

14

Perspectives pour un vaccin contre l'hépatite C

Le développement d'un vaccin contre le virus de l'hépatite C constitue un des enjeux majeurs de la prochaine décennie, car cet accomplissement représente un des défis actuels pour la recherche fondamentale et serait un outil plus que précieux pour la médecine préventive, et éventuellement pour la médecine curative. A l'heure actuelle, le développement d'un vaccin contre le virus de l'hépatite C se heurte à de nombreux obstacles : manque d'outils expérimentaux (systèmes de culture *in vitro*, modèles animaux) pour tester la validité des réponses immunes induites par les immunogènes candidats, le manque de données cliniques ou expérimentales permettant d'établir un lien entre un type particulier de réponse immunitaire et/ou l'implication de déterminants spécifiques dans le contrôle de l'infection et l'existence de nombreux variants viraux capables d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Néanmoins, il est probable qu'un certain nombre d'incertitudes seront levées dans un futur proche grâce aux efforts de recherche fournis par plusieurs équipes internationales pour faire avancer la connaissance des facteurs immunologiques nécessaires au développement d'un vaccin.

Différentes considérations doivent être prises en compte dans l'optique du développement de vaccins contre le VHC. La capacité de mutation de la région enveloppe est particulièrement élevée et donc susceptible de provoquer l'apparition de mutants « échappant » au mécanisme de neutralisation (Weiner et coll., 1991 ; Taniguchi et coll., 1993). L'antigénicité (et potentiellement l'immunogénicité) des protéines d'enveloppe E1 et E2 semble étroitement associée à leur conformation (Chien et coll., 1993). Les régions génomiques conservées présentant des taux de mutations faibles pourraient participer au développement d'une réponse de type cellulaire protectrice via l'action de cellules de type CTL (Koziel et coll., 1992 ; Kita et coll., 1993). Des lymphocytes cytotoxiques T (CTL) spécifiques d'antigènes conservés peuvent être induits contre plusieurs génotypes viraux différents et être capables d'induire une protection contre l'infection : cela a été démontré dans le cas du virus de l'hépatite B (protection partielle), le virus de la grippe et celui de la rage (Murray et coll., 1984 ; Iwarson et coll., 1985 ; Fu et coll., 1991 ; Ulmer et coll., 1993).

Deux approches vaccinales sont actuellement poursuivies : une approche conventionnelle basée sur la recherche d'antigènes protéiques capables d'induire une réponse protectrice suffisamment intense et prolongée, et une approche basée sur l'administration d'ADN. La mise en œuvre de ces deux stratégies de recherche vaccinale implique à la base une bonne connaissance de la biologie moléculaire du virus (pour revue, Cahour, 1995).

Le virus de l'hépatite C ne se multipliant pas en culture cellulaire, son identification a été difficile et il n'a été que tardivement cloné (Choo et coll., 1989). L'absence d'un système de culture cellulaire efficace pour répliquer le VHC complique également l'étude moléculaire de ce virus. La seule approche pour exprimer son génome réside dans l'utilisation de vecteurs hétérologues. Le VHC est un virus enveloppé de petite taille ($\pm 30-60$ nm). Son génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive, contient environ 9 400 nucléotides et code pour une polyprotéine de 3 010 à 3 033 acides aminés (pour revue, Matsuura et Miyamura, 1993). Les clivages de cette polyprotéine par des peptidases signal d'origine cellulaire ainsi que par deux protéases virales génèrent un certain nombre de polypeptides : C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Lin et coll., 1994 ; Matsuura et Miyamura, 1993). Après clivage du quart N-terminal de la polyprotéine, trois protéines de structure sont produites : une protéine de nucléocapside basique (C) de 21 K, suivie de deux glycoprotéines de 31 K (E1) et 70 K (E2) (Matsuura et Miyamura, 1993). Le reste de la polyprotéine contient les protéines non structurales. Sur la base de leur organisation génomique et des propriétés des virions, le VHC, les pestivirus et les flavivirus ont été classés en trois genres différents dans la famille des *Flaviviridae* (Minor, 1991). De nouveaux virus responsables d'hépatites non-A, non-B, non-C (GBVA et GBVB) viennent d'être clonés et séquencés (Muerhoff et coll., 1995). L'organisation génomique de ces virus ressemble à celle des *Flaviviridae*, et les auteurs proposent de les classer dans le genre « VHC » car ils sont plus proches du VHC que des flavivirus et des pestivirus.

