination, les patients traités par hémodialyse et transplantation rénale étaient fortement contaminés (15 à 50 %), en partie du fait de leur immunodépression et en partie du fait des transfusions qui leur sont administrées. Les patients atteints de cirrhose alcoolique ont une prévalence anormalement élevée d'infection par le VHB (2,8 %) dont la cause n'est pas évidente.

Les vaccins dérivés du plasma, dits de première génération, sont commercialisés depuis une dizaine d'années. Deux vaccins ont été largement utilisés : l'un, HEVAC B, contenant 5 µg d'AgHBs purifié, est préparé à

partir de plasma de porteurs sains de l'AgHBs, riche en anticorps anti-HBe. L'administration du vaccin se fait par injection intramusculaire d'une dose de 5 µg chaque mois, pendant trois mois, suivie d'un rappel au bout d'un an. L'autre vaccin, HEPTAVAX, contenant 20 µg d'AgHBs, est préparé à partir de plasmas riches en AgHBs. Le protocole d'administration est différent puisqu'il comporte des injections sous-cutanées ou intramusculaires aux premier, deuxième et sixième mois. Les résultats de nombreuses études cliniques faites avec ces deux vaccins ont donné des résultats similaires en ce qui concerne le pouvoir immunogène et la protection conférée par ces vaccins, qui déterminent la production d'anticorps anti-HBs dans environ 95 % des cas chez les sujets sains [7]. Cette immunisation est pourtant modulée, en fonction du sexe (les femmes étant meilleures répondeuses que les hommes) et de l'âge des patients (la plupart des études cliniques ayant porté sur des groupes de sujets jeunes, âgés de moins de 40 ans). L'administration du rappel à un an est primordiale pour conférer une immunisation durable et la détermination du titre des anticorps anti-HBs un mois après l'administration de la dose de rappel permet, puisque l'on connaît la décroissance linéaire du titre des anticorps en fonction du temps, de préciser la durée de la protection qui est en moyenne de cinq ans [9].

Les études cliniques portant sur les groupes de patients mauvais répondeurs au vaccin ont porté principalement sur les patients traités par hémodialyse chronique. En effet, ces patients, contaminés en France à près de 50 % par le VHB, constituent un énorme réservoir de virus pour eux-mêmes, leur entourage familial et le personnel hospitalier qui les a suivis ; par ailleurs, le portage chronique du VHB augmente la morbidité et la mortalité de ces patients. La vaccination selon un schéma conventionnel de trois injections à un mois d'intervalle donnait des résultats peu satisfaisants dans ce groupe de patients puisqu'on obtenait l'immunisation d'environ 40 % des malades [7]. Des protocoles d'immunisation renforcée ont donc été élaborés, et la répétition du nombre des

RÉFÉRENCES

1. Beasley RP, Hwang LY. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1984 : 209-24.
2. Crosnier J, Jungers P, Courouce AM, et al. Randomised placebo-controlled trial of hepatitis B surface antigen vaccine in french hemodialysis units: I, medical staff. *Lancet* 1981 ; 1 : 455-9.
3. Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. *Science* 1981 ; 213 : 406-11.
4. Tiollais P, Pourcel C, Michel ML. The hepatitis B virus. *Nature* 1985 ; 317 : 789-95.
5. Tiollais P, Michel ML. Un vaccin recombinant contre l'hépatite B. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 249-51.
6. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, et al. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzees albumins. *Gastroenterology* 1984 ; 86 : 910-8.
7. Stevens CE, Taylor PE, Tong MJ, Toy PT, Vyas GN. Hepatitis B vaccine, an overview. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Orlando, Florida : Grune and Stratton, 1984 ; 275-91.
8. Stevens CE, Beasley RP, Lin CC, et al. Perinatal hepatitis B virus infection: use of hepatitis B immune globulin. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE, eds. *Viral Hepatitis*. Philadelphia : Franklin Institute Press, 1981 ; 527-35.
9. Courouce AM, Laplanche A, Benhamou E, Jungers P, Crosnier J, Degos F. Immunogénicité à long terme et efficacité clinique d'un vaccin contre l'hépatite B. Symposium sur la vaccination contre l'hépatite B. Données récentes et perspectives. Berne: EASL, 1984.
10. Benhamou E, Courouce AM, Jungers P, et al. Hepatitis B vaccine: randomized trial of immunogenicity in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1984 ; 21 : 143-7.
11. Rottembourg J, Barthelemy A, Tron F, Laleye B, Boulanger C, Legrain M. Vaccination contre l'hépatite des malades en insuffisance rénale chronique. Symposium sur la vaccination contre l'hépatite B. Données récentes et perspectives. Berne: EASL, 1984.
12. Crosnier J, Degos F, Jungers P. Dialysis associated hepatitis. In: Maher J, ed. *Replacement of Renal Function by Dialysis*. Boston, La Haye: Martinus Nijhoss, 1988 : 881-903.

