

11

Vaccins contre les virus des hépatites A et B

Des vaccins ont été développés vis-à-vis des deux virus hépatotropes pour lesquels il a été possible de définir des antigènes protecteurs et de les fabriquer sur le plan industriel. Le virus de l'hépatite A peut être cultivé *in vitro* et le virus entier représente l'entité vaccinale. Quant au virus de l'hépatite B, son antigène de surface contient les épitopes capables d'évoquer une réponse protectrice et il peut être obtenu par recombinaison génétique. Le vaccin anti-VHB est également efficace vis-à-vis du virus de l'hépatite D, de manière directe, puisque ce virus emprunte l'antigène de surface du VHB, et indirecte, puisque qu'une co-infection ou une sur-infection par le virus défectif exige la présence du VHB.

Vaccins contre le VHA

Il existe diverses souches de virus de l'hépatite A mais un seul sérotype, ce qui a facilité la mise au point d'un vaccin protégeant contre toutes les souches.

Le développement d'un vaccin a débuté dès que l'agent responsable de l'hépatite A a été identifié (Hilleman, 1993). Au départ, le VHA ne pouvant se multiplier en culture cellulaire, l'antigène a été préparé à partir du foie de marmousets infectés (Provost et Hilleman, 1978). La mise au point d'une technique de culture cellulaire du virus (Provost et Hilleman, 1979) a permis le développement de différents vaccins anti-VHA. Après la mise sur le marché du vaccin Havrix™ par les laboratoires SmithKline Beecham début 1992 (André et coll., 1992), un certain nombre de vaccins entiers inactivés (Epaxal Berna, Vaqta, Avaxim) ont été introduits par d'autres fabricants dans divers pays. Un vaccin vivant atténué a également été largement diffusé en Chine (Mao et coll., 1991). Différentes études cliniques ont montré que les vaccins atténués étaient bien tolérés et de haute immunogénicité lorsqu'ils sont utilisés suivant les protocoles établis. Bien que peu d'études comparatives aient été menées, il semble que les différences d'immunogénicité entre ces vaccins, si elles existent, ont un impact clinique non significatif. Deux essais contrôlés ont mis en évidence leur efficacité prophylactique (Werzberger et

coll., 1992 ; Innis et coll., 1994). Le vaccin anti-VHA a également été utilisé pour interrompre un début d'épidémie (Prikazsky et coll., 1994 ; Averhoff et coll., 1996 ; Mac Mahon et coll., 1996).

Le vaccin actuellement disponible en France, et distribué dans une cinquantaine de pays, est de souche HM 175 du VHA (Havrix™). Il est préparé suivant une méthode très voisine de celle utilisée pour l'obtention du vaccin contre la poliomyélite, et les particules inactivées sont administrées après absorption sur un support d'hydroxyde d'aluminium. Avant sa mise sur le marché, ce vaccin a été testé sur 6 500 volontaires adultes et 20 000 enfants. Les premiers schémas vaccinaux ont utilisé deux injections de 720 unités internationales à un mois d'intervalle chez l'adulte, avec un rappel à 6 mois. L'immunogénicité était très bonne, avec une séroconversion proche de 100 % après la deuxième dose. Le rappel à 6 mois entraînait un taux d'anticorps multiplié par 10, atteignant environ de 5 000 à 6 500 unités ELISA (Just et Berger, 1992 ; Horng et coll., 1993) : cette immunité pourrait durer au moins 10 ans. Des essais d'efficacité ont été effectués dans plusieurs pays. Le plus vaste s'est déroulé en Thaïlande, et a été réalisé chez 8 900 enfants en 1989 et en 1990 (Innis et coll., 1994). Il a également été montré au cours de ces études que le niveau de la réponse immunitaire déclenchée par le vaccin n'est pas affectée par son séjour une semaine à 37°C (André, 1995). L'efficacité vaccinale obtenue était supérieure à 90 %. Des schémas accélérés ont été utilisés avec un espacement de 15 jours entre les deux premières injections, avec une réponse immune aussi bonne. Une dose double administrée en primo-vaccination au voyageur procure une réponse en anticorps excellente et la même réponse au moment du rappel 6 mois plus tard. Cette double dose (1 440 unités), d'abord réservée aux voyageurs, est devenue la dose du vaccin adulte utilisé actuellement. Chez l'enfant, le schéma vaccinal est resté à l'injection de deux doses de 360 unités à un mois d'intervalle. Une formulation à 720 unités en une seule administration a été proposée, mais n'a pas reçu l'agrément. Ce vaccin contre le VHA est bien toléré, et les incidents se bornent à quelques douleurs locales au point d'injection (André et coll., 1992).

Le vaccin adulte à 720 unités a été mis sur le marché en France en 1992 et remplacé en 1994 par une formulation à 1 440 unités administrée en une seule injection, avec un rappel à 6 mois. La formulation pour l'enfant (360 unités) a quant à elle été commercialisée en 1994, et l'équivalent pour l'enfant du nouveau vaccin adulte est en préparation.