Recherche d'antigènes protecteurs

En se basant sur les connaissances acquises dans le très grand nombre de modèles vaccinaux efficaces déjà existants, il est raisonnable de rechercher des structures vaccinales parmi les protéines virales. Les premiers travaux consistent donc à leur définition et à l'étude de leur biologie.

Les clivages générant les protéines structurales ont lieu durant la traduction pour les sites C/E1, E1/E2 et NS2/NS3 (figure 14.1). Ces clivages génèrent les protéines C et E1 ainsi qu'un précurseur de E2, appelé E2-NS2. Le précurseur E2-NS2 est ensuite clivé pour générer E2 et E2-p7. L'efficacité de clivage au niveau du site E2/p7 semble varier en fonction du génotype de la souche de VHC utilisée. En effet, pour la souche H (génotype 1a), le clivage au niveau

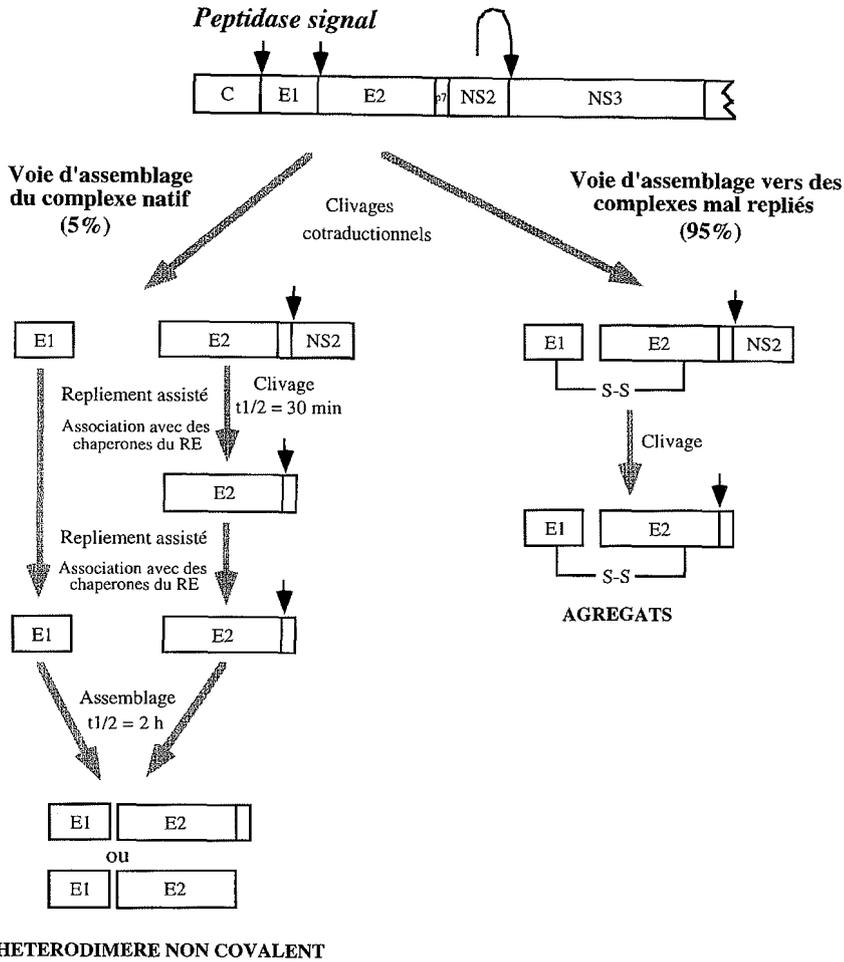


Figure 14.1 : Maturation et assemblage des glycoprotéines du virus de l'hépatite C.