injections ou l'administration de doses plus fortes de vaccin ont permis d'augmenter le nombre des patients répondeurs à la vaccination [10]. La qualité de la réponse, évaluée par le titre des anticorps anti-HBs produits (et donc la durée de la protection conférée) demeure cependant faible (environ un an); elle peut néanmoins être améliorée par la vaccination très précoce des patients insuffisants rénaux chroniques, candidats à l'hémodialyse. Le titre des anticorps anti-HBs produits dépend alors à la fois de l'âge des patients et de la gravité de l'insuffisance rénale appréciée par la clairance de la créatinine [11]. Cette attitude est actuellement adoptée par les services de néphrologie, et les malades sont vaccinés efficacement et durablement dès que l'on envisage un traitement par hémodialyse chronique. Certains pays ont appliqué depuis environ dix ans une politique de vaccination intensive dans les centres d'hémodialyse et de transplantation rénale, et le registre de l'*European Dialysis and Transplantation Association* a permis de mettre en évidence une réduction considérable du nombre des cas d'hépatite dans les pays qui participaient à cet effort [12]. De la même manière, l'étude de l'incidence du VHB au cours des 13 dernières années dans le centre de transplantation rénale de l'hôpital Necker, portant sur 495 patients, a montré, depuis la pratique de la vaccination, la réduction de 46 à 15 % du nombre des patients porteurs chroniques du VHB [13]. Les patients atteints de cirrhose alcoolique paraissaient pouvoir bénéficier de la vaccination contre le VHB. La vaccination de ce groupe de patients pouvait tenter de répondre à deux objectifs : (1) la prévalence des marqueurs du VHB est anormalement élevée dans ce groupe de patients ; (2) le VHB a un rôle possible dans le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC), particulièrement fréquent au cours de la cirrhose, et la prévention de l'infection par le VHB pourrait diminuer le risque de CHC. Une réponse très faible, voire nulle, au vaccin HEVAC B a été observée dans un groupe de patients atteints de cirrhose alcoolique, surtout chez ceux âgés de plus de 50 ans [14].

