

## Un vaccin recombinant contre l'hépatite B

L'importance mondiale de l'hépatite B, le développement des formes chroniques de cette affection et le rôle du virus de l'hépatite B (VHB) dans l'hépatocarcinome nécessitent de disposer d'un vaccin efficace et sûr.

L'absence de système de culture cellulaire capable de propager le virus à l'échelle industrielle a considérablement entravé le développement d'un vaccin et a conduit à produire dans un premier temps un vaccin à partir du sérum de porteurs chroniques du VHB. Krugman *et al.* [1, 2] furent les premiers à montrer qu'un extrait brut inactivé de sérum de porteurs chroniques était capable de protéger des enfants contre l'hépatite B. Plus tard Maupas *et al.* [3] reportèrent les premiers résultats positifs d'essais cliniques effectués en utilisant l'antigène de sur-

face du VHB (AgHBs) purifié à partir de sérum humain.

Actuellement plusieurs laboratoires ont développé des vaccins dérivés du sérum, composés de particules virales de 22 nm (nanomètres) défectives et portant l'AgHBs. La méthode de purification de l'AgHBs inclut des étapes d'inactivation pour éliminer d'éventuels virus résiduels. L'efficacité de ce vaccin a été démontrée à la fois dans des populations adultes saines et chez le nouveau-né, dans des programmes de vaccination de masse pour prévenir la transmission périnatale du VHB. La vaccination des hémodialysés est plus difficile à obtenir, probablement parce que ces malades sont immunodéprimés. Le recul est maintenant suffisant pour affirmer que le vaccin dérivé du sérum est un vaccin sûr.

Malgré l'efficacité et l'innocuité de ces vaccins, des méthodes alternatives de production apparaissent nécessaires. Les disponibilités en sérum humain, les difficultés de purification des particules virales et la nécessité de tests d'innocuité sur chimpanzés font que le vaccin sérique est un vaccin cher, ce qui en limite l'utilisation dans beaucoup de pays qui auraient besoin d'une vaccination de masse. Dans ce contexte, la biotechnologie de l'ADN recombinant prend toute sa valeur pour développer de nouveaux vaccins. Différentes approches peuvent être utilisées et le choix de la technique dépend de considérations sur la structure de l'enveloppe du VHB et sur l'immunogénicité des épitopes des protéines de l'enveloppe.

**L'enveloppe virale.** L'enveloppe du VHB contient des protéines des glucides et des lipides [4]. Les glucides sont liés de façon covalente aux protéines et les protéines sont ancrées dans une bicouche lipidique. Comme c'est la règle pour un virus, les séquences hydrophobes des protéines sont intramembranaires et les séquences hydrophiles contenant les glucides sont exposées à la surface de la membrane et portent les déterminants antigéniques.

L'enveloppe du virion contient trois protéines, chacune existant sous deux formes, en fonction de la glycosylation. La première est appelée « protéine majeure », elle est la plus petite et existe sous forme glycosylée (GP27) et non glycosylée (P24). La deuxième est appelée « protéine moyenne » et existe sous deux formes glycosylées, la GP33 qui contient seulement un glycan et la GP36 qui en contient deux. La troisième est appelée « grande protéine » et est

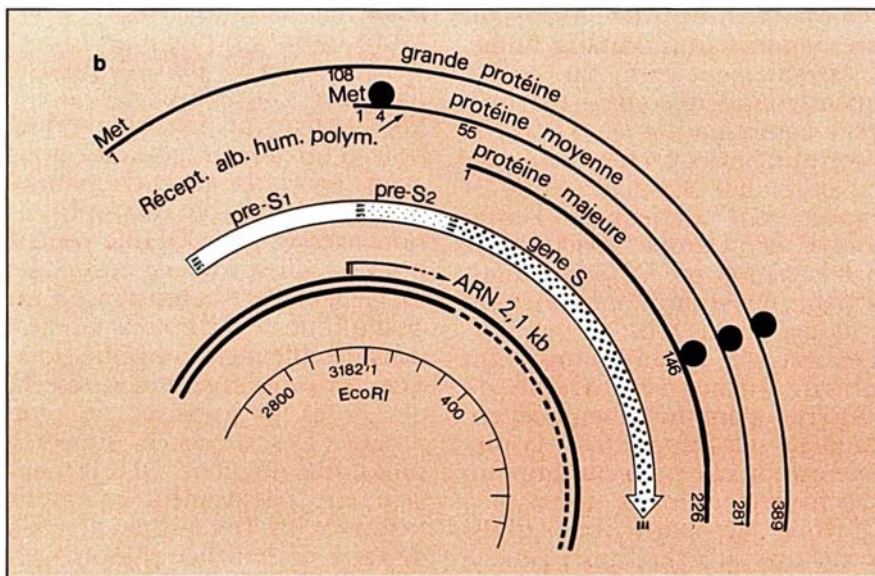


Figure 1. **Région pré-S/S du VHB.** La région pré-S/S contient trois AUG initiateurs (codon méthionine, indiqués par Met), ce qui définit les régions pré-S1 et pré-S2 et le gène S. La synthèse des trois protéines de l'enveloppe est initiée à partir de ces trois codons. Les points noirs indiquent des sites de glycosylation.

présente sous une forme glycosylée (GP42) et une forme non glycosylée (P39).