du site E2/p7 est relativement inefficace, et les protéines E2 et E2-p7 sont détectées dans les cellules exprimant la polyprotéine du VHC. Pour la souche BK (génotype 1b), la protéine E2-p7 n'est pas détectée, ce qui indique un clivage plus efficace (Lin et coll., 1994). Les sites C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2 sont les cibles d'une peptidase signal d'origine cellulaire tandis que le clivage au niveau du site NS2/NS3 est dû à l'activité protéasique présente dans NS2.

En l'absence d'un système de culture cellulaire adapté à la réplication du VHC, peu d'éléments sont connus sur son cycle infectieux. Le seul modèle disponible à l'heure actuelle est le chimpanzé. Chez cet animal, la présence

d'ARN viral est détectée au plus tôt trois jours après l'inoculation et des anticorps anti VHC apparaissent 12 semaines ou plus après l'infection (Hilfenhaus et coll., 1992 ; Shimizu et coll., 1990).

Très peu de données existent à l'heure actuelle sur la réponse immune capable de conférer une protection envers le VHC et encore moins sur les antigènes impliqués. Des essais préliminaires de vaccination effectués chez le chimpanzé ont montré un rôle potentiellement neutralisant des anticorps dirigés contre les glycoprotéines (Choo et coll., 1994). Ces résultats n'ont toutefois été obtenus que dans le cadre de doses d'épreuve virale particulièrement faibles. De plus, ils doivent être nuancés dans leur exploitation, puisque les épreuves n'ont été effectuées qu'avec la souche homologue et que la capacité de mutation dans certaines régions des gènes codant pour les glycoprotéines est particulièrement élevée, laissant suggérer des possibilités d'évasion à la neutralisation. D'autres études effectuées chez le chimpanzé semblent confirmer le potentiel neutralisant de l'enveloppe E2 (Shimizu et coll., 1994). Par ailleurs, des données cliniques récentes indiquent que la réponse immunitaire de type cellulaire, en particulier les réponses de type prolifératives CD4⁺, dirigées notamment contre la nucléocapside virale, pourrait être associées à un meilleur contrôle et/ou une meilleure prévention de l'infection.

Des résultats obtenus sur la réplication et l'assemblage du VHC montrent que les glycoprotéines virales E1 et E2 s'assemblent très lentement et inefficacement pour former un hétérodimère non covalent (Dubuisson et coll., 1994). En effet, l'assemblage de l'hétérodimère prend plusieurs heures et environ 95 % des complexes observés sont des agrégats. L'étude du repliement des glycoprotéines E1 et E2 est indispensable afin de comprendre la lenteur observée dans l'assemblage du complexe E1E2. Les résultats obtenus sur l'acquisition des ponts disulfures intramoléculaires et sur l'association des glycoprotéines du VHC avec la calnexine, une protéine du réticulum endoplasmique qui intervient dans l'assemblage des oligomères, indiquent que le repliement de E1 est très lent alors que l'acquisition des ponts disulfures intramoléculaires a lieu rapidement pour E2 (Dubuisson et Rice, 1996). De plus, les glycoprotéines du VHC s'associent rapidement avec la calnexine, mais se dissocient très lentement. Ces résultats sont en accord avec la lenteur observée pour le repliement et l'assemblage des glycoprotéines du VHC. L'interaction des glycoprotéines du VHC avec d'autres chaperones du réticulum endoplasmique est à l'étude. Il a ainsi été montré que les chaperones BiP, calnexine et calréticuline interagissent avec les glycoprotéines du VHC (Schneeberger et Dubuisson, résultats non publiés).