Dans les pays de forte endémie, il est primordial de protéger les nouveau-nés pour tenter d'éradiquer l'infection virale. On sait en effet que 94 % des enfants sont contaminés lorsque la mère est porteuse du VHB et positive pour HBe ; 91 % d'entre eux resteront porteurs chroniques du VHB [1]. Les études cliniques avaient montré une forte prévalence de l'AgHBs chez les femmes enceintes dans les pays d'endémie (11,8 % dont la moitié (5,5 %) avec multiplication virale, c'est-à-dire fortement contagieuse) [1]. L'immunisation obtenue par la vaccination des nouveau-nés est tout à fait satisfaisante, puisque l'administration de vaccin avec un schéma identique à celui utilisé pour les adultes déclenche la production d'anticorps anti-HBs chez 93 à 100 % des nouveau-nés [7]. En revanche, le vaccin n'est protecteur qu'après deux mois d'administration et les enfants risquent d'être contaminés pendant cette période. L'administration d'immunoglobulines spécifiques anti-HBs, susceptibles de conférer une protection immédiate et transitoire, permet, lorsqu'elle est associée à la vaccination, de conférer une immunité (passive, puis active) [8]. La décision d'une vaccination de masse a été prise à l'échelon d'une nation, à Taiwan, où les effets de la vaccination systématique des nouveau-nés de mères porteuses du VHB ont été évalués récemment [15]. Une immunoprophylaxie passive-active avec injection simultanée d'immunoglobulines spécifiques anti-HBs et de la première dose de vaccin a été administrée aux enfants nés de mères porteuses du VHB avec multiplication virale (positives pour l'AgHBe), tandis que les autres enfants, dont la mère n'avait pas de multiplication virale au moment de l'accouchement, ont reçu une vaccination simple. Cette étude a porté sur une population de plus de 50 000 mères dont 21 000 avaient des signes de multiplication virale ; 21 000 nouveau-nés ont donc bénéficié de l'immunoprophylaxie passive-active. Au total, 46 619 bébés ont été vaccinés. Une telle attitude a permis la prévention du portage chronique du VHB dans plus de 80 % de la population, étudiée par la méthode de comparaison historique avec une population de référence. Ces résultats font de la

vaccination des nouveau-nés la méthode de choix pour prévenir l'infection par le VHB dans les pays de forte endémie.

Principes des vaccins recombinants

Tous ces résultats obtenus avec des vaccins de première génération démontraient aussi le besoin de développer des produits non dérivés du sang. La synthèse d'oligopeptides portant les déterminants de l'AgHBs paraissait prometteuse, mais les produits ainsi obtenus étaient très faiblement immunogènes. C'est dans ce contexte qu'ont été développés les vaccins recombinants [16]. Le choix de la technique utilisée a reposé sur la connaissance de la structure et de l'immunogénicité des déterminants antigéniques présents à la surface de l'enveloppe, l'AgHBs mais aussi les épitopes codés par la région pré-S. La conformation antigénique de l'AgHBs et son immunogénicité sont hautement dépendantes de sa structure tertiaire, et l'AgHBs n'est pas assemblé en particules dans les bactéries. Ces raisons sont à la base du choix d'une cellule eucaryote, comme la levure ou la cellule de mammifère, capable d'une synthèse satisfaisante de particules natives d'AgHBs.

Les vaccins recombinants les plus développés actuellement sont le vaccin produit à partir de la levure et le vaccin produit à partir de cellules de mammifère.

L'utilisation d'un vecteur contenant le gène S sous le contrôle d'un promoteur (celui des gènes de l'alcool déshydrogénase de la levure ou d'une phosphatase acide) a permis d'obtenir la synthèse de particules d'AgHBs à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces particules contiennent la protéine majeure uniquement sous forme non glycosylée ; elles ont une densité identique à celle du sérum humain mais sont de taille variable. Elles sont immunogènes pour le chimpanzé [17].

L'autre possibilité est d'obtenir la production des particules de 22 nm par des cellules de mammifère [18]. Ces particules sont glycosylées et sécrétées par le surnageant des cultures de cellule.

Elles sont obtenues par la méthode

Tableau I
PRÉVALENCES DU VIRUS DE L'HÉPATITE B DANS LES PAYS D'EUROPE ET DANS LES POPULATIONS A RISQUE EN FRANCE

	AgHBs (%)	Anti-HBs (%)
Europe		
Pays scandinaves, Grande-Bretagne	0,1	1
France, Allemagne (donneurs de sang)	0,3	5
Italie, Grèce (donneurs de sang)	4,7	40
France		
Personnel médical	1,5	20
Homosexuels masculins, prostituées	5	40
Toxicomanes	10	80
Enfants en centres de handicapés	10	80
Malades des services d'hématologie	5	
Hémodialysés et transplantés rénaux	15 à 50	30
Patients atteints de cirrhose alcoolique	2,8	23

