

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2025-2026

N° 119

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par Hanane Bahnes

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2025

Bioproductions et optimisation des vaccins contre l'hépatite B et C

JURY

PRESIDENTE : Mme DEBIERRE-GROCKIEGO Françoise, Maître de conférences-HDR, co-directrice de thèse – Faculté de Pharmacie, Tours

MEMBRES :

Mr POUPET Cyril, Maître de conférences, co-directeur de thèse – Faculté de Pharmacie, Tours

Mme BRAIBANT Martine, Professeur – Faculté de Pharmacie, Tours

Mme NBOUZID Naïma, Pharmacien d'officine, Dreux

Mme HAFID Asmâa, Pharmacien d'officine, Vendôme

ANNEE : 2025 - 2026

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Amélie FOUCAULT, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN, Mme GERMON Stéphanie

ENSEIGNANTS

18 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DIMIER-POISSON	Isabelle	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	IMMUNOLOGIE

31 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE & TOXICOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

Mise à jour – octobre 2025

GERMON	Stéphanie	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
LAJOIE	Laurie	IMMUNOLOGIE
LANNOY	Damien	GALENIQUE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	<i>Filière Officine</i>
---------------	----------	-------------------------

1 EAST

CHOTTIN	Emilie	<i>Pharmacologie</i>
SENECHAL	Olivier	<i>Pharmacologie</i>

5 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE
POUPIN	Pierre	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
VEYRAT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

2 ATER

DUSSART	Romain	CHIMIE ANALYTIQUE
PIATELLI	Emma	MICROBIOLOGIE - BACTERIOLOGIE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

THIERNEY	Mégane	ANGLAIS
----------	--------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD
MEVELEC
MOIRE

Mathieu	INRAE
Marie-Noëlle	INRAE
Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 16/12/2025

L'étudiant
Hanane Bahnes

Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du corps professoral pour l'accompagnement et le soutien qu'il m'a offerts tout au long de ces années d'études.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Mme Françoise Debierre-Grockiego et M. Cyril Poupet, pour leur accompagnement et leurs précieux conseils tout au long de la rédaction de ce travail. J'adresse également mes remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en participant à la soutenance de cette thèse.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à toute l'équipe du laboratoire MAVIVHe pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé, et plus particulièrement à Lorena Tome-Poderti, qui m'a accompagnée durant mon stage puis soutenue dans la rédaction de cette thèse.

Je remercie aussi mes amies, avec qui j'ai partagé de très belles années d'études. Leur présence et leur amitié ont contribué à rendre ces années sur les bancs de la faculté inoubliables.

Enfin, j'adresse un immense merci à mes parents pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis afin de me permettre d'atteindre ce niveau d'études, ainsi qu'à mes frères et sœurs pour leur précieux soutien émotionnel tout au long de ce parcours.

Table des matières

I. INTRODUCTION	13
1. Épidémiologie	13
2. Virus de l'hépatite B.....	14
3. Virus de l'hépatite C.....	15
II. Généralités	15
1. Structure des particules virales	15
2. Diversité génomique	18
Partie 1 : perspectives vaccinales	20
I. Les thérapeutiques actuelles	20
II. Concepts vaccinaux développés à l'international.....	23
III. Principe de la bioproduction du vaccin recombinant	25
IV. Application en officine.....	26
V. Stratégie vaccinale proposée par l'Unité 1259 MAVIVHe.....	27
Partie 2 : Travail de recherche mené au sein du laboratoire MAVIVHe sur le vaccin bivalent hépatite B et hépatite C.....	31
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES	31
1. Production des particules vaccinales d'intérêt en lignées CHO et S2.....	31
2. Caractérisation des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2	32
2.1 Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S par Western Blot.....	32
2.2. Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S, ainsi que de leur mise en conformation par ELISA.....	33
2.3 Observation des particules vaccinales au microscope électronique à transmission	35
2.4. Étude du profil de glycosylation des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2.....	36
a. Analyse par western blot en conditions dénaturantes après traitements par des glycosidases.....	36
b. Analyse qualitative de la glycosylation des protéines S et S+E2-S par lectine-blot	38
c. Analyse de la composition glycosidique des protéines S et S+E2-S par lectine-ELISA.....	40
II. RESULTATS de recherche obtenus au sein du laboratoire MAVIVHe	42
1. Production des particules vaccinales S et S+E2-S en cellules de drosophile S2	42
2. Caractérisation des particules vaccinales S et S+E2-2 générées en lignées S2 et CHO	43
2.1. Évaluation de l'incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S par Western Blot	43
2.2 Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S, ainsi que de leur mise en conformation par ELISA.....	44

2.3. Observation des particules vaccinales au microscope électronique à transmission et évaluation de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines S et E2-S à leur surface	48
2.4. Étude du profil de glycosylation des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2.....	50
a. Analyse par western blot en conditions dénaturantes après traitements par des glycosidases.....	50
b. Identification des N-glycanes par des techniques de Lectine-Blot et Lectine-ELISA	52
III. DISCUSSION.....	56

Liste des abréviations

ARN : Acide Ribonucléique

ApoB : Apolipoprotéine B

ApoE : Apolipoprotéine E

Asn : Asparagine

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BSA : Albumine de Sérum Bovin (*Bovine Serum Albumin*)

CHO : *Chinese Hamster Ovary (cells)*

DAAs : Traitements antiviraux directs (*Direct Acting Antivirals*)

DTM : Domaine Transmembranaire

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EndoH : Endo- β -N- acetylglucosaminidase H

Gal β 1,4GlcNAc : N-acétyllactosamine

GalNAc : N-acétylgalactosamine

GlcNAc : N-acétylgalactglucosamine

HBsAg : Antigène de surface du virus de l'hépatite B

HRP : Peroxydase de Raifort (*Horseradish peroxidase*)

