

Les perspectives d'un vaccin contre l'hépatite C : quelle stratégie adopter ?

L'hépatite C est une maladie répandue dans le monde entier, atteignant 1 % de la population, qui peut chez 5 % à 10 % des malades évoluer lentement vers une cirrhose, puis un carcinome hépatocellulaire. Le développement des tests de dépistage a permis de réduire considérablement les risques de contamination post-transfusionnelle, mais le mode de transmission est encore indéterminé pour 30 % des hépatites C. La mise au point d'un vaccin se fait donc de plus en plus pressante. La réplication inefficace du virus dans les systèmes de culture cellulaire et l'existence d'un modèle animal unique et de surcroît protégé, le chimpanzé, rendent difficile l'étude du virus de l'hépatite C (VHC); les caractéristiques biologiques de celui-ci ne sont toujours pas définies, et les connaissances sur sa morphogénèse et sa pathogénie sont encore insuffisantes. De plus, le VHC présente une très grande variabilité génétique, qui se manifeste tant au niveau des différentes souches que chez un même individu au cours de l'évolution de l'infection, obligeant à concevoir un vaccin multivalent. Devant l'accumulation des problèmes à résoudre, la perspective d'une vaccination demeure encore lointaine malgré des premiers résultats encourageants.

Annie Cahour

ADRESSE

A. Cahour : chargée de recherches au Cnrs. Cnrs URA 545, virologie moléculaire, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75746 Paris Cedex 15, France.

L'hépatite C était déjà connue il y a une vingtaine d'années, lors de la mise en place des tests de détection des virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite A (VHA). Répertoire parmi les hépatites non A, non B [1], elle fut ensuite distinguée de l'hépatite E [2], à transmission essentiellement entéro-orale. L'identification de l'agent étiologique de l'hépatite C est relativement récente puisqu'elle date de 1989 [3]. Pour la première

fois dans l'histoire de la virologie, un virus a été identifié par son génome, par le biais de la biologie moléculaire, sans isolement de la particule virale elle-même [4]. C'est là le problème majeur que pose le VHC : malgré de nombreuses tentatives, il est toujours impossible de le cultiver *in vitro*. L'hépatite C constituera un problème de santé publique préoccupant à la fin du siècle, l'épidémie atteignant des proportions inquiétantes. En France, l'estimation moyenne de la

RÉFÉRENCES

1. Feinstone SM, Kapikiana AZ, Purcell RH, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to hepatitis A or B. *N Engl J Med* 1975 ; 292 : 767-70.
 2. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990 ; 247 : 1335-9.
 3. Choo QL, Kuo G, 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 : 359-62.
 4. Trépo C. Identification du virus de l'hépatite C (VHC) : un progrès décisif pour la santé publique. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 98-107.
 5. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993 ; 67 : 1385-95.
 6. Hijikata M, Kato N, Ootusyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5547-51.
 7. Grakoui A, Mccourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 10613-7.
 8. Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, et al. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis-C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 10773-7.
 9. Suzich JA, Tamura JK, Palmerhill F, et al. Hepatitis-C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993 ; 67 : 6152-8.
 10. Brand D, Truong C, Barin F. Domaines fonctionnels de l'enveloppe du VIH-1 et anticorps neutralisants. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 417-24.
 11. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994 ; 68 : 6147-60.
 12. Weiland E, Stark R, Haas B, Rumenapf T, Meyers G, Thiel HJ. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 1990 ; 64 : 3563-9.
 13. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, et al. Evidence for immune selection of hepatitis-C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants. Potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 3468-72.
- prévalence des marqueurs du VHC chez les nouveaux donneurs de sang est de 0,3 % pour l'année 1993 (enquête de la Société française de transfusion sanguine, 1994). Ce chiffre ne rend malheureusement pas compte de l'étendue de la contamination de la population générale, évaluée de 1 % à 2 %, soit 500 000 à 1 million de personnes. Parmi les sujets infectés, 50 % vont subir un passage vers un état chronique de la maladie, avec possibilité de complication en cirrhose pour la moitié d'entre eux. Enfin l'évolution d'une cirrhose, très lente et insidieuse, entraînera l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire dans 20 % des cas. Avec le développement des tests de dépistage, le risque de transmission transfusionnelle a considérablement diminué ; estimé de 6 % à 10 % dans les années 1980, il est actuellement réduit à 0,02 % par unité de sang transfusé. Toutefois il ne peut atteindre le seuil zéro, faute de connaissances virologiques suffisantes. L'éviction des lots de sang contaminé en matière de transfusion devrait stabiliser l'épidémie ; les conséquences des contaminations vont, en revanche, se faire sentir dans les années à venir, l'infection évoluant sur une période de vingt à trente ans. La prévalence de l'hépatite C en France reste difficile à évaluer du fait d'un mode de contamination encore mal défini ; la contamination par voie parentérale est la mieux connue ; le mode de transmission reste encore inconnu pour 30 % à 40 % des hépatites C déclarées, dites alors sporadiques. Les études concernant les autres modes de contamination, verticale (materno-fœtale), sexuelle, ou familiale, sont assez discordantes. Il devrait revenir à des études épidémiologiques d'étudier la fréquence des hépatites C dans l'entourage d'un malade, la prévalence de la maladie dans certaines régions du globe, et peut-être même de découvrir le rôle d'un vecteur non encore identifié.
- Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae* : c'est un virus à ARN enveloppé, et certaines ressemblances avec les deux autres genres, flavivirus et pestivirus, l'ont désigné comme nouveau genre dans la famille. Son organisation génomique est comparable (figure 1) [5], avec deux régions non codantes aux extrémités 5' et 3', encadrant la partie codante, constituée d'un cadre unique de lecture. Les gènes des protéines de structure occupent le premier quart du génome, et sont suivis des gènes responsables de l'expression des protéines non structurales. La maturation de la polyprotéine virale (3011 acides aminés) comporte des modifications co- et post-traductionnelles assurées par l'action combinée de protéase(s) cellulaire(s), associée(s) aux membranes [6] et de protéases virales cytoplasmiques [7, 8]. Malgré quelques divergences dans les processus protéolytiques de la région non structurale, les propriétés générales restent comparables ; l'attribution d'une activité de protéase/hélicase [9] revient à la protéine NS3, et celle d'une activité de polymérase dépendante de l'ARN à la protéine NS5. Les mécanismes de maturation de la région des protéines structurales sont, en revanche, beaucoup plus distinctifs et particuliers selon le genre considéré.