Ces trois protéines sont codées par la région pré-S/S qui contient trois codons « méthionine » initiateurs (figure 1, p. 249). La synthèse de la protéine majeure est initiée à partir du troisième codon initiateur et est codée par le gène S ; celle de la protéine moyenne est initiée à partir du deuxième codon initiateur et est codée par la région pré-S2 et le gène S ; celle de la grande protéine, enfin, est initiée à partir du premier codon et est codée par les régions pré-S1 et pré-S2 et le gène S. Les trois protéines ont par conséquent en commun une séquence de 226 acides aminés correspondant au produit de traduction du gène S. Comparée à la protéine majeure, la protéine moyenne a une séquence supplémentaire de 55 acides aminés à l'extrémité N-terminale. La séquence supplémentaire de la grande protéine est de 163 à 219 acides aminés, ceci en fonction du sous-type du virus.

La composition en protéines des particules AgHBs de 22 nm est différente de celle de l'enveloppe du virion et, de plus, cette composition dépend de la présence ou non d'une multiplication virale. En présence de multiplication virale, les particules AgHBs de 22 nm contiennent les protéines majeure et moyenne mais très peu de grande protéine. En l'absence de multiplication virale, les particules AgHBs de 22 nm contiennent essentiellement la protéine majeure et très peu (environ 1 %) de protéine moyenne. Les mécanismes de cette variation de composition entre le virion et les particules AgHBs ne sont pas, à l'heure actuelle, compris. Ils pourraient être dus à des différences de transcription des gènes viraux.

Le produit de traduction du gène S contient deux séquences hydrophiles, l'une d'entre elles portant un résidu glucidique à la position 146. On peut postuler que ces

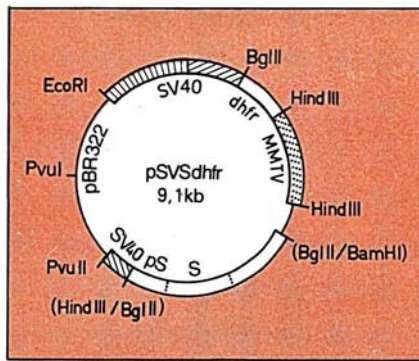


Figure 2. **Structure du plasmide recombinant.** Les séquences HBV et dhFR sont placées respectivement sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 et du promoteur du virus MMTV. Les séquences codantes de l'HBV sont constituées du gène S et de la région pré-S.

deux séquences contiennent les déterminants antigéniques de l'AgHBs. La pleine antigénicité et immunogénicité de l'AgHBs nécessitent l'assemblage de deux molécules de protéines grâce à des ponts disulfures. Des oligopeptides correspondant aux deux régions hydrophiles induisent une réponse immunitaire faible. L'AgHBs peut être par conséquent considéré comme un antigène conformationnel. La partie N-terminale des protéines moyenne et grande est hydrophile et exposée à l'extérieur de l'enveloppe. Un épitope majeur codé par la région pré-S2 est manifestement plus immunogène que les épitopes de l'AgHBs.

**Les vaccins recombinants.** La pleine immunogénicité de l'AgHBs étant fortement dépendante de sa conformation, la première approche pour produire un vaccin recombinant consiste à fabriquer des particules AgHBs ayant une structure aussi proche que possible des particules viraux natives. Contrairement à l'antigène de cœur, l'AgHBs n'est pas synthétisé en tant que particule dans *E.coli*, ceci probablement

parce que l'assemblage de l'enveloppe nécessite une bicouche lipidique qui n'est pas synthétisée dans les bactéries.

La production de particules AgHBs peut être obtenue soit dans des cellules animales [5, 6], soit dans la levure [7, 8] et ces deux systèmes peuvent être utilisés pour la fabrication d'un vaccin. Les particules AgHBs produites dans des cellules animales sont homogènes, ce qui n'est pas le cas dans la levure. De plus, dans les cellules animales les particules sont glycosylées et il est possible que la présence de résidus glucidiques influence la réponse immunitaire. En outre, dans les cellules animales, les particules AgHBs sont sécrétées dans le surnageant sans lyse cellulaire, ce qui facilite la récolte et la purification des particules.

Pour ces raisons, nous avons choisi le système de cellules animales pour synthétiser des particules AgHBs [6]. L'apparition d'anticorps dirigés contre le récepteur à l'albumine humaine polymérisée (pHSA) au cours de la guérison d'une hépatite B suggère que des anticorps dirigés contre la pHSA sont importants pour la clairance virale. Nous avons donc exprimé le gène S et la région pré-S2 qui code pour le récepteur à la pHSA.