LDL : Lipoprotéine de faible densité (*Low Density Lipoprotein*)

LVP : Lipo-Viro-Particule

MAVIVHe : Morhogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites et émergents

MET : Microscopie électronique à transmission

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PVDF : Polyfluorure de Vinylidène (*PolyVinyliDene Fluoride*)

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

RE : Réticulum Endoplasmique

Ser : Sérine

SR-B1 : *Scavenger Receptor class B type 1*

TBS : *Tris-Buffered Saline*

Thr : Thréonine

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité (*Very Low Density Lipoprotein*)

VLP: *Virus-Like Particle*

Liste des Figures

Figure 1. Carte épidémiologique de la répartition des hépatites B et C dans le monde	14
Figure 2. Représentation schématique du virus de l'hépatite B.	16
Figure 3. Représentation schématique et visualisation au microscope électronique de la lipoviro-particule	18
Figure 4. Organisation génomique et protéique du VHC	20
Figure 5. Distribution géographique de la prévalence de l'hépatite B en 2019	27
Figure 6. Principe du vaccin bivalent contre les virus des hépatites B et C	29
Figure 7. Analyse par Western blot de l'incorporation des protéines S et E2-S dans les particules vaccinales générées en cellules CHO et S2.....	33
Figure 8. Principe de l'ELISA ayant permis l'étude de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines d'intérêt S et E2_S en surface des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2	34
Figure 9. Principe de la technique d'immunocapture, accompagnée d'immunomarquages, mise en œuvre pour observer par microscopie électronique à transmission les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2	36
Figure 10. Mode d'action de la peptide-N-glycosidase F (PNGase F) et l'endo-β-N-acétylglucosaminidase H (endo H)	37
Figure 11. Analyse par une technique de lectine-blot de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2	38
Figure 12.. Analyse par une technique de lectine-ELISA de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2.	41
Figure 13. Étude par western blot de l'incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S dans les particules vaccinales issues de cellules de mammifères (CHO) ou de drosophiles (S2).....	44
Figure 14. Étude par ELISA de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines d'intérêt S et E2-S en surface de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2.	46
Figure 15. Étude par ELISA de l'incorporation et de la mise en confirmation des protéines d'intérêt Sur et E2-S en surface de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2.	47
Figure 16. Observation au microscope électronique à transmission des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, et évaluation de l'incorporation et de la mise en conformation des immunogènes d'intérêt S et E2-S à leur surface	49

Figure 17. Analyse par western blot en conditions dénaturantes de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2, plus ou moins traitées par des glycosidases	51
Figure 18. Analyse par lectine-blot de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2 (Figures A – J).	3
Figure 19. Analyse par lectine-ELISA de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2 (Figures A – H).	55

Liste des tableaux

Tableau 1. Spécificités des lectines utilisées pour conduire les techniques de lectine-blot et lectine-ELISA	40
--	----

I. Introduction

1. Épidémiologie

Selon le rapport de 2024 de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) consacré à l'hépatite dans le monde (*Global hepatitis report, 2024*), le nombre de décès imputables à l'hépatite virale est en augmentation. Cette maladie est la deuxième cause de mortalité due à une maladie infectieuse dans le monde, avec 1,3 million de décès par an (1,5 million pour la tuberculose). Nous sommes passés de 1,1 million de décès en 2019 à 1,3 million en 2022 : 83% pour l'hépatite B et 17% pour l'hépatite C. À l'échelle mondiale 254 millions de personnes (**Figure 1**) vivent avec une infection chronique par le VHB contre 50 millions par le VHC. Le virus de l'hépatite B est responsable de 1,5 million de nouvelles infections et celui de l'hépatite C de près d'un million (OMS, 2024) et ce, en dépit de l'existence de traitements antiviraux directs (DAA) hautement efficaces. L'hépatite touche préférentiellement les utilisateurs de drogues injectables avec une transmission du virus par le partage de seringue souillée. Malgré l'amélioration des outils de diagnostic, les taux de dépistage n'évoluent pas. L'objectif de l'OMS est d'éradiquer la pathologie d'ici 2030 (OMS, 2024), mais même s'il existe des médicaments génériques contre l'hépatite virale financièrement plus abordables, de nombreux pays ne parviennent pas à les acheter à prix bas. Le nombre de patients infectés traités n'augmente donc pas. Les hépatites B et C sont associées à des formes chroniques à l'origine de cirrhoses et de cancers du foie, les hépatites A, D et E sont quant à elles responsables d'infections aiguës ce qui fait des hépatites B et C un réel enjeu de santé publique.