Les particularités du VHC qui sont autant d'obstacles à l'élaboration d'un vaccin

Les protéines d'enveloppe du VHC, par analogie avec celles des virus enveloppés, sont considérées comme cibles importantes pour le développement d'un vaccin capable d'induire des anticorps (Ac) neutralisants [10]. La présence de deux glycoprotéines (gp) fortement glycosylées (E1 et E2) et leur possible association en hétérodimères [11] sont à rapprocher de la configuration de l'enveloppe des pestivirus, constituée des gp35 et gp53. Lorsque l'on aligne leurs séquences, la gpE2 du VHC est proche de la gp53 des pestivirus, responsable de la production d'Ac protecteurs chez l'animal immunisé [12]. E2 possède en outre une zone hypervariable [13, 14] dans sa partie aminoterminal, qui pourrait comporter un certain nombre d'épitopes de neutralisation. Cependant, les propriétés immunologiques du VHC sont encore très mal connues du fait de l'absence de système cellulaire permettant la propagation du virus. Les informations sur la réponse immunitaire développée au cours de l'infection par le VHC proviennent

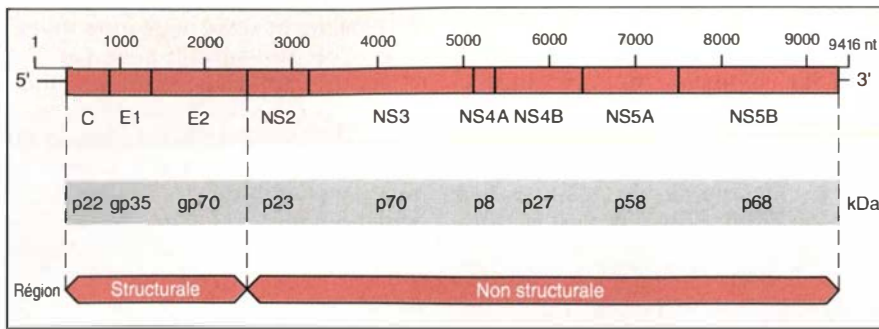


Figure 1. **Schéma de l'organisation génomique du VHC.** La partie supérieure représente l'ARN viral à l'échelle nucléotidique, avec ses gènes constitutifs. La partie inférieure délimite les régions structurales et non structurales, avec leurs différentes protéines (p ou gp), suivies de leur masse moléculaire en kDa. (nt : nucléotides ; p : protéine ; gp : glycoprotéine ; NS : non structurale ; 5' et 3' : régions 5' et 3' non codantes.)

du suivi clinique de malades, et de travaux effectués chez le chimpanzé. Cette réponse est faible et irrégulière, avec plusieurs épisodes d'augmentation des transaminases sériques, et une séroconversion tardive, apparaissant après 18,4 semaines en moyenne. Des tests de dépistage de deuxième et troisième génération ont été mis en place [15], capables de détecter, outre les Ac anti-NS4 (C 100-3), les Ac anticapside (C-22-3) et anti-NS3 (C 33c), les premiers à apparaître après infection (huit à onze semaines) [16, 17] et, plus récemment, les Ac anti-NS5. Les tests sérologiques permettent indirectement le diagnostic d'une infection par le VHC ; un test ELISA (*enzyme-linked immunoassay*) est pratiqué dans un premier temps, suivi par un test RIBA (*recombinant immunoblot assay*), dit de « confirmation », permettant de différencier la réponse sérologique à chacune des protéines virales testées. La réponse contre les glycoprotéines E1 et E2 est très variable (présence d'anticorps dans 7% à 28% des cas) [18] et dépend de la population étudiée. Malgré l'impact de tests sérologiques sensibles et spécifiques dans l'identification d'une infection par le VHC, le marqueur viral le plus précoce de la maladie (moins d'une semaine) demeure l'ARN viral. Celui-ci peut être mis directement en évidence dans le sérum par la méthode de RT/PCR (*reverse transcription/polymérase chain reaction*). Cette technique utilise l'amplification enzymatique de

l'ADN, et nécessite une étape préalable de transcription inverse de l'ARN viral en ADN. La positivité d'un test anti-VHC et la présence d'une virémie (appréciée en RT/PCR) sont le plus souvent corrélées. Cependant, on observe parfois un décalage : certains porteurs chroniques du virus, donc infectieux, n'ont plus d'anticorps anti-VHC ; à l'inverse, les sujets subissant une hépatite aiguë, très asymptomatique, n'ont pour la plupart pas encore développé une réponse immunitaire au virus, et sont pourtant susceptibles de le transmettre. Il est donc important, en matière de sécurité médicale, de pouvoir détecter l'hépatite C au stade aigu et d'évaluer l'intensité de la réplication virale chez un individu (son degré d'infectivité) et son évolution au cours de la maladie. L'étude de la virémie par RT/PCR est actuellement le seul moyen permettant à ce stade diagnostic et évaluation ; elle n'est malheureusement pas encore utilisable en pratique courante.

Deux études d'infections expérimentales répétées [19, 20] ont été menées chez le chimpanzé, seul modèle animal actuel permettant de suivre l'évolution de la maladie ; sa réponse à l'infection est similaire à celle de l'homme, exceptée la séroconversion dont l'intensité est plus faible. Afin d'évaluer la réponse immune développée chez les animaux à la suite d'une première infection expérimentale, une seconde injection virale, dite d'épreuve, a été effectuée avec

une souche homologue ou hétérologue, après diminution des signes caractéristiques de la première infection. Les résultats obtenus par les deux équipes sont similaires : une réinfection a été observée chez 80% des animaux, attestée par des marqueurs de l'hépatite C (augmentation des transaminases sériques, virémie, séroconversion, et signes histologiques de nécrose hépatique mesurés par le score de Knodell*). Une comparaison des séquences nucléotidiques de l'ARN viral détecté dans le sérum des chimpanzés, et de celui de l'inoculum utilisé pour l'injection d'épreuve (cas de la souche hétérologue), a permis de préciser que le phénomène observé résultait d'une surinfection par le virus utilisé pour l'épreuve virale, plutôt que d'une réactivation du virus injecté initialement. Ces résultats sont à rapprocher de nombreuses observations cliniques, montrant l'existence de plusieurs souches virales chez un même patient [21].

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette susceptibilité de l'hôte à une réinfection : (1) la faiblesse ou l'absence de protection immunitaire potentiellement conférée par des Ac neutralisants, et/ou par une réaction à médiation cellulaire ; (2) la variabilité génomique du virus qui serait responsable de l'installation clinique d'un état chronique ; (3) la possibilité pour les Ac, s'ils sont neutralisants ou subneutralisants, d'être facilitants ; (4) la présence d'un site de réplication extra-hépatique qui constituerait un réservoir latent de virus, et permettrait d'expliquer la réinfection de patients après transplantation hépatique.

La réponse immunitaire est faible

Il est actuellement admis que la réponse immunitaire à l'infection par le VHC est faible et se traduit par un taux d'Ac relativement bas. On sait estimer le taux d'Ac circulants, mais pas celui des Ac neutralisants. Il y a quelques années, une tentative de

* Score de Knodell : permet une quantification des lésions hépatiques selon quatre critères histologiques : inflammation portale, nécrose périportale, dégénérescence et nécrose focale lobulaires, fibrose.