Vaccins contre le VHB

Les premiers vaccins anti-VHB ont été disponibles dès 1981, à la suite des travaux de Maupas et coll. (1976, 1978, 1981a et b). Il s'agit de vaccins constitués de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBs) purifié à

partir du plasma de porteurs sains. Une deuxième génération de vaccins a été mise au point par recombinaison génétique, en insérant le gène du VHB codant pour la protéine d'enveloppe virale dans des cellules de levure ou des cellules ovariennes de hamster (CHO). Bénéficiant d'une meilleure standardisation et d'une capacité de production illimitée, ces vaccins ont permis un développement des programmes de vaccination universelle. En France, quatre vaccins sont disponibles : le vaccin « Genhevac B » (PMSV), à 20 mcg, qui est produit dans les cellules CHO et contient l'antigène S et l'antigène pré-S2 ; le vaccin « Engérix B » (SmithKline Beecham), qui existe pour l'adulte (20 mcg) et pour l'enfant jusqu'à 15 ans (10 mcg) ; les vaccins « Recombivax-HB » et « HBvax DNA » (Merck), à 5 et 10 mcg, qui sont produits par culture de levure et contiennent l'antigène de surface S.

En contraste avec les études qui indiquaient une augmentation de l'immunogénicité par association de plusieurs antigènes présents à la surface du VHB, les vaccins actuellement commercialisés montrent la même efficacité qu'ils contiennent uniquement l'antigène S ou une association de cet antigène et de la région Pré-S2. Après la troisième injection, 90 à 95 % des sujets développent une réponse protectrice, c'est-à-dire que leur sérum présente un titre d'anticorps neutralisants au moins égal à 10 unités internationales par ml. L'efficacité du vaccin décroît avec l'âge, cette diminution étant déjà notable vers 40 ans, et le vaccin est également peu actif chez les sujets immunodéprimés, en particulier chez les hémodialysés. Une attention spéciale doit également être apportée aux individus alcooliques chroniques qui ont besoin d'une couverture vaccinale et répondent mal au vaccin. Il existe enfin des individus non-répondeurs, appartenant généralement aux groupes HLA DR3⁺ ou DR7⁺. Il a été suggéré que cette non-réponse serait due à des défaillances au niveau des cellules T auxiliaires et non à un défaut de la présentation antigénique (Salazar et coll., 1995 ; Vingerhoets et coll., 1994 ; Desombere et coll., 1995), mais il n'existe actuellement aucun argument univoque étayant cette hypothèse et permettant de proposer des palliatifs à la non-réponse de ces sujets.

De nombreuses études portant sur des millions de sujets ont documenté l'innocuité du vaccin anti-VHB : les réactions les plus couramment observées sont des réactions cutanées mineures au point d'injection ou des douleurs musculaires et articulaires transitoires. Dans un essai réalisé en Alaska (Mc Mahon et coll., 1992) et incluant 43 618 individus ayant reçu un total de 101 360 doses de vaccin plasmatisé, seuls 39 sujets ont rapporté des réactions secondaires, parmi lesquelles des myalgies/arthralgies, des éruptions cutanées ou des sensations de vertige. Les auteurs concluent que la plupart de ces réactions ne sont que coïncidence, et que la vaccination apparaît sûre.

Toutefois, différents auteurs ont évoqué dans des études de cas la possibilité d'effets secondaires plus ou moins sérieux de la vaccination contre le VHB : dysfonctionnement hépatique transitoire, production d'anticorps anti-ADN, glomérulonéphrite aiguë, encéphalomyélite, purpura, thrombocytopenie,

arthrite (Lilic et Ghosh, 1994 ; Macario et coll., 1995 ; Herroelen et coll., 1991 ; Poullin et Gabriel, 1994 ; Gross et coll., 1995 ; Germanaud et coll., 1995). Cependant, la responsabilité de la vaccination anti-VHB ne peut souvent pas être clairement établie. Ainsi, des composants non spécifiques entrant dans la production, la composition ou l'administration du vaccin peuvent être incriminés (Lear et English, 1995 ; Banisadr et coll., 1996 ; Meyboom et coll., 1995). Certains auteurs ont également envisagé la possibilité que le vaccin puisse induire des manifestations extra-hépatiques semblables à celles décrites lors de l'infection virale de type « syndrome de la maladie du sérum » et qui sont attribuées à la formation de complexes immuns. Des cas très rares (environ cinq en onze ans) susceptibles d'être pris en considération ont été relevés dans la littérature, mais aucune conclusion n'a pu être apportée et la coïncidence semblait la solution logique dans la plupart des cas (Carmeli et De-Medina, 1993).

Récemment, une attention particulière s'est portée sur d'éventuelles complications neurologiques : ainsi, 106 atteintes démyélinisantes centrales (69 poussées de sclérose en plaque, 27 manifestations ophthalmiques et 10 myélites) ont été notifiées entre janvier 1989 et décembre 1995, pour environ 17,5 millions de sujets vaccinés en France. Compte tenu du sexe et de l'âge des sujets vaccinés, les fréquences de scléroses en plaque observées ne sont pas supérieures à celles attendues dans la population générale (incidence annuelle de 2 000 à 3 000 cas). Ces événements doivent être analysés en tenant compte du fait que la campagne de vaccination anti-VHB constitue une première en matière de primo-immunisation de masse chez l'adulte et que les complications observées se développent spontanément dans cette même population. Ainsi, il existe une association temporelle mais non d'imputabilité entre les cas de sclérose en plaque ou de lésions démyélinisantes et la vaccination anti-VHB. La réalisation d'études cas-témoins devrait permettre de renforcer la vaccino-vigilance.