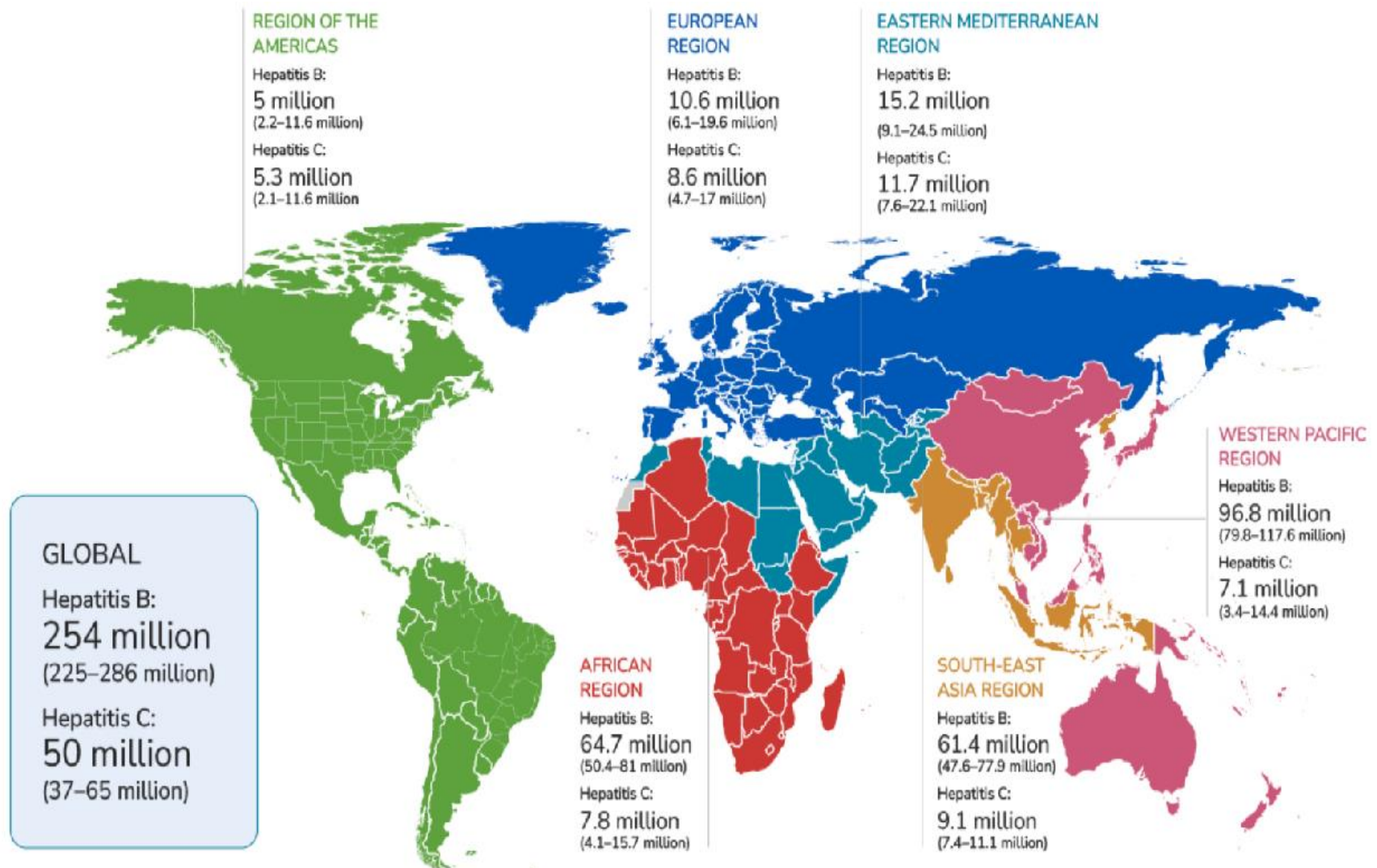


Figure 1. Carte épidémiologique de la répartition des hépatites B et C dans le monde (OMS, 2024)

2. Virus de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B (VHB) initialement appelé « antigène Australien », a été découvert en 1967 par Baruch Blumberg, récompensé pour sa découverte par le prix Nobel de médecine au cours de la même année (Blumberg, 1977). Le VHB fait partie de la famille des *Hepadnaviridae* et du genre *Orthohepadnavirus*. C'est un virus hépatotrope, qui infecte le foie, la pathologie en résultant est l'hépatite B, responsable d'inflammations aiguës hépatiques pouvant être asymptomatique ou se manifester par des symptômes modérés. Cette pathologie peut également devenir chronique, entraînant des complications graves touchant environ 5 à 10% des adultes infectés, favorisant ainsi des dommages hépatiques à long terme (Kim, 2018) comme la cirrhose ou le cancer du foie (hépatocarcinome). La transmission du virus se fait principalement par contact avec des liquides biologiques, notamment le sang, mais aussi par voie sexuelle ou encore de la mère à l'enfant lors de l'accouchement. Bien que le virus puisse être efficacement maîtrisé par un vaccin mis au point dans les années 1980, (Maupas et al, 1976) il reste un problème de santé publique majeur dans certaines régions du monde, notamment en Afrique subsaharienne et en Asie de l'Est (OMS, 2024).

3. Virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C (VHC) a quant à lui été identifié en 1989 par Houghton et ses collaborateurs (Choo *et al.*, 1989). Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, ainsi qu'au genre *Hepacivirus*. Il s'agit également d'un virus hépatotrope, et la pathologie en résultant, l'hépatite C, correspond à une inflammation de ce dernier. La phase aiguë étant le plus souvent asymptomatique, de nombreux patients ne sont pas diagnostiqués à temps et par conséquent non traités avant l'installation de la chronicité de la pathologie, entraînant des lésions hépatiques irréversibles et incurables par les traitements existants (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2024). Cela concerne 75-80% des cas avec une évolution vers des hépatopathies de formes graves, et notamment vers un hépatocarcinome comme pour l'hépatite B. La transmission de ce virus se fait essentiellement par voie sanguine, à la suite d'une mise en contact entre le sang de l'hôte et celui d'une personne infectée par le virus. De nos jours, la principale cause de transmission est la pratique d'injections par voie intraveineuse avec une aiguille souillée par le virus, notamment observée chez les toxicomanes. La transmission par transfusion sanguine a quant à elle largement été freinée par le dépistage sérologique réalisé chez les donneurs de sang. La transmission sexuelle a quant à elle été freinée par l'utilisation de préservatifs.