RÉFÉRENCES

14. Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, *et al.* Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis-C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 189 : 119-27.
15. Couroucé AM, Janot C. Development of screening and confirmation tests for antibodies to hepatitis C virus. In : Reesind HW, ed. *Hepatitis C virus*. Amsterdam, Basel: Karger, 1994 : 36-48.
16. Farci P, Alter HJ, Wong DC, *et al.* Long-term study of hepatitis C virus (HCV) replication in the course of non-A, non-B hepatitis : correlation with antibody response and clinical outcome. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 98-104.
17. Chen PJ, Wang JT, Hwang LH, *et al.* Transient immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus capsid antigen in post-transfusion hepatitis C : putative serological marker for acute viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6271-5.
18. Inoue Y, Suzuki R, Matsuura Y, *et al.* Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection of an antibody to the expressed protein in patients with liver diseases. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 2151-4.
19. Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G. Immunity in hepatitis-C infection. *J Infect Dis* 1992 ; 165 : 438-43.
20. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, *et al.* Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis-C virus. *Science* 1992 ; 261 : 135-40.
21. Martell M, Esteban JI, Quer J, *et al.* Hepatitis V virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992 ; 66 : 3325-9.
22. Nasoff MS, Zebedee SL, Inchauspe G, Prince A. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5462-6.
23. Mink MA, Benichou S, Madaule P, Tiollais P, Prince AM, Inchauspe G. Characterization and mapping of a B-cell immunogenic domain in hepatitis C virus E2 glycoprotein using a yeast peptide library. *Virology* 1994 ; 200 : 246-65.
24. Shirai M, Okada H, Nishioka M, *et al.* An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. *J Virol* 1994 ; 68 : 3334-42.
25. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, *et al.* Lymphocyte-T response to hepatitis-C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 610-7.

neutralisation du virus *in vitro* a échoué : après injection intra-veineuse à un chimpanzé de VHC incubé préalablement avec du plasma de patient contenant des Ac dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe de la souche homologue, le chimpanzé a développé une virémie. Les Ac anti-VHC ne seraient donc pas neutralisants. Il doit cependant en exister, mais à un taux très faible, ce qui expliquerait que 20 % des chimpanzés soient protégés contre la dose d'épreuve virale administrée lors des deux expériences décrites précédemment [19, 20].

Les deux types de réponses immunitaires au VHC (humorale et cellulaire) ont été décrits. Des épitopes B ont été localisés dans la protéine de capside [22]. Une réponse humorale a été observée contre la région N-terminale de la gp70 (E2), comprenant [13, 14] ou non [23] la séquence hypervariable. Concernant la réponse à médiation cellulaire, des épitopes de type T ont été définis pour les protéines C [24], E1, NS2, NS3 et NS5. Une telle réponse, dirigée contre la nucléocapside et NS4, a été observée chez des catégories très diverses de sujets infectés par le VHC [25, 26]. Des lymphocytes cytotoxiques (CTL) ont été détectés dans le foie de patients [27] et de chimpanzés [28] atteints d'hépatite chronique, mais jamais dans le sang périphérique. Cette infiltration lymphocytaire spécifique du parenchyme hépatique des sujets présentant une infection aiguë ou chronique témoignerait d'une participation directe des cellules à la pathogénie du virus, par atteinte des tissus hépatiques, plutôt que d'une réelle protection. Un tel mécanisme a déjà été mis en évidence pour d'autres systèmes virus/hôte, notamment pour le virus de l'hépatite B (VHB) [29].

Variabilité génétique/chronicité

Une des propriétés du VHC, qui le distingue des deux autres genres flavivirales, est d'entraîner une évolution de l'infection vers un état chronique (50 % des cas), particularité qui pourrait être liée à la variabilité même du virus. Le VHC, comme tout virus à ARN, est soumis à une forte fréquence de mutations, suppo-

sée également répartie le long du génome (de 10^{-3} substitutions par site et par an) [30]. Cependant, les mutations observées ne concernent que celles compatibles avec la survie du virus, localisées dans des séquences non responsables de fonctions vitales. Le pourcentage de mutations le plus élevé est identifié dans la région codant pour l'enveloppe (20 % à 40 %), ce qui impliquerait, chez le malade, l'apparition de mutants échappant aux mécanismes de défense immunitaire déployés par l'organisme contre le virus présent au début de l'infection. Cette variabilité génétique doit aussi être considérée au niveau des nouvelles souches répertoriées, ce qui pose un sérieux problème de génotypage, selon les séquences comparées. Actuellement, bien qu'aucune classification n'ait été officiellement retenue, les différentes études de génotypage se réfèrent aux travaux de Simmons [31, 32]. La méthode conventionnelle de classification par sérotypage des autres genres de la famille des *Flaviviridae* ne pouvait être utilisée pour différencier les variants du VHC du fait des nombreuses incertitudes concernant la normalisation de la réponse sérologique au virus. L'analyse du génome viral par amplification (RT/PCR) et séquençage nucléotidique et la comparaison avec d'autres séquences se sont révélées beaucoup plus adaptées au VHC. Une première série de travaux, basés sur la comparaison de séquences d'un fragment de 222 nucléotides dans la région du gène NS5, identifiait, parmi les échantillons analysés, six génotypes (1 à 6) avec différents sous-types, conduisant à 11 populations virales distinctes génétiquement [31]. Des travaux plus récents, associant les comparaisons de séquences dans les régions codant pour la capside, la gpE1 et NS5, ont abouti à la même classification [32]. Une autre équipe, se limitant à la séquence de la région E1, a distingué 12 génotypes [33]. De l'ensemble de ces analyses la conclusion suivante a été dégagée : toute région du génome du VHC, exceptées la région 5' non codante et la région hypervariable du gène E2, semble contenir suffisamment d'information phylogénétique, caractéristique d'un génotype donné. Une distribution géographique des

différents génotypes vient d'être proposée, regroupant des données internationales [34]. Les deux génotypes la (souche américaine) et 1b (souche japonaise) sont les plus représentés dans la population mondiale, en particulier dans la population française [35]. Des études épidémiologiques supplémentaires s'avèrent nécessaires pour établir une corrélation entre un génotype donné et la répartition géographique, la sévérité de la maladie, l'importance de la charge virale, ou la sensibilité à un traitement. Le génotype 1b favoriserait une évolution de la maladie vers un carcinome hépatique [36], et répondrait moins bien que les autres génotypes au traitement par l'interféron [37].

Anticorps neutralisants/anticorps facilitateurs

La susceptibilité des chimpanzés à une réinfection, avec une souche homologue de VHC ou non, est à rapprocher du phénomène de l'accroissement dépendant des anticorps (ADE : *antibody-dependent enhancement*) de la réplication virale dans les macrophages, observé pour certains virus [38]. Le virus de la dengue en est l'exemple parfait ; le phénomène a été décrit par Halstead en 1977 [39] : les Ac qui persistent de la première infection, s'ils ne sont pas neutralisants vis-à-vis du virus introduit lors de la deuxième infection, forment avec celui-ci des complexes virus-anticorps reconnus par les récepteurs Fc γ capables de fixer les immunoglobulines G par leur portion Fc. Les macrophages peuvent alors, en plus de l'infection normale par le virus, être infectés indirectement par endocytose de ces complexes, avec déclenchement de la cascade d'événements qui provoquent une fièvre hémorragique. De ce phénomène de « facilitation » résultera une soudaine aggravation de la maladie, avec syndrome de choc (DHF-DSS : *dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome*).

Le phénomène d'ADE est possible pour la plupart des flavivirus, en particulier pour les virus de la fièvre jaune (FJ) et de la dengue, pour lesquels une réplication virale a été démontrée dans les macrophages ; cependant, il est surtout observé dans le cas d'infection par le virus de la

dengue du fait de sa variabilité (distinction de quatre sérotypes), alors qu'une plus grande homogénéité est attribuée au virus de la FJ. Bien qu'une réplication virale du VHC ait été détectée dans une sous-population de monocytes/macrophages parmi les cellules mononucléées du sang périphérique de malades infectés [40], il semble prématuré d'attribuer une capacité « facilitante » aux Ac neutralisants du VHC développés au cours d'une première infection, en réponse à une surinfection. Il doit être précisé que les signes cliniques observés après la deuxième infection sont atténués par rapport à ceux de la primo-infection et se distinguent d'une aggravation incontrôlée de la maladie, indiquant qu'il subsiste une faible protection. Des tests d'immunisation passive *in vivo*, ainsi que des études épidémiologiques permettant de définir une pathogénicité associée à chaque génotype, devraient permettre d'étayer cette éventualité. L'infection par le VHC est caractérisée par son atypie ; il serait très utile de savoir si les caractères cliniques de l'infection par différents types sont distinctifs, comme dans le cas des pestivirus, ou au contraire semblables comme pour les flavivirus.