de co-amplification avec le gène *DHFR* codant pour la dihydrofolate réductase. Ce gène confère la résistance à un antifolique, le méthotrexate ; il est considérablement amplifié lorsque des cellules sont soumises à des doses progressives de cette drogue. Des séquences situées à proximité du gène *DHFR* peuvent être passivement co-amplifiées avec lui. Des cellules dérivées d'ovaires de hamster chinois (cellules CHO) dépourvues d'activité endogène dihydrofolate réductase (*DHFR*⁻) ont été transfectées avec, d'une part, un plasmide contenant le gène *DHFR*, placé sous le contrôle du promoteur du virus MMTV (*mouse mammary tumor virus*), et, d'autre part, le gène S ainsi que la région pré-S sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40. Le traitement de ces cellules par le méthotrexate tue les cellules non transfectées par le plasmide (car elles sont *DHFR*⁻) et entraîne la co-amplification des gènes *DHFR* et des gènes S et pré-S. Les cellules sièges de la plus forte amplification sont aussi les plus résistantes au méthotrexate et celles qui expriment le plus activement le gène S + pré-S. La particule ainsi obtenue contient à la fois la protéine majeure, sous les deux formes glycosylée et non glycosylée, et la protéine moyenne glycosylée, dans une proportion comparable à celle du virus. Les particules, de taille homogène,

contiennent à la fois les déterminants HBs et l'activité des récepteurs pour l'albumine humaine polymérisée, due à la traduction d'un produit de la région pré S2 [19].

Sur le plan immunologique, l'étude de la réponse antigénique chez la souris induite par des particules contenant les déterminants du gène S2 de l'AgHBs, comparée à celle de particules dépourvues des déterminants du gène S2 [20] a montré (a) que la région pré-S2 est significativement plus immunogène que la région S et induit la formation d'une quantité supérieure d'anticorps *in vivo* ; (b) que la partie la plus antigénique de la région pré-S2 est constituée des 26 acides aminés de la partie NH₂ terminale du polypeptide de 33 kDa (kilodalton) ; (c) que la réponse immunitaire de la région pré-S2 est contrôlée par des gènes liés au système d'histocompatibilité H2 de classe II de la souris, différents de ceux qui régulent la réponse au gène S ; et (d) qu'il est possible d'induire l'immunisation d'une lignée considérée comme non répondeuse au VHB par l'administration de particules contenant à la fois les régions S et pré-S2. Par ailleurs, la région pré-S2 contient des épitopes reconnus par des anticorps neutralisants et des épitopes qui stimuleraient des lymphocytes auxiliaires (*helper*), augmentant ainsi la production d'anticorps anti-HBs. En un certain

sens, la région pré-S2 se comporte donc à la fois comme un antigène puissant et comme une « protéine porteuse », augmentant l'immunogénicité de la région S qui joue alors le rôle d'haptène.

Ces résultats ont eu des conséquences importantes pour le développement des vaccins, montrant l'importance de la région pré-S2 dans la production d'anticorps protecteurs. La régulation indépendante de la réponse immunitaire aux déterminants S et pré-S2, suggère qu'il est possible de diminuer le pourcentage de sujets non répondeurs à la région S seule. Ces données, associées à l'apparition d'anticorps dirigés contre les récepteurs de l'albumine humaine polymérisée chez les malades qui éliminent totalement le virus, sont de forts arguments théoriques pour penser que les particules d'AgHBs produites par les cellules CHO constituent un vaccin particulièrement intéressant. L'importance clinique des anticorps anti-pré-S2 reste mal élucidée, mais il semble que leur apparition soit le premier signe de guérison au cours d'une hépatite aiguë, après la disparition des signes de multiplication virale. Leur rôle dans la réponse immunitaire à l'infection par le VHB et dans le déclenchement de la neutralisation et de l'élimination du VHB serait donc majeur [21].