Par mesure de prudence, la survenue de ces manifestations neurologiques a conduit la Direction générale de la Santé et l'Agence du Médicament à renouveler la recommandation faite en 1995 aux praticiens de peser les facteurs de risque de contamination par le VHB avant de vacciner des sujets ayant des antécédents personnels de sclérose en plaque.

Vers un vaccin contre le VHE

Seules quelques études ont évalué l'efficacité des immunoglobulines dans la prévention ou le contrôle des épidémies d'hépatite E. Cette séroprévention ne s'est pas montrée efficace, même avec des immunoglobulines préparées dans des pays endémiques comme l'Inde (Khuroo et Dar, 1992) où 10 à 40 % des sujets seraient anti-VEH positifs. Des immunoglobulines spécifiques anti-VEH devraient être plus efficaces, comme cela a été montré expérimentale-

ment chez le singe (Tsarev et coll., 1994). Cependant, une telle stratégie à peu de chance d'être retenue du fait du développement et de la commercialisation très probable d'un vaccin contre l'hépatite E dans les années à venir.

Plusieurs protéines recombinantes « ORF (*Open reading frame*) 2 » sont actuellement testées comme candidat vaccin. Les premiers résultats conduisent à penser qu'un vaccin efficace sera réalisé à partir de pseudo-capsides recombinantes qui induisent de forts titres d'anticorps protecteurs. Les études réalisées chez le singe montrent que la vaccination protège contre la maladie mais n'empêchent pas, lors d'une infection expérimentale ultérieure, un certain niveau de réplication du virus qui est retrouvé dans le foie ou dans les selles de certains animaux vaccinés (Tsarev et coll., 1994 ; Purdy et coll., 1993 ; Fuerst et coll., 1996 ; Tsarev et coll., 1996 ; Durpagal et coll., 1996).

En France, un vaccin contre l'hépatite E trouvera son application dans la prévention des voyageurs et des groupes de population très exposés, tels que les personnels des organisations non gouvernementales, les coopérants et les militaires en opération dans des zones d'endémie et travaillant dans des conditions d'hygiène souvent favorables à la transmission de la maladie. Pour protéger de telles populations, le développement d'un vaccin combiné contre l'hépatite A et l'hépatite E serait le bienvenu.

Vaccins combinés bivalents ou polyvalents

Pour faciliter la mise en œuvre éventuelle d'une vaccination universelle anti-VHA, un vaccin bivalent associant hépatite A et B a été développé. Ce vaccin contient l'antigène de surface du VHB obtenu par recombinaison génétique et l'antigène VHA adsorbé sur hydroxyde d'aluminium. La dose pour les enfants est la moitié de la dose adulte le vaccin est administré suivant le protocole d'injection 0, 1 et 6 mois. La réponse immunitaire aux deux antigènes est comparable à celle obtenue quand on injecte les deux vaccins séparément ou mélangés juste avant l'injection. Les anticorps ont également une durée de vie comparable. Ce vaccin combiné devrait être mis prochainement sur le marché.

Par ailleurs, l'adhésion à la vaccination pourrait encore être améliorée par le développement d'un vaccin polyvalent contenant en plus les vaccins antidiphthérique, antitétanique, anticoquelucheux acellulaire, antipoliomyélitique inactivé et anti-*Haemophilus influenzae* b. Ce vaccin permettrait de protéger contre les sept infections en seulement trois injections. Des consultations se déroulent actuellement au niveau européen pour définir un cadre de réglementation qui permette une mise en commun des avancées technologiques dans le domaine des vaccins combinés (Florence Fuchs, communication personnelle)

Amélioration des vaccins anti-VHB pour les non ou faibles répondeurs

Dans les conditions actuelles de leur utilisation, les vaccins anti-VHB commercialisés sont efficaces chez 90 à 95 % des sujets. Les individus chez qui ces vaccins se révèlent inefficaces sont les personnes âgées et les personnes souffrant d'une immunodéficience (défaillance rénale chronique, séropositifs au VIH, alcooliques...). Il a également été observé que certains sujets, indépendamment de leur âge ou de leur statut sanitaire, ne sont pas capables de développer une réponse anticorps protectrice vis-à-vis de l'antigène HBs : il s'agit de personnes HLA DR3⁺ ou DR7⁺.

Différentes équipes s'attaquent actuellement au problème majeur de rendre le vaccin immunogène chez les non-répondeurs. L'objectif principal est d'obtenir des titres en anticorps neutralisants supérieurs à 10 IU/ml et ce sur de longues durées. De nouveaux vaccins en cours de développement semblent pouvoir contourner le problème de non ou faible réponse. Un vaccin anti-HBV expérimental (TGP-943, Takeda), contenant les antigènes de surface pré-S2 et S et produit dans la levure, induit des titres en anticorps protecteurs après deux administrations (2 fois 20 µg, aux mois 0 et 1) chez 80 à 91 % des sujets qui n'avaient pas été protégés auparavant avec un vaccin conventionnel (Suzuki et coll., 1994). De la même manière, le vaccin expérimental Hepa-Gene-3 (Exogene Biotech GmbH), contenant pré-S1, pré-S2 et S, a été testé selon le protocole « trois fois 20 µg aux mois 0, 1 et 6, et si nécessaire 11 » chez 21 sujets souffrant d'insuffisance rénale et non-répondeurs au vaccin commercial. Au bout d'un an, 70 % des participants avaient des titres protecteurs (Haubitz et coll., 1996). Cependant, ces essais aux résultats très encourageants n'ont pas été effectués en double aveugle, et nécessitent donc d'être prolongés par des études rigoureuses afin de connaître l'efficacité de ces vaccins de façon indubitable. Le vaccin Hepa-Gene est dans une phase très avancée de son développement clinique et pourrait bientôt être commercialisé au Royaume-Uni par Médéva. Un vaccin du même type que celui décrit par Haubitz et coll. est également en cours de développement en Israël chez *Biotechnology General Ltd.* (Shouval et coll., 1994 ; Raz et coll., 1996).