Tropisme multiple du VHC

L'hypothèse concernant l'existence d'un site de réplication extrahépatique du VHC vient d'être vérifiée par la détection d'ARN viral dans des lymphocytes B de patients atteints d'hépatite C chronique [41] ; rappelons l'observation de la présence d'ARN viral dans les macrophages d'un sujet infecté par le VHC. Bien qu'ayant un tropisme hépatique très prononcé, le VHC pourrait, comme certains autres virus hépatotropes (VHB), afficher une affinité pour d'autres cellules, ce qui le rapproche des flavivirus et pestivirus, eux aussi capables d'infecter des cellules lymphoïdes.

L'examen des principales caractéristiques du VHC laisse entrevoir des difficultés pour l'élaboration d'un vaccin : (1) l'absence de système de culture virale *in vitro*, nécessaire à une meilleure compréhension de l'immunogénicité du virus, et de sa pathogénie ; (2) la difficulté de définir des épitopes de neutralisation du

fait de la variabilité génétique du virus ; (3) la faiblesse des réponses immunitaires à l'infection, avec installation d'un état chronique. Concernant la thérapeutique, l'interféron α (IFN α) est actif dans le traitement des infections par le VHC [42, 43]. Les données dont on dispose ne concernant que le traitement des formes chroniques de la maladie, les résultats obtenus pour le traitement de l'hépatite C aiguë sont encore trop rares et discordants. Parmi les cas d'hépatite chronique traités, trois types de réponses à l'IFN α sont décrits : la rémission complète et prolongée (20 % des cas), les formes à rechute après un traitement de six mois et arrêt des injections d'IFN α (50 % à 70 % des patients), et l'absence de réponse à l'IFN α (20 % à 40 % des patients). L'IFN α demeure le seul agent antiviral permettant le traitement des formes chroniques d'hépatite C [44] ; de nouveaux protocoles d'administration de l'IFN α sont à l'étude afin de préciser la dose et la durée optimales du traitement. D'autres molécules chimiques, telles que la ribavirine, sont en cours d'évaluation thérapeutique. Une meilleure connaissance de la biologie moléculaire du VHC permet d'envisager la définition prochaine de cibles, telles que des protéines virales de fonction définie et de séquence conservée, pour l'action de certains agents inhibiteurs. La vaccination serait le moyen de prévention idéal pour lutter contre une épidémie d'autant plus inquiétante qu'environ la moitié des cas d'hépatite C résultent de contamination inconnue.

Des premiers résultats encourageants

Bien que la perspective d'un vaccin semble encore lointaine, et s'apparente plutôt à une course d'obstacles, la diffusion récente de résultats suggérant l'existence d'Ac neutralisants en réponse à l'infection virale est très encourageante.

Neutralisation *in vitro* du VHC

Une des préoccupations majeures des équipes travaillant sur le VHC étant de mettre au point un système de culture *in vitro* du virus, de nombreuses lignées cellulaires ont été tes-

RÉFÉRENCES

26. Ferroni P, Mascolo G, Zaninetti M, *et al.* Identification of four epitopes in hepatitis-C virus core protein. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 1616-21.
27. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, *et al.* Intrahepatic cytotoxic lymphocytes-T specific for hepatitis-C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992 ; 149 : 3339-44.
28. Erickson AL, Houghton M, Choo QL, *et al.* Hepatitis-C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis-C. *J Immunol* 1993 ; 151 : 4189-99.
29. Moriyama TS, Guilhot S, Klopchin K, *et al.* Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990 ; 248 : 361-4.
30. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 3392-6.
31. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993 ; 74 (part II) : 2391-9.
32. Simmonds S, Smith DB, McOmish F, *et al.* Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1053-61.
33. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8234-8.
34. McOmish F, Yap PL, Dow BC, *et al.* Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors : an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 884-92.
35. Qu D, Hantz O, Gouy M, *et al.* Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in France. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1063-70.
36. Shimotohno K. Hepatocellular carcinoma in Japan and its linkage to infection with hepatitis-C virus. *Semin Virol* 1993 ; 4 : 305-12.
37. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, *et al.* Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy : relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992 ; 16 : 293-9.
38. Porterfield JS. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Adv Virus Res* 1986 ; 31 : 335-55.
39. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977 ; 146 : 201-17.
- tées, en particulier les lignées hépatocytaires, en raison du tropisme du virus, mais sans succès. En revanche, la susceptibilité de cellules mononucléées au VHC ayant été notée en 1985 [45], l'infection *in vitro* d'une lignée cellulaire humaine de lymphocytes T (Molt-4), par un inoculum viral (sérum de chimpanzé infecté par la souche F de VHC), a été réalisée. Une réplication virale a été révélée par la détection de brins d'ARN de polarité négative (intermédiaires de réplication) dans les cellules infectées, grâce à la combinaison des techniques RT/PCR [46] (figure 2A). L'efficacité de la réplication est accrue dans des cellules préalablement infectées par un rétrovirus murin (Molt-4 Ma). Une autre lignée cellulaire (HPB-Ma) s'est révélée plus performante, puisqu'elle permet de maintenir une réplication du virus après entretien des cellules jusqu'au 76^e jour, c'est-à-dire trois fois plus longtemps qu'avec la lignée Molt-4 Ma [47]. Cette lignée a été clonée et utilisée pour démontrer qu'il existait une corrélation pour une même souche virale, entre l'infectivité observée *in vitro* (estimée par le nombre de copies génomiques/ml mesuré par RT/PCR) et celle mesurée *in vivo* chez le chimpanzé, après injection intraveineuse (en DIC₅₀/ml : 50% de la dose infectieuse pour chimpanzé/ml). Ces premiers résultats obtenus sur lignée lymphocytaire T sont très encourageants car ils montrent qu'une réplication *in vitro* du VHC est possible, bien que non optimale. En effet, une faible proportion des cellules semble infectée, et une amplification virale n'est pas encore réalisable, peut-être à cause d'une morphogenèse incomplète du virion dans ce système cellulaire, et/ou de l'absence de facteurs cellulaires indispensables à certaines fonctions virales [48, 49].
- Un test de neutralisation *in vitro* vient d'être mis au point, utilisant le clone 10-2 de la lignée cellulaire HPB-Ma [50]. Il consiste à incuber une nuit à 4°C différentes dilutions d'un échantillon de sérum inactivé à 56°C pendant 30 min, provenant d'un malade porteur chronique du VHC, avec un inoculum viral (souche homologue). Le mélange est ensuite inoculé à une suspension cellulaire (HPB-Ma). Après deux heures de contact à 37°C, les cellules sont lavées et soumises au test de RT/PCR afin de détecter la présence d'ARN viral (figure 2, partie 2). Lorsqu'il y a neutralisation du virus par les Ac présents dans le sérum humain, il n'y a pas d'adsorption du virus sur les cellules, d'où un résultat négatif par PCR (absence de réplication virale). Cette mise en évidence indirecte du phénomène de neutralisation a été confortée par la détection de complexes immuns dans le mélange inoculum/sérum, quand le sérum est neutralisant. Lorsque ces complexes sont immunoprécipités par des Ac de lapin anti-immunoglobulines humaines, et soumis à une réaction PCR après extraction de l'ARN du culot, la présence d'ARN viral est détectée (figure 2B) ; il y a donc bien réactivité spécifique Ag/Ac. La présence de complexes immuns circulants dans le sang de patients atteints d'hépatite C chronique, décrite auparavant [51], n'avait cependant pu être reliée au phénomène de neutralisation du virus. Une corrélation a été établie entre particules virales de faible pouvoir infectieux, de densité élevée (1,17 g/ml), et la présence de complexes immuns ; inversement, les particules de forte infectivité et de faible densité (1,06 g/ml) demeurent à l'état libre. L'évolution parallèle des propriétés physiques (densité) et immunologiques (immunoprécipitation par les Ac anti-IgG humaines) des particules virales a été suivie au cours du temps, après infection expérimentale d'un chimpanzé par une souche virale très infectieuse ; la présence de complexes immuns circulants a ainsi été associée à un état de chronicité de l'infection.
- Très récemment, la neutralisation *in vitro* d'un inoculum viral par un sérum de patient atteint d'hépatite chronique C (souche homologue) a été démontrée par protection de chimpanzés séronégatifs, inoculés par voie intraveineuse avec le mélange de neutralisation [52]. Ces deux séries d'expériences de neutralisation *in vitro*, testées *in vitro* [50] et *in vivo* [52], utilisent les échantillons sériques provenant du même patient (H), infecté en 1977 à la suite d'une transfusion, et suivi sérologiquement depuis cette période [16]. L'inoculum viral correspond au sérum du patient recueilli lors de la