II. Généralités

1. Structure des particules virales

Le VHB est un virus à ADN partiellement double brin, enveloppé et de forme sphérique (**Figure 2**). Il possède un génome d'environ 3,2 kb. La capside du VHB est constituée d'une protéine principale appelée protéine Core à l'origine d'une nucléocapside englobant le génome viral associé à une polymérase virale (Pol). La capside est entourée d'une enveloppe lipidique constituée de 3 antigènes de surface HBsAg S (petite), M (moyenne) et L (large) (Tsukuda et Watashi, 2020). Ces protéines sont des cibles de la réponse immunitaire et sont essentielles pour la formulation du vaccin contre l'hépatite B (Hou *et al.*, 2003). Une caractéristique du virus est la capacité de son enveloppe à s'auto-assembler en particules vides et donc non infectieuses. On retrouve notamment dans le sang des patients infectés trois types de particules virales. Le virion infectieux, particule Dane, dont le diamètre est de 42 nm (Tsukuda, Watashi,

2020) composé des antigènes HBs intégrés dans une enveloppe lipidique enveloppant la nucléocapside virale et donc le matériel génétique. On retrouve également 2 autres particules sous-virales (22-24 nm) de formes filamenteuses et sphériques toutes 2 comprenant les antigènes HBs intégrés dans une membrane lipidique mais cette fois-ci dépourvues d'ADN viral. Les particules sous-virales dépourvues de matériel génétique sont les plus nombreuses dans le sérum de patients infectés (1000 à 100000 fois plus nombreuses que les virions infectieux) et jouent un rôle immunomodulateur et immuno-inhibiteur en se fixant aux anticorps anti-HBs permettant ainsi de protéger les virions infectieux de la neutralisation par ces anticorps.

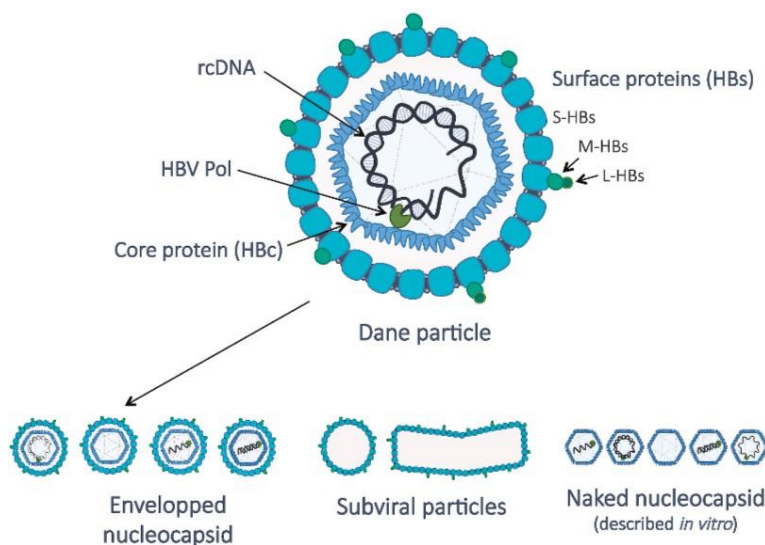


Figure 2. Représentation schématique du virus de l'hépatite B. Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN partiellement double brin sous forme de particule sphérique enveloppée d'environ 42 nm de diamètre. Sa nucléocapside renferme le génome viral et est entourée d'une enveloppe virale dérivée du réticulum endoplasmique constituée de protéines de surface (HBsAg) S (petite), M (moyenne) ou L (large) (Tsukuda, Watashi, 2020)

Le VHC est un virus enveloppé présentant un génome à ARN simple brin de polarité positive (environ 9,6 kb) et une capside (**Figure 3**). La nucléocapside contenant le génome viral, est entourée d'une enveloppe lipidique dérivée par bourgeonnement des membranes du réticulum endoplasmique (RE). Puisque le VHC interagit avec le métabolisme lipidique des hépatocytes et s'associe à de nombreux composants lipidiques au cours de son cycle infectieux, il circule dans le sang des patients infectés sous forme de lipo-viro-particules (LVP) d'un diamètre de 70 à 130 nm (André et *al.*, 2002 ; Piver et *al.*, 2017). Ces virions circulants présentent effectivement un important croissant lipidique, c'est-à-dire un amas lipidique issu des cellules

hépatocytaires dans lesquelles se déroule la réplication virale. Ce croissant lipidique résulte de l'association des particules sous-virales aux lipoprotéines de très faible (VLDL) ou de faible densité (LDL), hébergeant notamment les apolipoprotéines B (ApoB) et E (ApoE). Les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sont quant à elles ancrées dans l'enveloppe lipidique et exposées en surface virale sous forme de gros complexes covalents stabilisés par des liaisons disulfures majoritairement intra-chaîne (Vieyres *et al.*, 2010). Ces protéines d'enveloppe sont deux protéines distinctes codées séparément dans le génome du VHC bien qu'elles fonctionnent comme un complexe non covalent à la surface du virion. Elles présentent un important ectodomaine amino-terminal et un unique domaine transmembranaire (DTM) chacune, et se caractérisent par une forte N-glycosylation (**Figure 3**). Les protéines d'enveloppe E1 et E2 présentent respectivement 4 et 11 sites de N-glycosylation au niveau de leur ectodomaine, ce qui représente un tiers de la masse moléculaire du complexe E1/E2 et couvre environ 50% de la surface de E2 (Meunier *et al.*, 1999 ; Goffard & Dubuisson, 2003). Les protéines E1 et E2 sont des cibles potentielles et privilégiées des anticorps neutralisants (Giang *et al.*, 2012) et constituent de très bons immunogènes pour le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC. La fidèle reproduction de ces complexes antigéniques clés constitue toutefois un véritable challenge.