D'autres approches sont également conduites par différents groupes :

- Vaccins à base d'ADN plasmidique ;
- Vecteurs vivants tels que les salmonelles (Schödel et coll., 1994), le virus de la vaccine (Sugimoto et Yamanouchi, 1994) et le virus de la polio (Yim et coll., 1996) ;
- Vaccins dérivés de mimotopes générés grâce aux banques combinatoires rassemblées dans des bactériophages recombinants (Meola et coll., 1995). Cette approche permettrait d'induire des réponses protectrices chez des souris non-répondeuses.

Parmi ces différentes approches, le vaccin à base d'ADN semble plus réaliste en termes de développement industriel.

Vaccins « ADN » contre le VHB

Les vaccins anti-hépatite actuels sont des vaccins conventionnels, les antigènes vaccinaux étant soit des micro-organismes entiers, soit des sous-unités protéiques obtenues par recombinaison génétique mais copiant fidèlement les structures de surface naturelles du virus. Il est apparu récemment que le matériel génétique codant pour ces structures protéiques pouvait être utilisé comme vaccin et que cette approche était extrêmement prometteuse.

L'injection directe d'ADN nu et l'expression du gène correspondant, décrite pour la première fois en 1990 (Wolff et coll., 1990), a depuis été démontrée pour une grande variété de gènes, de tissus et d'espèces (Acsadi et coll., 1991 ; Hansen et coll., 1991 ; Kitsis et coll., 1991 ; Ulmer et coll., 1993). Plus récemment, il a été possible d'induire une réponse immunitaire contre un antigène directement après introduction du gène correspondant dans le muscle de l'hôte (Ulmer et coll., 1993). Cette approche d'immunisation par injection directe d'ADN (en l'occurrence après injection intramusculaire) a permis de montrer que l'on pouvait obtenir des réponses humorales et/ou cellulaires capables de conférer une immunité protectrice (Wolff et coll., 1990 ; Davis et coll., 1993 ; Cox et coll., 1993). Les « antigènes-type ADN » sont exprimés dans leur conformation native et peuvent induire à la fois une réponse immunitaire de type classe-I et classe-II (Ulmer et coll., 1993).

La vaccination génétique - où l'ADN est utilisé non seulement comme gène codant pour l'antigène à exprimer, mais aussi en tant que vecteur pour le transfert physique de l'information génétique - offre la possibilité de provoquer une réponse immunitaire plus conséquente que la vaccination traditionnelle et permettrait la conception et la réalisation de nouveaux vaccins beaucoup plus facilement que par le passé. La simplicité et la rapidité de cette technique d'immunisation par injection d'ADN autorisent par ailleurs de tester des séquences codant pour différents antigènes et les réponses immunitaires qui leur sont associées, dans un contexte de synthèse de ces antigènes (*in situ*) probablement favorable à l'obtention de conformations natives. Néanmoins, pour réellement considérer l'utilisation de l'ADN comme molécule vaccinante chez l'homme, un certain nombre de risques potentiels doivent être évalués.

Les vaccins à base d'ADN contiennent le gène ou les gènes codant pour une portion antigénique d'un pathogène, telles les protéines de core ou d'enveloppe d'un virus. Les deux voies d'injection les plus couramment utilisées sont la voie intramusculaire et la voie intradermique. Dans ce dernier cas, l'ADN porté par des billes d'or est envoyé dans le derme par un système de propulsion à air comprimé appelé « *gene gun* ». Les cellules de l'hôte, après capture de l'ADN étranger, expriment le gène viral et produisent la protéine correspondante dans la cellule.

Les deux avantages majeurs des vaccins à base d'ADN sont :

- l'expression à long terme de l'antigène, ce qui pourrait permettre d'obtenir une réponse immunitaire plus soutenue et plus durable et permettre ainsi de supprimer les injections de rappel ;
- la néosynthèse de l'antigène *in vivo* et sa présentation sous forme de séquences peptidiques associées au molécules de classe I du CMH, permettant de susciter l'induction d'une réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8⁺ qui est ce que l'on attend d'un vaccin dirigé contre un virus ou un parasite.

Utilisation préventive

Un vaccin prototype à base d'ADN « nu », c'est-à-dire sans protéine ni vecteur lipidique associé, a été développé récemment contre l'hépatite B (Davis et coll., 1993). Les auteurs ont montré qu'il était possible d'obtenir chez la souris un haut niveau d'anticorps contre l'antigène de surface HBs après injection d'un plasmide d'expression dans le tissu musculaire. Ce modèle animal de vaccin génétique, qui reproduit l'effet du vaccin VHB recombinant ou plasmatique, a servi de point de départ pour les développements ultérieurs de cette approche.