L'utilisation de cellules de mammifère comme système de production du vaccin a posé de nombreuses questions de fond. La souche CHO est une lignée cellulaire immortalisée qui, injectée à des animaux non immunodéprimés, est capable d'induire la formation de nodules et quelquefois de tumeurs. Il fallait alors considérer deux objections : (1) la possibilité théorique que l'ADN résiduel du produit final contienne et transmette l'information génétique des caractéristiques anormales de la cellule ; (2) la production, au cours de l'immunisation, d'anticorps dus aux protéines étrangères contaminantes, non éliminées par les procédés de purification. Les critères d'acceptabilité de substrats cellulaires ont fait l'objet de vastes discussions, et l'innocuité des vaccins produits à partir de lignées cellulaires a dû être démontrée. En effet, l'élimination de l'ADN et de protéines étrangères a été mesurée à

Tableau II
LES DIFFÉRENTS VACCINS ACTUELLEMENT DISPONIBLES

1. Vaccins dérivés du plasma

- a : particules d'AgHBs (plasma riche en anti-HBe) : HEVAC B (Pasteur Vaccins)
- b : particules d'AgHBs (plasma riche en AgHBe) : HEPTAVAX (Merck Sharp and Dohme)

2. Vaccins produits par génie génétique

- a : recombinant levure, AgHBs : ENGERIX (SKF Ritt)
- b : recombinant levure, AgHBs : RECOMBIVAX HB, HB VAX II (Merck Sharp and Dohme)
- c : recombinant cellules de mammifères, AgHBs enrichi en Ag pré-S2 : GENHEVAC (Pasteur Vaccins)

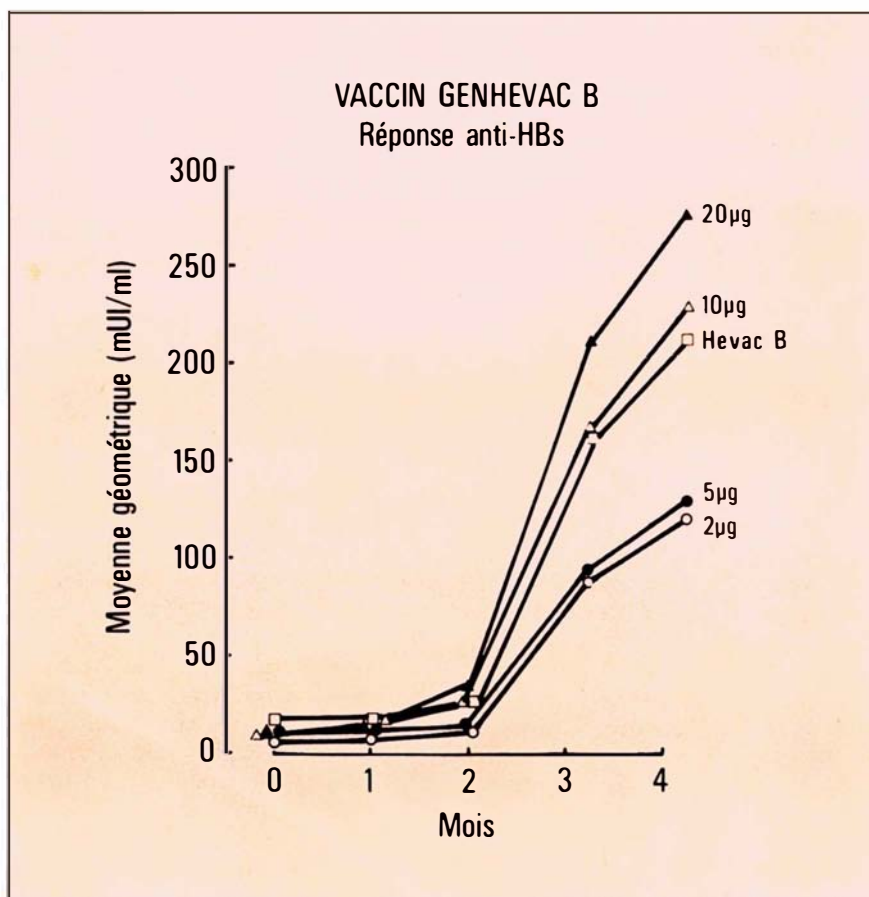


Figure 3. La production d'anticorps anti-HBs après vaccination par des doses croissantes de vaccin recombinant enrichi en pré-S2, GENHEVAC. Comparaison avec les résultats obtenus après vaccination conventionnelle par le vaccin dérivé du plasma HEVAC B.