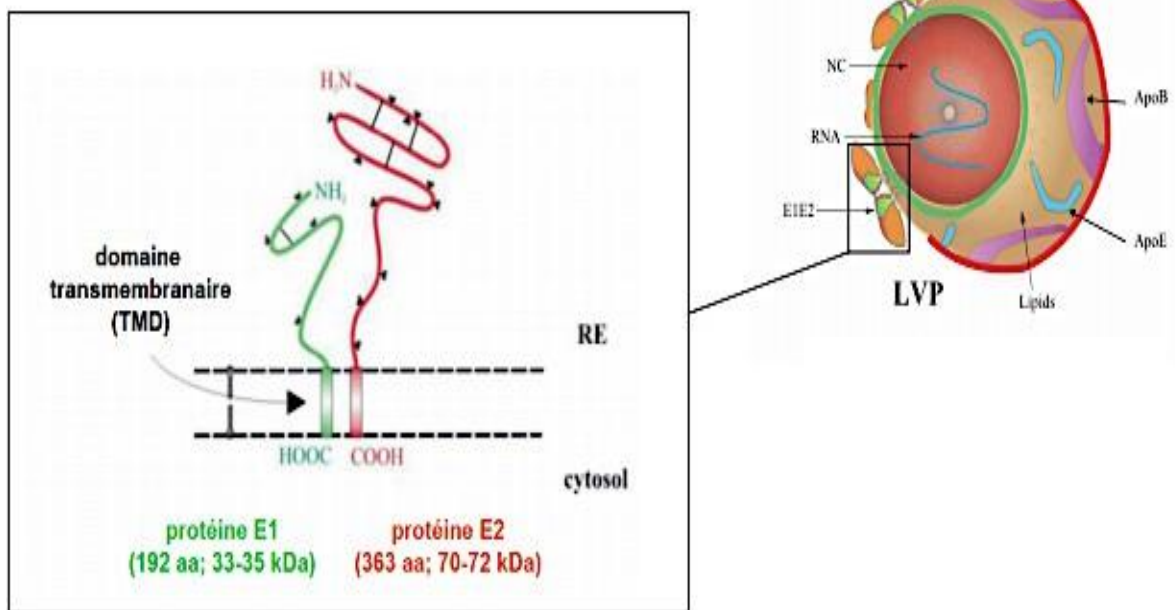


Figure 3. Représentation schématique et visualisation au microscope électronique de la lipo-viro-particule. Le VHC est un virus à ARN monocaténaire linéaire de polarité positive, qui se présente sous la forme d'une lipo-viro-particule (LVP) de 70 à 130 nm de diamètre. Sa nucléocapside renferme le génome viral et est entourée d'une enveloppe dérivée du réticulum endoplasmique, dans laquelle sont ancrées les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, mais aussi d'un important croissant lipidique hébergeant notamment les apolipoprotéines B et E (d'après Piver et al., 2017). **Encadré - Représentation schématique de la topologie des glycoprotéines E1 et E2.** Ces protéines sont synthétisées, puis ancrées dans la membrane du RE via leur domaine transmembranaire (DTM), avant d'être incorporées sous la forme de gros complexes en surface de la LVP. Les sites de N-glycosylation ont été indiqués par des triangles noirs (adaptée de Op de Beeck et al., 2001).

2. Diversité génomique

Le génome du virus de l'hépatite B (VHB) est constitué d'un ADN partiellement double brin comprenant 4 cadres ouverts de lecture qui se chevauchent et circulent sous forme de particules virales relativement complexes (Diana Asema Asandem et al., 2024). Le cadre de lecture S code pour les 3 protéines d'enveloppe (HBsAg) S, M et L. Le cadre de lecture C code pour la protéine de capsid (HBc) et la protéine HBe, le cadre de lecture X code pour la protéine X qui régule l'expression des gènes viraux et cellulaires favorisant la réplication du VHB et l'évasion immunitaire et enfin le cadre de lecture P code pour l'ADN polymérase (Pol), toutes ces protéines jouant un rôle central dans la réplication et la formation de la particule virale. Une particularité du VHB est sa capacité à former des particules virales de différentes tailles comme cité précédemment (Tu et al., 2017).

La variabilité génétique du VHB est élevée, mais résulte d'un mécanisme différent de celui du VHC comme nous allons le voir ci-après. Puisque le virus utilise une polymérase vir

Qui, bien qu'elle soit plus précise que l'ARN polymérase du VHC, ne corrige pas systématiquement les erreurs avec un taux de mutation s'élevant à 2×10^{-5} substitutions de nucléotides par site et par an (Diana Asema Asandem *et al.*, 2024). Cette variabilité génétique donne naissance à différents sous-types de VHB, associée à l'émergence de mutants résistants, en particulier sous l'action des analogues nucléosidiques, traitement de première intention du VHB, constituant un enjeu clinique majeur (Hou *et al.*, 2003). Nous pourrions ainsi penser qu'un taux aussi élevé de mutations pourrait être préjudiciable à la survie du virus, cependant le VHB arrive tout de même à maintenir sa compétence de réplication et de survie malgré le réarrangement génomique (Diana Asema Asandem *et al.*, 2024). Cette diversité est à l'origine de quatre sérotypes (adr, adw, ayr et ayw) et 8 génotypes principaux (A-H).