L'injection intramusculaire de vecteurs d'expression plasmidiques codant pour l'une ou l'autre des trois protéines d'enveloppe du VHB induit chez la souris des réponses humorales spécifiques des différents déterminants antigéniques de l'enveloppe virale. Les anticorps sont détectables dans le sérum des souris dès une à deux semaines après l'injection d'ADN, et sont d'isotype IgM. La commutation classique des IgM en IgG est observée dans les semaines suivantes et signe une activité T auxiliaire associée. Les taux maximum d'IgG sont atteints en 4 à 8 semaines et sont maintenus pendant au moins 6 mois sans autre injection d'ADN. Les anticorps anti-enveloppe obtenus sont spécifiques des déterminants de groupe et de sous-type de l'antigène HBs. Les taux d'anticorps obtenus sont 50 à 100 fois supérieurs au seuil de protection, établi à 10 mUI/ml. L'injection de vecteurs codant pour les protéines majeures et moyennes d'enveloppe induit des anticorps spécifiques des antigènes HBs et pré-S2. Les anticorps anti-pré-S2, spécifiques de la protéine moyenne et dont on sait qu'ils sont protecteurs à eux seuls, sont obtenus de manière très précoce et à des taux élevés. D'une manière générale, les différents vecteurs d'expression utilisés induisent une réponse humorale tout à fait comparable à celle qui est observée chez l'homme au cours de l'infection virale. De plus, la nature, la spécificité et le taux des anticorps obtenus permettraient, s'ils étaient obtenus chez l'homme, d'espérer une protection précoce contre une infection par un virus de sous-type homologue ou hétérologue (Michel et coll., 1995). Bien que les résultats les plus frappants aient été obtenus avec l'introduction de l'ADN dans du muscle en cours de régénération chez la souris, il a également été possible d'induire des réponses immunes importantes chez le lapin à l'aide d'un pistolet d'injection sans aiguille, le Biojector[®]

(Portland, OR). Le taux moyen d'anticorps anti-HBs (>1 000 mUI/ml) obtenus chez le lapin après injection dans le muscle normal sans régénération permet donc d'envisager une application de cette technologie chez l'homme (Davis et coll., 1994).

Les problèmes majeurs non résolus par le mode de vaccination actuel (nombre d'injections nécessaires et durée de l'immunité acquise, nombre élevé de mauvais ou de non-répondeurs) ont été abordés dans ce modèle de vaccin génétique contre l'hépatite B, d'autant qu'ils ont également une incidence financière importante sur l'introduction de ce vaccin dans le programme élargi de vaccination recommandé par les organisations de santé.

Avec un vaccin traditionnel, la première injection de l'antigène est normalement suivie d'une chute rapide du taux d'anticorps produits. L'existence de cellules B mémoire permet à l'organisme de développer rapidement une réponse immune, après une injection de rappel ou à l'encontre du pathogène. A la lumière de la présentation prolongée de l'antigène par le vaccin génétique, il était important de savoir si le système immunitaire était compromis, c'est-à-dire incapable de répondre à une restimulation par l'antigène en question. En l'absence de la possibilité de faire de véritables épreuves avec le VHB, la réponse de la souris à une injection subséquente d'antigène HBs ou d'ADN codant pour la même protéine a été étudiée. L'injection intramusculaire de vecteurs d'expression plasmidiques codant pour les trois protéines d'enveloppe permet d'obtenir une réponse humorale forte, qui reste stable pendant au moins 74 semaines sans nécessiter d'injection rappel. Un rappel est néanmoins possible et a été réalisé 7 mois après la première injection, avec de l'ADN ou avec de l'AgHBs recombinant. Le rappel effectué avec l'ADN permet d'augmenter les titres anticorps d'environ 10 à 100 fois selon les vecteurs, alors que l'injection de protéine est moins efficace (Davis et coll., 1996b).

Pour savoir si l'immunisation génétique pourrait contourner certaines formes de non-réponse à la vaccination classique, les ADN codant pour les trois protéines d'enveloppe du VHB ont été injectés dans les muscles de souches de souris congéniques B10 (H-2b), B10.S (H-2s) et B10.M (H-2f) afin d'évaluer le niveau d'anticorps dirigés contre la protéine majeure d'enveloppe (S) obtenu dans chaque souche. Lors de l'immunisation avec les particules portant l'antigène de surface du VHB dans les lignées B10.S et B10.M, des épitopes T-auxiliaires contenus dans les régions pré-S2 et pré-S1 des protéines d'enveloppe moyennes et grandes respectivement, sont nécessaires pour obtenir une réponse contre la protéine S. Il a été montré que dans ces souches de souris, une seule injection d'ADN codant pour la protéine S seule permet de contourner la non-réponse et dispense de l'adjonction des épitopes T auxiliaires nécessaires lors de l'immunisation avec un vaccin protéique (Davis et coll., 1995b). Ce résultat a une importance toute particulière étant donné que la non-réponse à la vaccination chez l'homme est un problème qui pourrait être lié à un défaut du découpage des antigènes dans un contexte HLA

particulier. La vaccination génétique pourrait donc représenter non pas simplement un autre moyen de protéger des populations, mais une façon différente et plus efficace de stimuler le système immunitaire. Son potentiel à induire une réponse immune importante et durable après une seule injection ferait d'elle un instrument de santé publique important.