chaque étape de la fabrication. La quantité d'ADN du produit final est inférieure à 0,05 pg par μg d'AgHBs, et peut être estimée à 10^{-5} pg. L'antigène est purifié à plus de 99 %. L'efficacité du vaccin a fait l'objet de tests sur quatre chimpanzés ; ceux-ci ont reçu trois injections de 20 μg de vaccin recombinant, et tous ont développé une forte réponse anti-HBs et anti-pré-S2[18]. Une injection de particules virales a ensuite été faite avec les sous-types ayw et adw du VHB. Cette injection n'a pas provoqué d'infection par le VHB chez les chimpanzés vaccinés, alors que les animaux non vaccinés étaient tous infectés.

Essais cliniques des vaccins recombinants

L'expérience clinique concernant les vaccins recombinants porte surtout sur les deux types de vaccins actuellement disponibles : le vaccin dérivé de la levure et le vaccin produit par les cellules de mammifère et enrichi en Ag pré-S2 (Tableau II, p. 634).

Les premiers essais cliniques du vaccin produit à partir de la levure (ENGRIX) débutés en 1984 portent sur un grand nombre de sujets (> 7 000), choisis dans des pays différents, adultes sains ou populations à risque : nouveau-nés de mères porteuses de l'AgHBs, homosexuels masculins, toxicomanes, patients traités par hémodialyse chronique ; les protocoles de vaccination comportent soit un schéma d'injections aux premier, deuxième et sixième mois, soit le schéma généralement utilisé en France (injections aux premier, deuxième et troisième mois et rappel au bout d'un an). L'immunisation est obtenue dans 93 à 100 % des cas au septième mois chez les sujets non immunodéprimés et dans 75 % des cas chez les hémodialysés [22]. Un autre vaccin recombinant, produit par la levure, est en cours d'étude (RECOMBIVAX) et les premières études cliniques en démontrent l'immunogénicité sur un groupe de 145 volontaires sains [23].

L'essai du vaccin recombinant enrichi en Ag pré-S2 (GENHEVAC) a été conduit sous forme d'un essai en double aveugle testant l'efficacité du vaccin recombinant à différents dosages (2, 5, 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) com-

paré au vaccin dérivé du plasma HEVAC B [24]. Les injections sont faites par voie intramusculaire dans la région deltoïdienne aux premier, deuxième et troisième mois. Un rappel est effectué au 12^e mois. Cet essai a porté sur 497 volontaires sains ; les critères de jugement de l'immunogénicité du vaccin ont été la production des anticorps anti-HBs (dosage radio-immunologique) et la production des anticorps anti-pré-S2. La moyenne géométrique du titre des anticorps anti-HBs est plus élevée dans le groupe de sujets ayant reçu les fortes doses (10 et 20 μg) que dans le groupe ayant reçu les doses faibles (figure 3, p. 634). Les doses faibles se sont révélées elles-mêmes moins immunogènes que le vaccin dérivé du plasma. La production d'anticorps anti-pré-

S2 est plus élevée dans les groupes de patients vaccinés par le vaccin recombinant que par le vaccin dérivé du plasma, quelle que soit la dose de vaccin administrée (figure 4). Les analyses de covariance ont permis de montrer une meilleure réponse chez les femmes, et la production d'anticorps anti-pré-S2 chez les femmes a toujours été significativement plus élevée que celle des hommes, pour tous les dosages de vaccin recombinant sauf les fortes doses de 20 μg pour lesquelles cette différence n'a pas été notée. La comparaison de la production des anticorps anti-HBs et anti-pré-S2 a montré la production plus précoce des anticorps anti-pré-S2. Il existe une corrélation significative ($r : 0,77$, $p < 0,001$) entre la production des deux anticorps, obte-