En comparaison, le génome du virus de l'hépatite C comprend un unique cadre ouvert de lecture qui code une polyprotéine (Roger *et al.*, 2021). Suite à de multiples clivages protéolytiques par des protéases virales et cellulaires, cette polyprotéine est à l'origine de l'ensemble des protéines virales intervenant dans la réplication, la morphogenèse et la pathogenèse virale : les protéines structurales (Core, E1 et E2) et les protéines non-structurales (p7, NS2, NS3-4A, NS4B, NS5A et NS5B) (**Figure 4**). Ce génome présente une grande diversité génétique qui se caractérise par un taux important de mutations spontanées ou encore par des phénomènes de recombinaisons génétiques, engendrés par les pressions de sélection exercées par le système immunitaire ou les thérapeutiques. Cette diversité provoque l'apparition de nombreux variants génétiquement très proches (notion de quasi-espèce), classés en huit génotypes différents et en de multiples sous-types (Smith *et al.*, 2014 ; Borgia *et al.*, 2018). Cette variabilité génétique est notamment due à l'ARN polymérase qui est dépourvue d'activité 3'-5' exonucléase de correction, et qui commet des erreurs à hauteur de 10^{-4} à 10^{-5} mutations par nucléotide (Pawlotsky, 2002). Ce phénomène d'accumulation de mutations est accentué par le fort taux de réplication de l'ARN viral associé à des recombinaisons intra- et inter-génotypiques. Le virus de l'hépatite C peut ainsi développer une résistance aux thérapeutiques et surtout échapper au système immunitaire. Cette importante diversité génétique constitue également un défi majeur pour le développement d'un candidat vaccin.

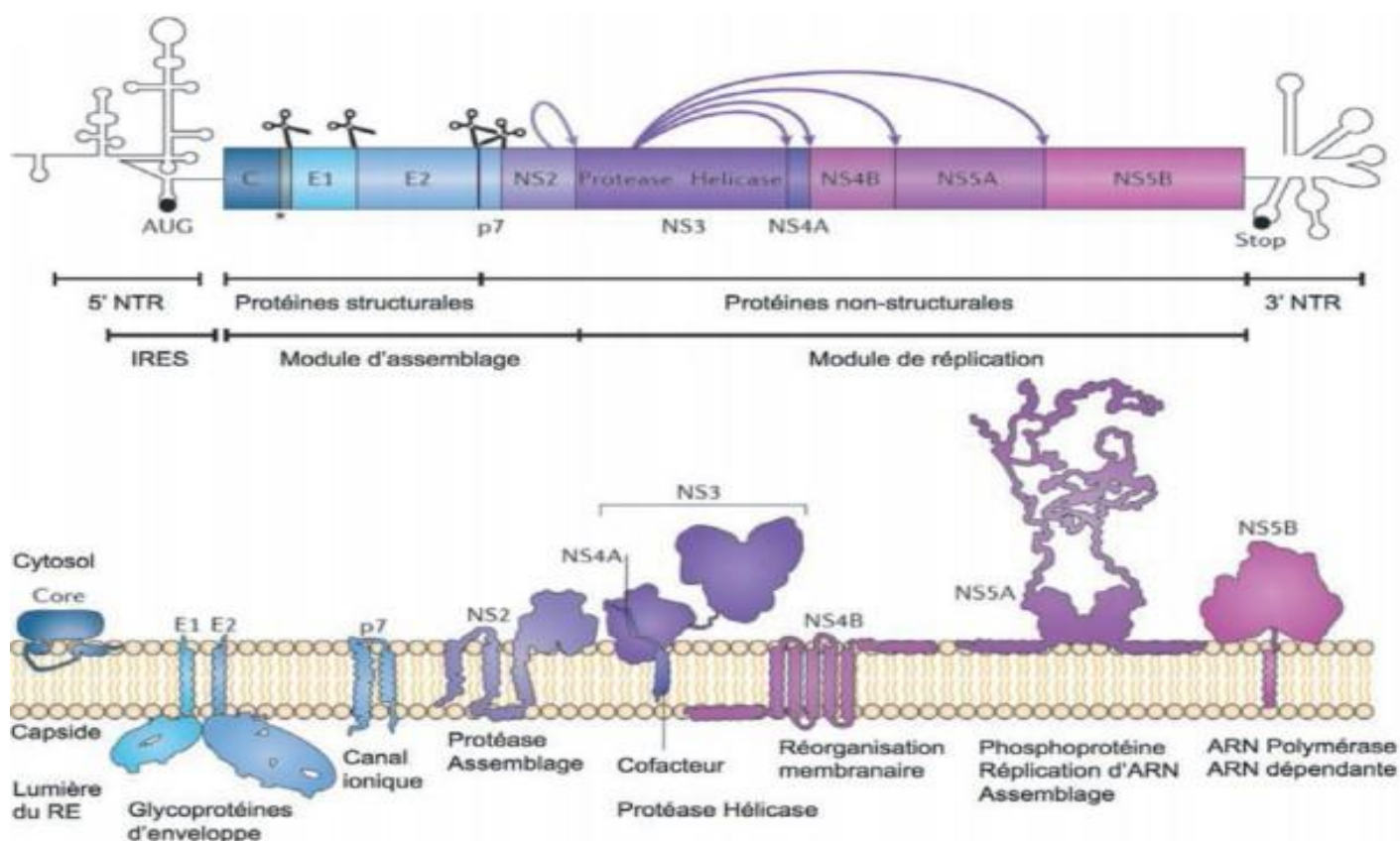


Figure 4. Organisation génomique et protéique du VHC. Le génome du VHC se présente sous la forme d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive de 9,6 kb, encadré par deux régions non codantes (5'NTR et 3'NTR) indispensables à la traduction et la réplication virale. Il possède un unique cadre ouvert de lecture codant une poly-protéine précurseur dont la maturation par une succession de clivages protéolytiques conduit à la naissance des protéines structurales (capside, E1 et E2) et non- structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (adaptée de Bartenschlager et al., 2013)

Partie 1 : perspectives vaccinales

I. Les thérapeutiques actuelles

Les thérapeutiques actuelles contre l'hépatite B se concentrent principalement sur la gestion de l'infection chronique, visant à inhiber la réplication virale et à prévenir les complications graves telles que la cirrhose et le cancer du foie. Les médicaments antiviraux utilisés sont généralement des agents inhibiteurs de la polymérase virale, qui agissent en réduisant la charge virale conduisant à l'amélioration de l'état hépatique du patient. Les deux classes principales de traitements sont les analogues nucléosidiques/nucléotidiques et les immunomodulateurs.

Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques, tels que la lamivudine, l'entécavir, le téleprevir et le tenofovir, sont les médicaments de première intention. Ces molécules agissent en inhibant la polymérase virale, empêchant ainsi la réplication de l'ADN du virus. Le tenofovir et l'entécavir sont considérés comme les traitements les plus puissants et les plus sûrs, avec une très faible probabilité de résistance en raison de leur capacité à inhiber efficacement la réplication virale. Ces médicaments sont généralement administrés à long terme, bien qu'un traitement à vie ne soit pas nécessaire pour tous les patients. Cependant, bien qu'efficaces pour réduire la charge virale, ces traitements ne permettent pas d'éradiquer complètement le virus, car le VHB peut persister sous forme de "réservoir" (ADNccc, pour *covalently closed circular*) dans le noyau des hépatocytes, notamment sous forme d'ADN bicaténaire circulaire super-enroulé, très stable qui va servir de modèle pour la transcription, il peut rester à vie dans les hépatocytes même après traitement. En effet, si le traitement est arrêté l'ADNccc peut reproduire de nouveaux virions. En complément des antiviraux, des immunomodulateurs tels que l'interféron alpha peuvent être utilisés dans certains cas. Bien que son efficacité soit variable, l'interféron est particulièrement recommandé pour les patients ayant une infection active avec un faible niveau d'ADN du VHB dans le sang. Il stimule le système immunitaire pour qu'il combatte le virus plus efficacement, mais les effets secondaires, tels que des symptômes pseudo-grippaux, de la dépression, et des troubles sanguins (anémie, neutropénie, pancytopenie, etc) limitent souvent son utilisation à des périodes définies et à des patients soigneusement sélectionnés dû à l'imprévisibilité de la réponse virologique. De plus, l'interféron n'est pas recommandé pour les personnes atteintes de cirrhose décompensée, en raison du risque d'aggravation de l'état hépatique du patient jusqu'au décès possible des patients fragiles. Un autre domaine de recherche prometteur est le développement de thérapies combinées visant à stimuler la réponse immunitaire tout en bloquant la réplication virale. Des recherches sont en cours sur des médicaments capables de réactiver la réponse immunitaire antivirale, en particulier en ciblant les inhibiteurs de PD-1 et PD-L1 (Tzeng, Horn-Tay *et al*, 2012). Ces protéines sont surexprimées dans l'hépatite B chronique, le virus engendre la surexpression de PD-1 sur les lymphocytes T et de PD-L1 à la surface des hépatocytes dû à l'inflammation chronique. Ce phénomène va conduire à l'épuisement du système immunitaire, ainsi PD-1 à la surface des lymphocytes va se fixer sur PD-L1 à la surface des hépatocytes ce qui va inactiver les lymphocytes T. Le virus va ainsi pouvoir se répliquer sans être éliminé. Cette approche immunothérapeutique pourrait potentiellement conduire à l'éradication du réservoir viral, un objectif ultime du traitement de l'hépatite B.

La vaccination préventive reste la méthode la plus efficace pour contrôler l'hépatite B dans les populations non infectées. Le vaccin contre l'hépatite B, qui consiste en une seule pro-

téine de surface du virus (HBsAg) avec un taux de protection allant de 93 à 100% (Adkins, J C et A J Wagstaff, 1998), est largement utilisé dans le monde entier pour prévenir l'infection. Bien que les vaccins actuels ne soient pas utilisés dans le traitement des infections chroniques, la prévention reste un élément clé des stratégies mondiales pour éradiquer l'hépatite B.

Pour les patients infectés par le VHC, il existe aujourd'hui des traitements antiviraux à action directe sur le virus, ciblant certaines de ses protéines non structurales indispensables à sa réplication (DAAs, pour *Direct-acting antivirals*). Deux options thérapeutiques pangénotypiques sont aujourd'hui recommandées : l'Epclusa® (association sofosbuvir/velpatasvir) et le Maviret® (association glécaprévir/pibrentasvir). Bien que les DAAs soient ultra efficaces et permettent aujourd'hui de contrôler 95% des infections induites par les différents géotypes du VHC, ils ne permettent toutefois pas de lutter contre la transmission du virus et d'éradiquer l'hépatite C (Roingeard & Beaumont, 2020). En effet, les patients atteints par cette pathologie ne sont pour la plupart traités qu'après avoir été diagnostiqués, or l'infection aiguë par le VHC est dans la grande majorité des cas asymptomatique. Compte-tenu de l'absence de campagnes de diagnostic de masse des populations et du coût relativement élevé des traitements, seuls 26% des individus infectés seraient diagnostiqués, parmi lesquels uniquement 62 % d'entre eux seraient traités (soit environ 16% des individus infectés à l'échelle mondiale). En outre, ces DAAs ne protègent pas contre d'éventuelles réinfections ou encore contre le risque de développer un cancer du foie. En effet, les DAAs suppriment la réplication virale mais ne confèrent pas une immunité protectrice vis-à-vis du virus. De plus, comme vu précédemment la découverte de l'infection par le virus se fait souvent à un stade chronique au cours duquel des lésions hépatiques sont déjà présentes et peuvent toujours évoluer vers un carcinome hépatocellulaire. Enfin, la grande diversité du VHC n'arrange pas la situation puisqu'elle se traduit par l'apparition de mutants résistants aux thérapeutiques. Ainsi, en dépit de l'existence de traitements très efficaces, environ 1 million de nouvelles infections surviennent encore chaque année dans le monde et la maladie hépatique liée au VHC continue d'engendrer la mort de milliers de personnes (242000 décès en 2022). Au vu de ces différents éléments, il semble clair que l'objectif de l'OMS d'éradiquer l'hépatite C à l'horizon 2030 sera difficilement atteignable, à moins que