Un deuxième avantage majeur des vaccins ADN réside dans leur capacité à induire une réponse cytotoxiques via les lymphocytes CD8⁺. Cette réponse a été étudiée en utilisant d'une part des souches de souris "bonnes répondeuses" (Davis et coll., 1995a) et d'autre part une souche de souris chez laquelle jusqu'à présent, même avec des vecteurs viraux tels que le virus de la vaccine, on n'avait pas pu obtenir de réponse cytotoxique (Schirmbeck et coll., 1995). La réponse cytotoxique induite par l'injection de vecteurs ADN codant pour les protéines d'enveloppe du VHB est détectable chez la souris dès 6 jours après l'injection et reste stable pendant au moins 6 mois. Elle est médiée par des lymphocytes T CD8⁺ et ciblée sur un épitope T bien conservé de l'enveloppe chez les souris répondeuses, et sur un épitope différent mais non encore défini dans les souches dites non-répondeuses. L'intensité de cette réponse est dépendante de la dose d'ADN injecté et la fréquence des cellules spécifiques induites est particulièrement importante. L'injection d'ADN apparaît donc comme un moyen très efficace d'induction de réponse cytotoxiques et son utilisation pourrait être plus sûre que celle de vaccins viraux vivants, spécialement chez les patients immunocompromis. Au vu de l'efficacité particulière de ce mode d'administration de l'antigène, la vaccination génétique pourrait non seulement avoir une application préventive mais également s'avérer utile en thérapeutique dans des situations d'infections chroniques où il est nécessaire d'induire ou de rappeler une réponse cytotoxique préexistante mais inefficace.

Utilisation thérapeutique

Dans un modèle de souris transgéniques pour l'expression des protéines d'enveloppe du VHB, qui miment par certains aspects les porteurs chroniques du virus, il a été possible d'induire par une seule injection d'ADN vaccin l'élimination de l'antigène HBs circulant et l'induction d'anticorps anti-HBs à des taux comparables à ceux que l'on peut observer chez une souris normale (Mancini et coll., 1996). Cette élimination est persistante et s'accompagne d'un contrôle de l'expression des gènes viraux au niveau du foie. Ce sont des cellules T non cytolytiques, spécifiquement induites par l'immunisation génétique, qui sont responsables de ce contrôle par le biais des cytokines qu'elles produisent. L'immunisation à base d'ADN apparaît donc comme une approche thérapeutique potentielle chez les porteurs chroniques du VHB, puisque l'on sait que chez les patients infectés la guérison est généralement associée à l'installation d'une réponse T spécifique et persistante contre toute ou partie des protéines virales.

Essais cliniques

Le passage du modèle souris au modèle primate est une étape préalable indispensable avant la conduite d'essais chez l'homme. Le seul primate infectable par le VHB est le chimpanzé. Deux chimpanzés ont été immunisés par quatre injections d'ADN codant pour les protéines d'enveloppe du virus. Un des animaux ayant reçu 2 mg d'ADN par dose a développé une réponse anti-HBs potentiellement protectrice dès la deuxième injection. Cette réponse était persistante et a pu être rappelée par une injection de vaccin protéique effectuée un an plus tard. Aucune épreuve virulente n'a été effectuée mais les titres d'anticorps (14 000 mUI/ml) détectés chez cet animal étaient compatibles avec l'existence d'une protection contre le virus (Davis et coll., 1996a).

L'injection d'ADN comme vaccin chez l'homme reste soumise à des considérations de sécurité. Les principales interrogations concernent le devenir de l'ADN injecté et la possibilité de son intégration dans le chromosome des cellules de l'hôte. Si cela était le cas, une mutagenèse insertionnelle serait possible. Jusqu'à présent les vecteurs utilisés restent sous forme épisomale et aucune forme intégrée n'a pas pu être mise en évidence dans le génome cellulaire. D'autre part, les cellules musculaires sont post-mitotiques et cette absence de division favorise peu les intégrations.

Enfin, l'expression prolongée de l'antigène à partir de l'ADN injecté pourrait faire redouter une anergie du système immunitaire de l'hôte. Cela ne semble pas être le cas puisqu'un effet rappel est observé après une nouvelle injection d'ADN ou d'antigène protéique classique. De plus, il semble que pour certains antigènes exprimés à partir d'ADN injecté dans les fibres musculaires, on assiste à l'élimination de celles-ci par la réponse cytotoxique.

Dans tous les cas, la décision d'injecter de l'ADN comme vaccin à visée préventive ou comme médicament à visée thérapeutique restera un problème de rapport bénéfice/risque. Pour un vaccin destiné à être injecté chez des populations saines, le risque devra être minime, voire nul ; pour une approche thérapeutique destinée à traiter des patients souffrant d'infections chroniques dont l'issue peut être grave, un risque plus important pourrait être acceptable.

À l'heure actuelle, un essai de ce type (phase I) a été réalisé aux États-Unis chez des patients infectés par le VIH. Une réponse T cytotoxique spécifique de ce virus a été mise en évidence. Un essai multicentrique (phase II) est en cours de réalisation et permettra d'apprécier le bénéfice potentiel de l'immunité cellulaire induite après injection d'ADN chez les patients séropositifs.