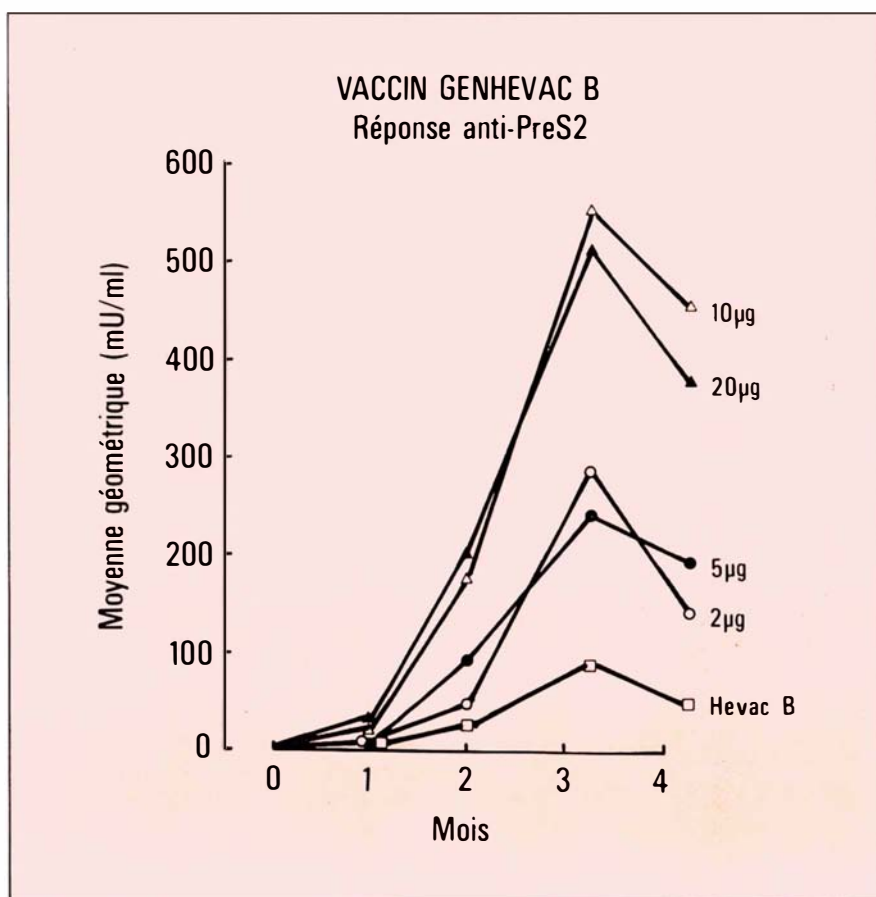


Figure 4. La production d'anticorps anti-pré-S2 après vaccination par des doses croissantes de vaccin recombinant enrichi en pré-S2, GENHEVAC. Comparaison avec les résultats obtenus après vaccination avec le vaccin dérivé du plasma HEVAC B.