La caractérisation des glycoprotéines du VHC exprimées par les vecteurs vaccine ou Sindbis indiquent que la majorité d'entre elles sont mal repliées et forment des agrégats. Il est actuellement difficile de distinguer les protéines qui ont subi un repliement correct conduisant à la formation de complexes natifs, de celles qui suivent une voie non productive qui conduit à la formation d'agrégats. L'absence de VHC purifié, d'un système de culture cellulaire

supportant la réplication du VHC et de réactifs immuns spécifiques des protéines natives ont empêché jusqu'à présent la caractérisation des complexes glycoprotéiques présents à la surface des virions. Afin de contourner ce problème, un anticorps monoclonal a été produit, dont la spécificité dépend de la conformation protéique et qui reconnaît un complexe E1E2 dont les sous-unités sont correctement repliées, comme l'indique la formation de ponts disulfures intramoléculaires, la résistance à des digestions protéasiques et la dissociation de la calnexine (Deleersnyder et coll., 1996). L'assemblage de ces complexes natifs est lent ($T_{1/2} \approx 2$ h) et cela est dû au lent repliement des sous-unités E1 et E2. La localisation de ces complexes natifs a également été étudiée en testant la résistance à la digestion par l'endoglycosidase H, ainsi que par immunofluorescence et immunomicroscopie électronique. Les résultats indiquent que ces complexes ne quittent pas le réticulum endoplasmique, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme de rétention de ces complexes dans le réticulum endoplasmique. De plus, le bourgeonnement (acquisition de l'enveloppe) du VHC se déroulerait dans ce compartiment, tout comme il est proposé pour les flavivirus (Pettersson, 1991). Le complexe natif identifié serait donc un complexe de « prébourgeonnement ».

L'utilisation de ce nouvel anticorps monoclonal permet actuellement d'isoler spécifiquement la forme mature du complexe E1E2 (ou E1-E2-p7). Cette forme mature ne représente qu'un faible pourcentage des glycoprotéines totales du VHC produites en culture cellulaire par un virus recombinant de la vaccine. Cet anticorps monoclonal devrait être très utile pour isoler les complexes E1E2 matures qui seront utilisés pour étudier le tropisme cellulaire du VHC. D'autre part, des troncations à l'extrémité carboxy-terminale des glycoprotéines E1 et E2 ont permis d'obtenir des formes secrétées de ces glycoprotéines ainsi que des complexes E1E2 solubles (Michalak et coll., 1996). Cependant, seule la forme secrétée de E2 était correctement repliée. L'expression de cette protéine sous une forme soluble et l'isolement de complexes natifs à l'aide de l'anticorps monoclonal devraient également permettre de développer de nouveaux tests diagnostiques basés sur la détection d'épitopes conformationnels. Ces travaux constituent également une base prometteuse pour la mise au point d'un vaccin.

Le développement d'une réponse immune à la fois humorale et cellulaire sera probablement nécessaire pour prévenir une infection par le VHC. Les résultats de Choo et coll. (1994) suggèrent qu'une réponse humorale protectrice peut être induite. Il est donc important de pouvoir produire de façon optimale les complexes E1E2 natifs qui pourraient induire une production optimale d'anticorps neutralisants.

Vaccins « ADN »

Les recherches utilisant les nouvelles techniques de vaccination avec les acides nucléiques visent à étudier le potentiel immunogénique des protéines du VHC lorsqu'elles sont présentées au système immunitaire via les ADN nus correspondants.

Les objectifs sont de deux ordres. A court terme, il s'agit d'identifier un ou plusieurs gènes ou déterminants pouvant participer à une réponse protectrice (expérimentations chez la souris) : plusieurs gènes viraux sont en cours d'étude (Inschauspé, communication personnelle). A long terme, il est prévu d'exploiter de tels immunogènes pour le développement de vaccins préventifs et thérapeutiques (expérimentations chez les chimpanzés). Différents modes de présentation de l'antigène seront testés (vecteurs simples ou hybrides, formes de E2 secrétées ou non-secrétées) et les réponses humorales et cellulaires étudiées. Le pouvoir protecteur des anticorps sera évalué dans différents tests de neutralisation *in vitro* et vraisemblablement chez le chimpanzé.