BIBLIOGRAPHIE

Acsadi G, Jiao S, Jani A, Duke D, Williams P, Chong W, Wolff JA. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol* 1991, 3 : 71-81

Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS et coll. The changing epidemiology of hepatitis B in the United States. The need for alternative vaccination strategies. *JAMA* 1991, **263** : 1218-1222

André FE, D'Hondt E, Delem A, Safary A. Clinical assessment of the safety and efficacy of an inactivated hepatitis A vaccine : rationals and summary of findings. *Vaccine* 1992, **10** : S160-S168

André FE. Approaches to a vaccine against hepatitis A : development and manufacture of an inactivated vaccine. *J Infect Dis* 1995, **171** : S33-S39

Averhoff F, Shapiro C, Hyams L et coll. Use of inactivated vaccine to interrupt a communitywide hepatitis A outbreak. *IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, 21-25 April, 1996, Rome : Abstract SC 2

Banisadr F, Gueit I, Humbert G. Vasculitis related to hepatitis A vaccination. *Clin Infect Dis* 1996, **22** : 596

Carmeli Y, De-Medina T. Serious hepatitis B vaccine adverse reactions, are they immune-mediated ? *Vaccine* 1993, **11** : 1358-1359

Cox GJM, Zamb TJ, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 : immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* 1993, **67** : 5664-5667

Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molecular Genetics* 1993, **2** : 1847-1851

Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleaf M, Whalen RG. Direct gene transfer in skeletal muscle : plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994, **12** : 1503-1509

Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleaf M, Whalen R G, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum. Gene Ther* 1995a, **6** : 1447-1456

Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleaf M, Whalen RG. DNA-based immunization overcomes H-2 haplotype-restricted non-responsiveness to hepatitis B surface antigen in mice. *In* : *Vaccines 95 - Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases*, Cold Spring Harbor Laboratory, New-York 1995b, 111-116

Davis HL, Brazolot Millan CL, Mancini M, Mc Cluskie MJ, Hadchouel M et coll. DNA-based immunization of mice and non-human primates against hepatitis B virus. *Vaccine* 1996a, in press

Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen : longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 1996b, **14** : 910-915

Deinhardt F. Prevention of hepatitis A : past, present and future. *Vaccine* 1994, **10** : S10-S14

Desombere I, Hauser P, Rossau R, Paradijs J, Leroux-Roels G. Nonresponders to hepatitis B vaccine can present envelope particles to T lymphocytes. *J Immunol* 1995, **154** : 520-529

Durpagal H, Ozdener MH, Ansari IH et coll. Immune response and protection following naked DNA immunization of the structural region of HEV. IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease 1996, résumé N° A109

Fuerst TR, Yarbough P, Zhang Y et coll. Prevention of hepatitis E using a novel ORF-2 subunit vaccine. In : Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses. Buisson Y, Coursaget P, Kane M Eds. La Simare, Tours, 1996

Germanaud J, Causse X, Trinh DH, Pfau-Fandard B, Trépo C. A case of severe cytolysis after hepatitis B vaccination [Letter ; comment]. *Am J Med* 1995, **98** : 595-596

Gross K, Combe C, Kruger K, Schattenkirchner M. Arthritis after hepatitis B vaccination. Report of three cases. *Scand J Rheum* 1995, **24** : 50-52

Hansen E, Fernandes G, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK, Chang, K. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett* 1991, **290** : 73-76

Haubitz M, Ehlerding G, Beigel A, Heuer U, Hemmerling AE, Thoma HA. Clinical experience with a new recombinant hepatitis-B vaccine in previous non-responders with chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 1996, **45** : 180-182

Herroelen L, de Keyser J, Ebinger G. Central-nervous-system demyelination after immunisation with recombinant hepatitis B vaccine [see comments]. *Lancet* 1991, **338** : 1174-1175

Hilleman MR. Hepatitis and hepatitis A vaccine : a glimpse into history. *J Hepatol* 1993, **18** : S5-S10

Hong YC, Chang MM, Lee CY, Safary A, André F, Cheb DS. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 1993, **12** : 359-362

Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P et coll. Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* 1994, **271** : 1328-1234

Just M, Berger R. Reactogenicity and immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1992, **10** : S110-113

Khuroo MS, Dar MY. Hepatitis E : evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an indian source to prevent it. *Indian J Gastroenterol* 1992, **11** : 113-116

Kitsis RN, Buttrick PM, Mc Nally EM, Kaplan ML, Leinwand LA. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1991, **88** : 4138-4142

Lear JT, English JS. Anaphylaxis after hepatitis B vaccination [letter]. *Lancet* 1995, **345** : 1249

Lemon SM, Robertson BH. Taxonomic classification of hepatitis A virus. In : *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T Eds. Springer Verlag, Tokyo, 1994, 50-53

Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997, **336** : 196-204

Lilic D, Ghosh SK. Liver dysfunction and DNA antibodies after hepatitis B vaccination [letter]. *Lancet* 1994, **344** : 1292-1293

Macario F, Freitas L, Correia J, Campos M, Marques A. Nephrotic syndrome after recombinant hepatitis B vaccine [letter]. *Clin Nephrol* 1995, **43** : 349

Mao JS, Dong DX, Zhang SY, Zhang HY, Chen NL, Huang HY, Xie RY, Chai CA et coll. Further studies of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. In : *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H Eds. Williams & Wilkins, Baltimore 1991, 110-111