RÉFÉRENCES

13. Degos F, Debure A, Kreis H. Hepatitis in renal transplant recipients. In: Morris PJ, Tilney NL, eds. *Transplantation Review*. Orlando, Florida: Grune and Stratton, 1987; 159-75.
14. Degos F, Duhamel G, Brechot C, et al. Hepatitis B vaccination in chronic alcoholics. *J Hepatol* 1986; 2: 402-9.
15. Chen DS, Hsu-Mei N, Sung JL. The hepatitis steering committee, the hepatitis control committee. A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA* 1987; 257: 2597-2603.
16. Gerety RJ. Recombinant hepatitis B vaccines. In: Zuckerman A, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc, 1988; 1017-24.
17. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall B. Synthesis and assembly of hepatitis B surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298: 347-50.
18. Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, Malpica Y, Streek R, Tiollais P. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7708-12.
19. Adamowicz P, Tron F, Vinas R, et al. Hepatitis B vaccine containing the S and pre-S2 antigens produced in chinese hamster ovary cells. In: Zuckerman A, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc, 1988; 1087-90.
20. Milich DR, Thornton GB, Neurath AR. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science* 1985; 228: 1195-9.
21. Alberti A, Cavaletto D, Pontisso P, Chermello L, Tagariello G, Belussi F. Antibody response to pre-S2 and hepatitis virus induced liver damage. *Lancet* 1988; 1: 1421-4.
22. André F, Safary A. Clinical experience with a yeast derived hepatitis B vaccine. In: Zuckerman A, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc, 1988; 1025-30.
23. Coates RA, Halliday ML, Rankin JG, et al. Immunogenicity and safety of a yeast derived recombinant DNA hepatitis B vaccine in health care workers. In: Zuckerman A, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R Liss Inc, 1988; 1038-46.
24. Tron F, Degos F, Brechot C. Randomised dose range study of a recombinant vaccine produced in mammalian cells and containing the S and pre-S sequences. (*Soumis pour publication*.)

nus un et deux mois après la troisième injection. Cette protection précoce est potentiellement très importante pour la vaccination des sujets soumis immédiatement au risque d'une infection (infirmières, nouveau-nés). Des essais cliniques sont en cours, dont le but est de démontrer la supériorité de ce vaccin recombinant dans des populations de sujets mauvais répondeurs au vaccin de première génération, c'est-à-dire les sujets sains non répondeurs, les sujets atteints de cirrhose alcoolique, et les immunodéprimés tels les hémodialysés.

Conclusion

La bonne connaissance de la structure du VHB a permis assez rapidement, depuis sa découverte par Blumberg en 1968, la mise au point de deux générations successives de vaccins. Les premiers furent les vaccins dérivés du plasma dont l'efficacité et l'innocuité ont été largement prouvées durant les dix dernières années. L'utilisation de ces vaccins parmi les groupes à haut risque d'infection par le VHB a permis d'obtenir une diminution très importante de l'incidence de l'infection par le VHB. Pourtant la fabrication de vaccin à partir de dérivés du plasma porte en elle ses propres limites, et les méthodes de génie génétique ont été utilisées pour y remédier. Ces méthodes pouvaient être considérées comme une nouvelle voie de fabrication, d'intérêt surtout commercial. L'innovation apportée par la mise au point sur les cellules de mammifère de vaccin comportant à la fois les déterminants HBs et pré-S2 est particulièrement attractive conceptuellement, puisqu'il semble que les mécanismes induisant la réponse immunologique et la production de ces deux anticorps soient différents. L'avantage de ce vaccin pourrait être particulièrement significatif dans les populations de mauvais répondeurs à la vaccination traditionnelle (5 % des sujets sains, malades atteints de cirrhose alcoolique) et surtout chez les immunodéprimés, malades dont on connaît bien la sensibilité aux infections par le VHB et l'évolution défavorable de ces infections ■

Summary

Hepatitis B infection being a worldwide public health problem, the importance of prevention of viral infection is now obvious. Plasma-derived vaccines have been developed for ten years, whose safety and immunogenicity have been demonstrated both in high risk populations and newborn infants. However alternative methods for vaccine production are needed and DNA recombinant vaccines were prepared either from mammalian cells or from yeast. The definition of the three regions of the HBs particle, of their antigenic determinants and of the role of the pre-S2 region in mediation of the attachment of HBV to hepatocytes led to the development of a recombinant DNA pre-S2 encoded vaccine. Clinical trials of recombinant vaccines were recently available, demonstrating their immunological efficacy in normal subjects. Due to the role of the pre-S2 region in the clearance of HBV infection the addition of the pre-S2 region to the S region in the mammalian recombinant vaccine may be of great theoretical interest.

TIRÉS A PART

F. Degos.