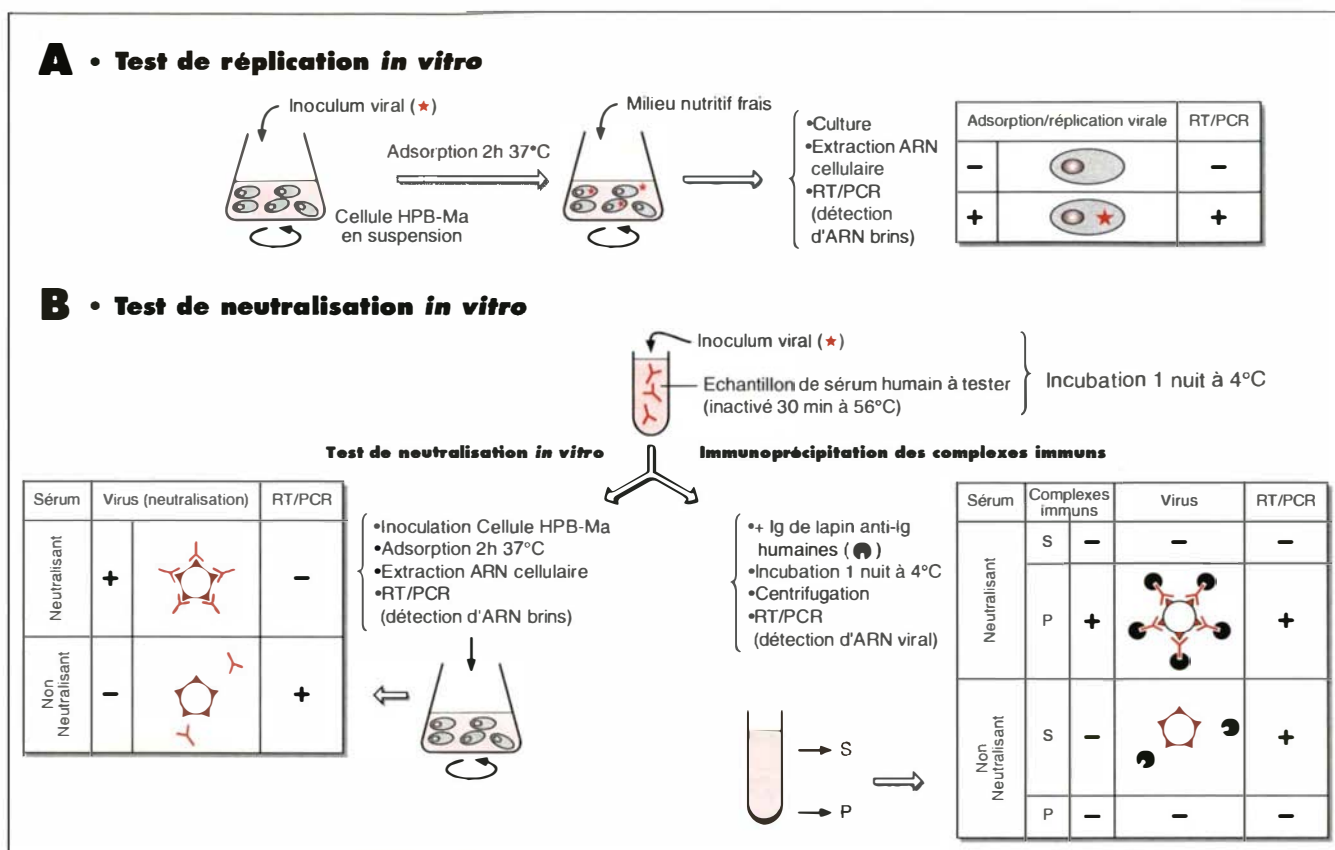


Figure 2. Schéma descriptif des expériences de réplication et de neutralisation *in vitro*. Partie 1 : test de réplication *in vitro* : les 2 cas de cellule, infectée ou non infectée par le virus, sont représentés dans le tableau. Partie 2 : test de neutralisation *in vitro* : les 2 cas de sérum, neutralisant ou non neutralisant, sont représentés dans les 2 tableaux. (C : cellules ; RT/PCR : reverse transcription/polymerase chain reaction ; ARN [-] : brin d'ARN de polarité négative ; Ig : immunoglobuline ; S : surnageant ; P : précipité ; Cellule HPB-Ma : lignée cellulaire d'origine lymphocytaire T.)

phase aiguë de la maladie, donc de forte charge virale, mais dépourvu d'Ac. Ces études aboutissent aux mêmes conclusions, à savoir que la souche virale originale, responsable de l'infection, n'est neutralisée que par les sérums du même patient recueillis au début de la phase chronique, deux à cinq ans après l'infection, et en aucun cas par les sérums correspondant à une phase plus tardive. Inversement, la souche virale présente dans le sérum treize ans après l'infection, en 1990, est neutralisée par le sérum prélevé en 1991, et non par un sérum recueilli dans les années 1980. Ces observations, corroborées par des tests sérologiques confirmant la présence d'Ac dirigés contre toutes les protéines virales dans les sérums même non neutralisants, et le séquençage du virus à dif-

férents stades de l'infection, révélant une grande variabilité dans la séquence hypervariable du gène codant pour la gpE2, aboutissent à cette conclusion : le VHC est capable d'induire des Ac neutralisants, mais de spécificité très étroite. Ces Ac évoluent rapidement au cours de l'infection, en réponse à une variabilité importante et rapide du virus chez un même individu (dès la deuxième année [52]). Cette constatation permet d'expliquer l'insuccès de la première tentative de neutralisation *in vitro* : le sérum testé n'aurait pas été sélectionné au moment où les Ac étaient neutralisants pour le virus utilisé pour le test.