Deux types de vecteurs d'expression ont été utilisés pour exprimer les gènes du VHC : des vecteurs permettant l'expression des gènes directement sous le contrôle du promoteur CMV (non-fusion) et des vecteurs permettant l'expression de déterminants du VHC en fusion avec la protéine HBs du virus de l'hépatite B (fusion). Il a été possible d'obtenir des réponses humorales stables, de hauts titres et croisées, dirigées contre la nucléocapside virale et l'enveloppe E2. Les réponses humorales dirigées contre ces protéines sont à l'heure actuelle en cours d'étude. Des essais d'immunisation chez d'autres espèces animales (notamment les primates) pourraient être initiées dans un futur assez proche, pour tester la pertinence des données obtenues dans le modèle murin lors du passage à des espèces supérieures.

Les retombées et applications de ce programme de recherche se situent à deux niveaux :

- Sur le plan fondamental, le système d'immunisation décrit ci-dessus constitue une approche originale qui a été testée sur plusieurs modèles viraux (essentiellement les virus de la grippe, de l'hépatite B, VHB, le VIH, le virus herpès bovin), mais pas encore à ce jour pour le VHC. Dans ces modèles, particulièrement pour la grippe, des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus *in vitro* et *in vivo*, c'est-à-dire qu'il a été possible de neutraliser des infections résultant d'épreuves homologues ou hétérologues. L'application de ce système au modèle des infections par le VHC permettra d'analyser les mécanismes immuno-moléculaires propres à ce virus, d'identifier de nouveaux déterminants (neutralisants) et de disséquer et donc pouvoir éventuellement manipuler les réponses immunes qui leur sont associées.
- Sur le plan thérapeutique, il est clair que les données actuelles sur le nombre de personnes infectées par le VHC en France, les risques de développement de carcinomes hépatocellulaires existants (on estime en France à plus de 30 000 le nombre de carcinomes hépatocellulaires directement liés aux

infections à VHC d'ici l'an 2010) et la très faible efficacité des traitements antiviraux incitent fortement à privilégier toutes les actions pour la prévention des infections chroniques. Les recherches sur les vaccins thérapeutiques doivent être intégrées dans les stratégies développées pour enrayer la progression vers le cancer primitif du foie.

Parmi les différentes approches vaccinales envisageables contre le VHC, les immunisations à base d'ADN nu représentent un intérêt tout particulier vu l'efficacité, déjà prouvée dans d'autres modèles infectieux, de ce mode d'immunisation comparé à des modes d'immunisations plus classiques (protéines recombinantes, par exemple). Pour le VHC, il est désormais important d'effectuer des expérimentations dans plusieurs espèces animales afin de prouver la validité des observations faites dans le modèle murin et avant de pouvoir envisager toute application à l'homme. Ceci implique des études de durée assez longue avant la sélection de candidats vaccins.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrignani S. Cellular immune reactions against hepatitis C core in chronic hepatitis C [letter]. *Gastroenterology* 1995, **108** : 1957-1958
- 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
- Cahour A. Les perspectives d'un vaccin contre l'hépatite C : quelle stratégie adopter ? *Medecine et Science* 1995, **11** : 81-91
- Chien DY, Choo QL, Ralston R, Spaete R, Tong M, Houghton M, Kuo G. Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. *Lancet* 1993, **342** : 933
- Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A, non B viral hepatitis genome. *Science* 1989, **244** : 359-362
- Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner AJ, Chien DY et coll. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91** : 1294-1298
- 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
- Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn Y, Rice CM, Dubuisson J. *J Virol* 1996, soumis
- Dubuisson J, Hsdu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russel DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and sidbis viruses. *J Virol* 1994, **68** : 6147-6160

Dubuisson J, Rice CM. Hepatitis C virus glycoprotein folding : disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol* 1996, **70** : 778-786

Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR et coll. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992, **258** : 135-140

Fu ZF, Dietzschold B, Carolin L et coll. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88** : 2001-2005

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

Hilfenhaus J, Krupka U, Nowak T, Cummins LB, Fuchs K, Roggendorf M. Follow-up hepatitis C virus infection in chimpanzees : determination of viraemia and specific humoral immune response. *J Gen Virol* 1992, **73** : 1015-1519

Hollinger. 1990, In : Virology, eds. Fields BN et coll., Raven Press, New York, 2239-2273

Inchauspé G, Zebedee S, Lee DH, Sugitani M, Nasoff M, Prince AM. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus : comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sciences* 1991, **88** : 10292-10296

Inchauspé G, Vitvitski L, Major M et coll. Differential induction of antibody and T-helper responses following immunization with hepatitis C virus nucleocapsid DNA or protein immunogen. 1996, soumis

Iwarson S, Tabor E, Thomas HC, Snoy P, Gerety RJ. Protection against hepatitis B virus infection by immunization with hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1985, **88** : 763-767

Kita H, Moriyama T, Kaneko T, Harase I, Nomura M, Miura H, Nakamura I, Yasaki Y, Imawari M. HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology* 1993, **18** : 1039-1044

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 USA* 1991, **88** : 4138-4142

Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992, **149** : 3339-3344

Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Choo QL, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virology* 1993, **67** : 7522-7532

Lin C, Lindenback BD, Pragai BM, Mc Court DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region : identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994, **68** : 5063-5073

Major M, Vitvitski L, Mink MA, Schleaf M, Whalen R, Trepo C, Inchauspé G. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J Virology* 1995, **69** : 5798-5805

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

Matsuura Y, Miyamura T. The molecular biology of hepatitis C virus. *Semin Virol* 1993, **4** : 297-304

Michalak JP, Wychowski C, Thomas I, Ung S, Xu J, Rice CM, Dubuisson J. 1996, manuscrit en préparation

Mink MA, Benichou S, Madaule P, Tiollais P, Prince AM, Inchauspé G. Characterisation of a B-cell immunogenic domain in hepatitis C virus E2 glycoprotein using a yeast peptide library. *Virology* 1994, **200** : 246-255

Minor PD. Picornaviridae. *In* : Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Francki RI, Fauquet CM, Knudson DA, Brown E Eds. *Arch Virol* 1991, **2** : 320-326

Minutello MA, Pileri P, Unutmaz D, Censini S et coll. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease : intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993, **178** : 17-25

Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ et coll. Genomic organization of GB viruses A and B : two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995, **69** : 5621-5630

Murray K, Bruce SA, Hinnen A, Wingfield P, van Erd PM et coll. Hepatitis B virus antigens made in microbial cells immunise against viral infection. *EMBO J* 1984, **3** : 645-650

Nasoff MS, Zebedee S, Inchauspé G, Prince AM. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88** : 5462-5466

Pettersson RF. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991, **170** : 67-104

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

Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L et coll. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus : cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 **93** : 1759-63

Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T et coll. Hepatitis C virus infection is associated with the developpment of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87** : 6547-6549

Schneeberger et Dubuisson, 1996, résultats non publiés.

Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J et coll. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87** : 6441-6444

Shimizu YK, Hijitaka M, Iwamoto A, Alter H, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant virus. *J Virol* 1994, **68** : 1494-1500

Shimotohno K. Hepatocellular carcinoma in Japan and its linkage to infection with hepatitis C virus. *Semin Virol* 1993, **4** : 305-312

Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M et coll. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein : implication for an escape from antibody. *Virology* 1993, **195** : 297-301

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

Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Saracco G et coll. Variable and hypervariable domains are found in the region of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glucoproteins. *Virology* 1991, **180** : 842-848

Weiner AJ, Erickson AL, Kansopon J et coll. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92** : 2755-2759

Wolf 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 n° 52*, INSERM, 1993