Major M, Vitvitski L, Beauverger P, Lecouturier V, Wild F, Trépo C, Inchauspé G. HBV chimeric vectors presenting HCV nucleocapsid sequence generate cellular immune responses against both viruses in DNA-based immunization. *IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases*, Rome, 1996

Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tiollais P, Michel ML. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** : 12496-12501

Maupas P, Goudeau P, Coursaget J, Drucker J, Bagros P. Immunization against hepatitis B in man. *Lancet* 1976, **1** : 1367-1370

Maupas P, Goudeau P, Coursaget J, Drucker J, Bagros P. Hepatitis B vaccine : efficacy in high-risk settings, a two year study. *Intervirology* 1978, **10** : 196-208

Maupas P, Chiron JP, Barin F, Coursaget P et coll. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention of early HBsAg carrier state in children. Controlled trial in an endemic area (Senegal). *Lancet* 1981a, **1** : 289-292

Maupas P, Coursaget P, Goudeau A, Barin F, Chiron JP, Raynaud B. Hepatitis B vaccine : rationale, principles and applications. In : « Hepatitis B vaccine », Maupas P and Guesry P. (Eds), Elsevier/North Holland, Biomedical Press, INSERM Symposium n°18, 1981b, 3-11

Mc Mahon BJ, Helminiak C, Wainwright RB, Bulkow L, Trimble BA, Wainwright K. Frequency of adverse reactions to hepatitis B vaccine in 43,618 persons [see comments]. *Am J Med* 1992, **92** : 254-256

Mc Mahon BJ, Williams J, Bulkow L, Tanttila M, Beller M. Control of an outbreak of hepatitis A in Alaska using an inactivated hepatitis A vaccine. *IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, 1996, Rome, Abstract SB I

Melnick JL. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 1992, **10** : S24-S26

Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F, Cortese R, Galfre G. Derivation of vaccines from mimotopes - Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* 1995, **154** : 2236-2243

Meyboom RH, Fucik H, Edwards IR. Thrombocytopenia reported in association with hepatitis B and A vaccines [letter ; comment]. *Lancet* 1995, **345** : 1638

Michel ML, Davis HL, Scheelf M, Mancini M, Tiollais P, Whalen RG. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice : aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92** : 5307-5311

Poullin P, Gabriel B. Thrombocytopenic purpura after recombinant hepatitis B vaccine [letter] [see comments]. *Lancet* 1994, **344** : 1293

Prikazsky V, Olear V, Cernoch A, Safary A, André FE. Interruption of an outbreak of hepatitis A in two villages by vaccination. *J Med Virol* 1994, **44** : 457-459

Provost PJ, Hilleman MR. An inactivated vaccine prepared from infected marmoset liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978, **159** : 201-203

Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979, **160** : 213-221

Purdy MA, Mc Caustland KA, Krawczynski K et coll. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* 1993, **41** : 90-94

Raz R, Dagan R, Gallil A, Brill G, Kassis I, Koren R. Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens in children. *Vaccine* 1996, **14** : 207-211

Salazar C, Deulofeut H, Granja C, Deulofeut R et coll. Normal HBsAg presentation and T-cell defect in the immune response of nonresponders. *Immunogenetics* 1995, **41** : 366-374

Schödel F, Kelly SM, Peterson D, Milich D, Hughes J, Tinge S, Wirtz R, Curtiss III R. Development of recombinant Salmonellae expressing hybrid hepatitis B virus core particles as candidate oral vaccines. *Recombinant vectors in vaccine development* 1994, **82** : 151-158

Schirmbeck R, Böhm W, Ando K, Chisari FV, Reimann J. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J Virol* 1995, **69** : 5929-5934

Shouval D, Ilan Y, Adler R, Deepen R, Panet A, Even-Chen Z, Gorecki M, Gerlich WH. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived

recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine* 1994, **12** : 1453-1459

Sugimoto M, Yamanouchi K. Characteristics of an attenuated vaccinia virus strain, LC16m0, and its recombinant virus vaccines. *Vaccine* 1994, **12** : 675-681

Suzuki H, Iino S, Shiraki K, Akahane Y, Okamoto H, Domoto K, Mishiro S. Safety and efficacy of a recombinant yeast-derived pre-S2 + S-containing hepatitis B vaccine (TGP-943) : phase 1, 2 and 3 clinical testing. *Vaccine* 1994, **12** : 1090-1096

Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU et coll. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91** : 10198-10202

Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU et coll. Prospects for prevention of hepatitis E. In : Enterically-Transmitted Hepatitis Viruses. Buisson Y, Coursaget P, Kane M Eds. La Simare, Tours, 1996

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR et coll. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993, **259** : 1745-1749

Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G et coll. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination : absence of Th1 cytokine production. *Immunol Lett* 1994, **39** : 163-169

Werzberger A, Mensch PS, Kuter R et coll. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Eng J Med* 1992, **327** : 453-457

Widera G. Gene gun-based nucleic acid vaccination. *Vector Systems in Gene Therapy*, May 6-7, 1996, Coronado, California

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Choong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990, **247** : 1465-1468

Wu GY, Wu CH. Hepatic cultures models and gene regulations. Atelier 52, INSERM, April 22-23, 1993

Yim TJ, Tang S, Andino R. Poliovirus recombinants expressing hepatitis B virus antigens elicited a humoral immune response in susceptible mice. *Virology* 1996, **218** : 61-70