L'ensemble de ces résultats permet pour la première fois de donner une signification à la production d'Ac au cours de l'infection chronique par le

VHC, et de lever l'incertitude sur leur pouvoir neutralisant. Il n'a pas été prouvé que ces Ac neutralisants étaient dirigés contre les protéines d'enveloppe du virus ; cependant deux arguments permettent d'envisager cette possibilité : (1) le fait que la présence d'Ac capables de bloquer l'initiation d'un cycle de réplication virale soit associée à la détection de complexes immuns (fixation à la surface du virion), et (2) une comparaison avec les virus enveloppés, dont les Ac neutralisants sont le plus souvent dirigés contre les protéines d'enveloppe. Cependant, ces observations mettent en évidence les premières difficultés à résoudre telles que (1) l'évaluation du spectre de neutralisation des Ac développés naturellement ou après une éventuelle vaccination ; (2) la nécessité de trou-

RÉFÉRENCES

40. Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992 ; 166 : 1276-80.

41. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis-C virus replication. *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 669-76.

42. Degos F, Benhamou J. Le traitement des hépatites chroniques. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 117-24.

43. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Shindo M. Antiviral therapy of hepatitis C- present and future. *J Hepatol* 1993 ; 17 (suppl 3) : S130-6.

44. Thomas HC, Foster GR. Treatment of hepatitis C with interferon : mechanism of action of interferon. In : Nishioka K, et al. eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo : Springer-Verlag, 1994 : 600-24.

45. Hellings JA, Van der Veen-Du Prie J, Snelting-Van Densen R, Stute R. Preliminary results of transmission experiments of non-A, non-B hepatitis by mononuclear leukocytes from a chronic patient. *J Virol Methods* 1985 ; 10 : 321-6.

46. Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH. Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5477-81.

47. Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H. Correlation between the infectivity of hepatitis-C virus *in vivo* and its infectivity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 6037-41.

48. Sawyer LSW, Wrin TM, Crawford-Miksza L, et al. Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 is determined in part by cell in which the virus is propagated. *J Virol* 1994 ; 68 : 1342-9.

49. Hsieh P, Rosner MR, Robbins PW. Host-dependent variation of asparagine-linked oligosaccharides at individual glycosylation sites of Sindbis virus glycoproteins. *J Biol Chem* 1983 ; 261 : 2548-54.

50. Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994 ; 68 : 1494-500.

51. Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, et al. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus. Evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 1993 ; 67 : 1953-8.

52. Farci P, Alter HJ, Wong DC, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7792-6.

ver des épitopes de neutralisation communs à différents isolats, ou très voisins de façon à les regrouper afin d'obtenir d'une structure antigénique multivalente à pouvoir vaccinant.

Une première étape vers la vaccination

Des essais de vaccination ont été tentés chez le chimpanzé par injection des glycoprotéines d'enveloppe exprimées et purifiées dans des systèmes différents. L'observation d'une induction d'Ac, augmentée par rapport à celle des animaux infectés expérimentalement, était cependant insuffisante pour prévenir une infection lors d'une épreuve virale. Récemment, l'immunisation de chimpanzés par injections répétées (x3) des deux glycoprotéines exprimées sous forme d'hétérodimères E1/E2 dans des cellules HeLa, à l'aide du vecteur de la vaccine, s'est révélée plus efficace [53]. En effet cinq animaux sur sept ont été protégés contre une épreuve d'infection virale, et les deux autres ont développé une hépatite qui s'est limitée à une phase aiguë, sans évolution vers la chronicité. En revanche, les huit chimpanzés témoins ont présenté une hépatite chronique. Cet effet protecteur contre une inoculation intraveineuse est important et très encourageant, puisque le VHC semble se transmettre par voie sanguine. L'induction d'Ac semble destinée à prévenir l'infection, et à lutter contre l'évolution de la maladie, car les deux chimpanzés non protégés n'ont contracté qu'une hépatite abortive. L'extrapolation de ces résultats à l'homme est prometteuse : (1) le taux d'Ac induits chez les chimpanzés immunisés est relativement faible, mais supérieur à celui observé chez les chimpanzés infectés chroniquement, et encore plus à celui détecté chez les malades chroniques ; (2) la réponse immunitaire chez l'homme est considérée comme étant plus stable que chez les primates non humains. Cependant, ces premières données doivent être interprétées avec certaines réserves : (1) la dose infectieuse utilisée pour l'épreuve virale est très faible (10 DIC₅₀), bien que représentative de l'infectivité moyenne d'un individu. Très récem-

ment une augmentation de la dose d'épreuve (60 DIC₅₀) n'aurait révélé aucune protection chez les animaux vaccinés ; (2) la première épreuve virale a été effectuée après la 3^e immunisation, lors de l'apparition du pic d'Ac, qui reflète la situation la plus favorable à une protection ; (3) il est tout à fait concevable qu'une vaccination préventive, telle qu'elle a été pratiquée dans cette expérience, modifie l'évolution de l'infection dans l'organisme ; de plus, il est possible que la résolution de la primo-infection déclenchée après l'injection d'épreuve résulte simplement d'une réaction immunitaire de type cellulaire de l'hôte. Des essais de thérapie vaccinale sont actuellement en cours chez des chimpanzés infectés expérimentalement afin d'étudier leur protection au cours du développement de la maladie ; (4) enfin, l'épreuve virale a été réalisée avec une souche homologue, ce qui ne donne aucune indication sur la capacité des chimpanzés à développer une protection croisée vis-à-vis des différents génotypes.

Les facteurs à améliorer

Malgré ces premiers résultats encourageants, la mise au point d'un vaccin efficace contre l'hépatite C apparaît comme un véritable défi lancé aux chercheurs devant le nombre d'obstacles à surmonter. Une meilleure connaissance des propriétés immunologiques du virus s'impose afin d'améliorer toute tentative d'immunisation. Nous savons que l'immunité est faible, mais pas complètement absente ; cela pourrait provenir d'un taux de réplication virale anormalement bas, d'où une inadéquation du stimulus antigénique pour provoquer une réponse sérologique uniforme lors d'une infection. Si cette hypothèse est correcte, une concentration appropriée d'immunogène devrait induire une bonne réponse immunitaire. C'est ce qui peut expliquer l'insuccès des premiers essais qui ne comportaient qu'une ou deux immunisations, contre trois pour les derniers essais. La présentation de l'antigène ainsi que l'adjuvant utilisé lors de l'injection ont aussi leur importance. Les résultats de vaccination sur les chimpanzés ont été obtenus à partir de glycoprotéines coexprimées et

purifiées dans des cellules HeLa, alors que les premiers essais infructueux utilisaient ces mêmes glycoprotéines exprimées séparément et dans des systèmes d'expression différents (la levure et/ou le baculovirus). Les glycoprotéines d'enveloppe étant très fortement glycosylées (5 sites pour E1 et 12 pour E2), il est préférable de les exprimer à l'aide de vecteurs adaptés à des systèmes cellulaires de mammifères, dont les processus de glycosylation sont susceptibles de refléter ceux des glycoprotéines du VHC. Un tel pourcentage de glycosylation doit avoir une signification biologique, en particulier dans le maintien d'une conformation des protéines d'enveloppe leur permettant d'interagir avec leur environnement, donc de leur immunogénicité. Il est préférable de respecter le plus possible cette conformation lors de la fabrication d'un vaccin. De plus, le protocole de vaccination expérimentale doit être soigneusement établi, fixant le nombre d'injections et le moment exact de l'épreuve virale, avec une dose infectieuse permettant d'affirmer qu'il y a réellement protection contre l'infection.