Pour obtenir un taux de production d'HBsAg important, nous avons utilisé la méthode maintenant classique de co-amplification avec le gène DHFR codant pour la dihydrofolate réductase. Ce gène confère la résistance à un antifolique, le méthotrexate, et 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'ovaire de hamster chinois (cellules CHO), dépourvues d'activité endogène dihydrofolate réductase (DHFR-) ont été transfectées avec le plasmide décrit dans la figure 2, plasmide contenant le gène

DHFR placé sous le contrôle du promoteur du virus MMTV (*mouse mammary tumor virus*) précoce et le gène S+ la région pré-S sous le contrôle du promoteur 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 S+pré-S. Les cellules sièges de la plus forte amplification sont également les plus résistantes au méthotrexate et sont celles qui expriment le plus activement le gène S+pré-S.

Les particules AgHBs purifiées du surnageant cellulaire sont des particules de 22 nm de diamètre et de densité 1,21 g/cm<sup>3</sup>, identiques aux particules plasmiques (*figure 3*). Aucune forme en filament n'a été détectée. Ces particules contiennent les protéines majeure et moyenne sous leurs formes glycosylée et non glycosylée. La présence d'une activité

récepteur à l'albumine humaine polymérisée sur les particules AgHBs a pu être mise en évidence. L'immunogénicité de ces particules a été étudiée chez la souris et comparée avec celle des particules AgHBs d'origine humaine. Les efficacités des deux catégories de particules sont identiques. De plus, les particules recombinantes sont capables d'induire des anticorps contre le récepteur à l'albumine polymérisée. La possibilité de sécréter des particules AgHBs dans n'importe quelle cellule animale offre aussi l'opportunité de construire un vaccin vivant en utilisant un virus humain comme vecteur. Le virus de la vaccine [9] et l'adénovirus [10] ont été utilisés l'un et l'autre à de telles fins.

L'immunogénicité des particules produites dans la levure et dans les cellules animales est très bonne, comparable à celle des particules d'origine sérique. Les essais cliniques concluants effec-

tués avec ces particules démontrent clairement que le vaccin recombinant va maintenant remplacer le vaccin d'origine sérique.

Pierre Tiollais  
Marie-Laure Michel

## RÉFÉRENCES

1. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Hepatitis B virus: effect of the heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains. *J Infect Dis* 1970; 122: 432.
2. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain): studies on active immunization. *JAMA* 1971; 217: 41.
3. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P. Hepatitis B vaccine: efficacy in high-risk settings, a two-year study. *Lancet* 1976; i: 1367.
4. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-95.
5. Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, et al. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4549-53.
6. Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, et al. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7708-12.
7. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298: 347-50.
8. Miyanojara A, Tohe A, Nozaki C, et al. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1-5.
9. Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983; 302: 490-5.
10. Ballay A, Levrero M, Buendia MA, Tiollais P, Perricaudet M. In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J* 1985; 4: 3861-5.

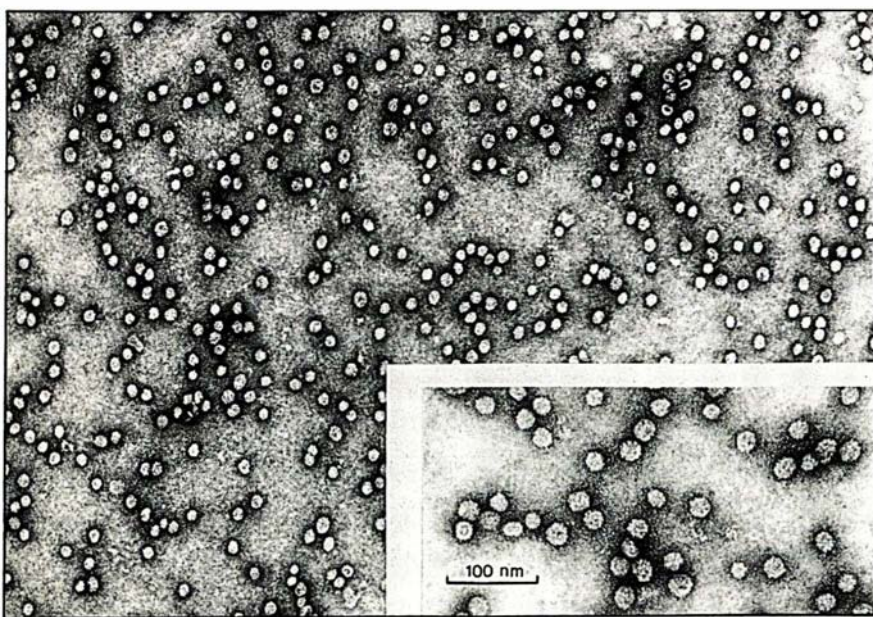


Figure 3. **Particules AgHBs synthétisées par des cellules animales (cellules CHO) transfectées par l'ADN VHB. Observation au microscope électronique (X 22 000 et X 33 000).**