Autres stratégies de vaccination

Un vaccin génétiquement atténué

Le vaccin idéal pourrait être un virus vivant atténué, qui puisse conférer une immunité suffisamment durable à l'organisme, tel que le vaccin contre la fièvre jaune, pour lequel le virus a été atténué par passages successifs sur cellules de mammifères, puis sur œufs de poulets embryonnés.

Malheureusement, cette solution n'est actuellement pas envisageable pour le VHC du fait de l'impossibilité de le propager en culture cellulaire. Une autre stratégie consiste à produire un ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN viral, de longueur génomique et, par mutagenèse dirigée de cet ADNc, obtenir un virus de virulence atténuée par rapport à celle du virus sauvage. De nombreuses équipes possèdent actuellement l'ADNc complet du VHC mais, faute de système cellulaire performant, ne peuvent malheureusement pas vérifier s'il est infectieux ; le test

permettant de le confirmer consiste en effet à transfecter des cellules permissives avec l'ARN résultant de la transcription *in vitro* de l'ADNc génomique, et à obtenir un virus viable, possédant les propriétés phénotypiques du virus sauvage. Par analogie avec l'expérience concernant le virus de l'hépatite A (VHA) qui a permis de reproduire la maladie chez le ouistiti, par injection intra-hépatique de l'ARN transcrit à partir de l'ADNc génomique du VHA [54], le même protocole a été appliqué à partir de l'ADNc du VHC chez le chimpanzé (Feinstone, Wychowski et Rice, résultats non publiés), mais sans succès. Cet échec doit être comparé au résultat obtenu pour la réplication *in vitro* sur les cellules HPB-Ma [47] : il est impossible d'amplifier le virus avec les moyens dont nous disposons actuellement. Cela pourrait être expliqué, selon l'une des nombreuses hypothèses possibles, par une mauvaise stimulation des fonctions tardives du cycle viral, due à la présentation incorrecte du matériel génétique viral à la machinerie cellulaire. En effet, les régions 5' et 3' non codantes des virus à ARN, de structure secondaire très développée, détiennent la plupart des signaux de régulation des fonctions virales, stimulés par interaction avec de nombreux facteurs cellulaires.

Injection d'ADN nu

L'ADN étant le matériel génétique le plus accessible à toute manipulation, que ce soit du point de vue de sa stabilité (possibilité de lyophilisation), de sa préparation/purification, ou de son amplification, son utilisation directe apparaît depuis ces dernières années comme une perspective des plus prometteuses en matière de vaccination. En effet, une injection intramusculaire d'ADN plasmidique codant pour une protéine donnée peut entraîner un niveau d'expression élevé de cette protéine dans la cellule transfectée [55]. C'est ainsi que l'injection intramusculaire d'ADN codant pour la nucléocapside du virus de l'influenza protège la souris contre une dose d'épreuve du même virus, aussi bien avec une souche homologue qu'avec une souche hétérologue [56]. L'ADN passager est placé en général sous le

contrôle d'un promoteur fort, celui du cytomégalovirus (CMV), les gènes sont exprimés pendant une période durable, couvrant plusieurs mois, dans la cellule musculaire. L'expression intracellulaire des protéines d'intérêt déclenche une réponse immunitaire non seulement de type humorale, mais aussi de type cellulaire, par stimulation de CTL. Cette dernière réaction, moins spécifique de souche qu'une réponse humorale, favorise une protection hétérotypique. Il est possible d'envisager l'association de plusieurs gènes ou séquences nucléotidiques sur une même molécule d'ADN. Cette nouvelle stratégie de vaccination rencontre un succès variable selon le virus auquel elle s'adresse, dépendant de l'immunogénicité de l'antigène utilisé ; cependant, de réalisation relativement simple, elle suscite de nombreux espoirs. Pourquoi ne pas l'appliquer au VHC, et apporter ainsi une solution à sa variabilité génétique ? La protéine de capsid, fortement impliquée dans l'immunogénicité virale, devrait constituer une cible de choix (G. Inchauspé, communication personnelle), de par sa séquence relativement bien conservée, et par analogie avec les résultats obtenus pour la nucléocapsid du virus de l'influenza et de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B [57]. Le gène de la capsid pourrait être associé ou non à d'autres séquences virales susceptibles de favoriser une réponse CTL. Il est compréhensible que cette nouvelle méthode révolutionne le monde de la vaccinologie, car elle présente des avantages pratiques et économiques. Cependant, le manque de compréhension des mécanismes impliqués dans ce mode de protection ne permet pas de répondre aux questions soulevées par ce « vaccin du futur ». Une double incertitude concerne la cellule réceptrice de l'ADN : (1) le système immunitaire stimulé par l'expression protéique après injection d'ADN ne risque-t-il pas d'attaquer la cellule responsable de ce stimulus ? La probabilité d'observer de tels effets secondaires semble faible pour la cellule musculaire, car elle est potentiellement peu favorisée en défenses immunitaires ; (2) actuellement, il est difficile de définir quel type de cellule serait capable d'induire, après expression du

RÉFÉRENCES

53. Choo QL, Kuo G, Ralston R, *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 1294-8.
54. Emerson SU, Lewis M, Govindarajan S, Shapiro M, Moskal T, Purcell RH. cDNA clone of hepatitis-A virus encoding a virulent virus. Induction of viral hepatitis by direct nucleic acid transfection of marmosets. *J Virol* 1992 ; 66 : 6649-54.
55. Wolff JA, Malone RW, Williams P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990 ; 247 : 1465-8.
56. Ulmer JB, Donnelly N, Parker SE, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993 ; 262 : 1745-9.
57. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 1847-51.
58. Xiong C, Levis R, Shen P, Schlesinger S, Rice C, Huang HV. Sindbis virus : an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 1989 ; 243 : 1188-91.
59. Liljestrom P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio Technology* 1991 ; 9 : 1356-61.
60. Girard M, Martin A, van der Werf S. Potential use of poliovirus as a vector. *Biologicals* 1994 ; 21 : 371-7.
61. Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, Lai CJ. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J Virol* 1993 ; 67 : 6567-75.
62. Bray M, Lai CJ. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10342-6.
63. Pletnev AG, Bray M, Huggins J, Lai CJ. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type-4 viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 10532-6.
64. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *The New Biologist* 1989 ; 1 : 285-96.
65. Lai CJ, Zhao B, Hori H, Bray M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5139-43.
66. Moormann RJM, van Gennip HGP, Miedema GKW, Hulst MM, van Rijn PA. Infectious RNA transcribed from a full-length DNA copy of the genome of the C-strain, a classical swine fever vaccine strain. 2nd International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses, San Diego (abstr), 1994.
- plasmide injecté, une réponse immunitaire humorale et cellulaire, propriétés idéales pour un vaccin. L'expression continue du gène étranger dans la cellule, associée à la réponse immunitaire qu'il a induite, pourrait entraîner, au bout d'un certain temps, une dérégulation du système immun. De plus, il est à craindre que l'introduction dans la cellule d'une molécule d'ADN étranger, et son amplification, favorisent une intégration de cet ADN dans le génome cellulaire, aboutissant à un processus d'oncogénèse. Il faut attendre les prochaines années pour que la validité de cette technique soit établie.

Virus recombinants

Une autre stratégie déjà éprouvée dans de nombreux domaines de la virologie semble parfaitement adaptable au VHC : il s'agit de l'utilisation de virus recombinants. Bien que d'évaluation plus laborieuse que la méthode précédente en matière de vaccinologie, elle peut, en outre, être un outil d'étude des mécanismes immunitaires du VHC. La construction de tels virus consiste à insérer une séquence du virus à étudier dans un vecteur viral, ou à remplacer une séquence du vecteur par celle du virus à étudier.

Le choix du vecteur. Les virus animaux à ARN présentent les caractéristiques requises pour tout vecteur en vue de l'élaboration d'un vaccin recombinant : (1) leur génome, constitué d'ARN, ne peut s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte, (2) il n'est pas soumis à une transcription inverse, et (3) le cycle viral est cytoplasmique. De nombreux exemples d'utilisation de vecteurs viraux à ARN sont décrits dans la littérature, avec un avantage pour les virus à ARN positif : celui d'initier un cycle infectieux dans la cellule susceptible, immédiatement après introduction de l'ARN viral nu par transfection. Les alphavirus, le virus Sindbis [58] et le virus de la forêt de Semliki [59] sont d'autant plus appréciés qu'ils possèdent un spectre d'hôte très large, donnent des stocks viraux de titre élevé, et ont de très bons niveaux d'expression. Parmi les virus à ARN dépourvus d'ARN sous-génomique, les picornavirus ont été parmi les premiers vecteurs utilisés du fait de la facilité de manipulation

de leur génome (d'environ 7,5 kb), et font encore l'objet de nombreuses investigations utilisant des systèmes d'expression homologues et hétérologues [60]. Les premiers résultats obtenus pour le virus de la dengue type 4 (DEN4) à l'aide de constructions chimériques intratypiques [61], intertypiques [62], et avec d'autres membres du même genre [63], font des flavivirus d'éventuels candidats comme vecteurs. En effet, la possibilité de remplacer tout ou partie des protéines de structure de DEN4 par les protéines correspondantes du virus de l'encéphalite à tique a été démontrée par l'obtention de virus hybrides viables, présentant les propriétés immunogéniques des protéines étrangères [63].

Les bases de la construction d'un virus hybride. L'idéal serait de disposer d'un système exprimant les protéines structurales du VHC dans une configuration la plus proche de leur état natif. Cela pourrait être obtenu via un virus recombinant dont la fonction de vecteur reviendrait à un virus très proche du VHC. Il est indiqué de choisir un virus appartenant aux *flaviviridae*, tout en ayant conscience du problème posé par la stabilité de tels génomes infectieux. Le choix est limité aux flavivirus dont actuellement deux types d'ADNc infectieux sont répertoriés : celui de la souche vaccinale 17D du virus de la fièvre jaune [64] et celui du virus de la dengue type 4 [65]. L'utilisation d'un pestivirus, autre genre très proche de celui du VHC, est maintenant possible du fait de l'obtention récente de l'ADNc infectieux de la souche vaccinale du virus de la peste porcine, anciennement appelé virus de Hog Cholera [66]. La stratégie d'une telle approche consisterait donc à remplacer les protéines de structure du vecteur par celles du VHC, dans le but d'obtenir une particule virale possédant les caractéristiques structurales du VHC, mais utilisant la machinerie régulatrice et fonctionnelle du vecteur flavivirus, pour assurer sa multiplication (Cahour et Wychowski, projet en cours). Cette approche paraît relativement simple de conception et de réalisation : (1) construction des plasmides recombinants, (2) transcription *in vitro* de l'ADNc correspondant au virus hybride, et (3) transfection de cellules sensibles

avec l'ARN obtenu. Cependant, le résultat final, c'est-à-dire la viabilité de la particule virale hybride, semble soumis à de nombreuses incertitudes (séquences réelles à échanger, signaux divers à respecter...), dépendant de contraintes encore mal définies (reconnaissance des sites de clivage de la polyprotéine virale hybride, interaction protéines du vecteur et protéines étrangères, interaction avec des facteurs cellulaires...). Toutefois, la viabilité d'une telle particule virale en ferait un excellent outil d'étude des propriétés immunologiques du VHC, et peut-être, à plus long terme, une ébauche de vaccin.

Conclusion :
***L'hypervariabilité
antigénique du VHC
pose un problème difficile***

En espérant qu'une des différentes approches vaccinales précédemment exposées se révèle exploitable dans un prochain avenir, une question subsiste devant l'étonnante variabilité du virus : comment un vaccin produit contre une souche protégerait-il contre toutes les autres souches ? Actuellement nous n'avons aucune idée du nombre de sérotypes de VHC, et encore moins de leur distribution parmi les différents génotypes. Le VHC serait-il à rapprocher du VIH, pour lequel dix sous-types sont actuellement dénombrés, mais avec un sérotype commun, puisque certains sérums semblent capables de neutraliser des souches de virus appartenant à chaque sous-type ? Aucune réponse n'est attendue sans un bon système d'étude de la neutralisation du VHC. ■

Summary

The perspectives of hepatitis C vaccine : which strategy to adopt ?

A high incidence of community-acquired hepatitis C virus infection that can lead to the progressive development of chronic active hepatitis, liver cirrhosis, and primary hepatocarcinoma occurs throughout the world. Even if the important advances in the development of clinical diagnostic tests have improved the safety of blood transfusion, 50% of carriers result from an unknown mode of transmission, and a vaccine is needed to control and eliminate HCV. In spite of the progress in molecular biology of HCV, the biological characteristics of the virus remain obscure. Basic studies for a detailed understanding of HCV morphogenesis and pathogenesis are impeded by the fact that HCV does not replicate appreciably in cell culture systems, and that the only well-defined animal model is the chimpanzee. Another important feature relates to the observed heterogeneity of HCV : at least six genotypes have now been distinguished from phylogenetic analyses. Given this variability, it is very likely that a multivalent vaccine will be required for global protection. Though recent results on virus neutralization, and vaccination of chimpanzees, offer substantial encouragement and optimism for vaccine design, further advances in the field of immunological properties of the HCV are awaited.

Remerciements

L'auteur tient à remercier le Pr Marc Girard, les Drs Czeslaw Wychowski, Bruno Blondel et Marie Flamand, pour leurs critiques et suggestions apportées au cours de la rédaction de ce manuscrit. Il assure le Dr Françoise Lunel Fabiani de sa profonde reconnaissance pour lui avoir communiqué les données épidémiologiques les plus récentes. Le projet concernant les virus recombinants bénéficie du soutien financier de l'ARC (Association de la recherche contre le cancer) : contrat N° 1036.

TIRÉS À PART

A. Cahour.

m/s n° 1, vol. 11, janvier 95