des campagnes de dépistage et de traitement ne soient largement organisées et que des mesures de prévention ne soient proposées à l'échelle mondiale. Dans l'état actuel des choses, le développement d'un vaccin prophylactique sûr, efficace et abordable est devenu une réelle priorité médicale, offrant le meilleur espoir d'éradiquer l'hépatite C, de réduire le risque de cancer associé et de réduire les dépenses de santé liées au traitement de l'hépatite C. Il n'existe pas encore de vaccin prophylactique contre le virus de l'hépatite C dû à la variabilité génétique de ce dernier.

II. Concepts vaccinaux développés à l'international

Le vaccin contre l'hépatite B est l'un des succès les plus remarquables de la médecine préventive, il est basé sur l'antigène de surface du virus (HBsAg) et ses propriétés d'auto-assemblage sous forme de VLP (Pattyn *et al*, 2021). Le vaccin stimule la production d'anticorps neutralisants qui protègent contre l'infection en empêchant le virus de pénétrer dans les cellules hépatiques. Ce vaccin est disponible depuis les années 1980 et a été largement utilisé dans les programmes de vaccination universelle dans de nombreux pays. Il est très efficace, avec un taux de protection de plus de 95 % après trois doses, à 2, 4 et 11 mois. Ce vaccin a contribué à une réduction significative de l'incidence de l'hépatite B et des cancers du foie dans le monde entier (OMS, 2021). Le vaccin est recommandé pour tous les nourrissons, ainsi que pour les adultes à risque élevé d'infection et fait partie du programme de vaccination dans de nombreux pays. Contrairement au VHB, il n'existe actuellement pas de vaccin disponible pour l'hépatite C. Le VHC présente une variabilité génétique élevée, avec huit génotypes et de nombreux sous-types. Cette variabilité génétique est en grande partie responsable de l'évasion du virus au système immunitaire et de la difficulté à développer des vaccins contre le VHC.

Le développement du vaccin contre l'hépatite B a connu une évolution majeure, passant des vaccins dérivés du plasma humain aux vaccins recombinants produits par des systèmes d'expression biotechnologiques. Grâce aux avancées en bioproduction, il est aujourd'hui possible de fabriquer ce vaccin en grande quantité avec un haut niveau de sécurité et d'efficacité. Le premier vaccin contre l'hépatite B, mis au point dans les années 1980, était un vaccin fabriqué à partir de l'antigène de surface du virus (HBsAg) purifié à partir du plasma de porteurs chroniques du VHB (Maupas *et al.*, 1976). Bien que son efficacité ait été démontrée, cette approche soulevait plusieurs préoccupations, notamment un risque de contamination par d'autres

pathogènes malgré des étapes rigoureuses de purification et d'inactivation. Ce type de production est limitée puisque dépendante de la disponibilité du plasma.

Avec l'essor des technologies, les vaccins plasmatiques ont été progressivement remplacés par des vaccins recombinants, produits à partir de cellules hôtes génétiquement modifiées pour exprimer l'antigène HBs. Ces vaccins offrent une meilleure sécurité, une standardisation de la production et une disponibilité accrue.

Plusieurs candidats vaccins contre le virus de l'hépatite C ont fait l'objet de recherches ces dernières années et ont été classés en plusieurs catégories : ceux basés sur les glycoprotéines d'enveloppe E1 et/ou E2 sous différentes formes (avec ou sans le DTM, donc plus ou moins solubles et présentées par le biais de VLPs), inducteurs de réponses humorales (Gomez-Escobar *et al.*, 2023) et ceux basés sur des protéines non structurales du virus et inducteurs de réponses cellulaires. Des résultats très prometteurs ont été obtenus chez le chimpanzé, avec 5 individus vaccinés et 2 individus témoins. Les 5 chimpanzés vaccinés ont été protégés de l'infection par des souches homologues et n'ont donc pas développé de virémie détectable après challenge.

Suite à cela, seuls deux candidats vaccins ont été administrés à l'Homme lors d'essais cliniques de phases I/II.

Un premier candidat vaccin, basé sur l'utilisation de vecteurs viraux (adénoviraux ou dérivés du virus modifié de la vaccine Ankara) exprimant les protéines non-structurales NS3-5B issues d'un VHC de génotype 1b, a fait l'objet d'un essai clinique de phase II. Ce vaccin s'est révélé engendrer une réponse cellulaire multi-épitopique très soutenue chez l'Homme (Barnes *et al.*, 2012 ; Swadling *et al.*, 2014). En effet, plusieurs protéines non structurales sont exprimées et vont ainsi induire différentes réponses cellulaires. Par contre, cette réponse cellulaire ne s'est pas montrée suffisante pour contrer l'évolution de la pathologie vers la chronicité et pour prévenir la survenue de cirrhose et cancer du foie (Page *et al.*, 2021). Cet échec vaccinal est ainsi venu confirmer que la seule induction d'une réponse cellulaire n'était pas suffisante pour protéger contre l'hépatite C et que les anticorps neutralisants jouaient un rôle clé dans la clairance virale (Phelps *et al.*, 2021).

Un second candidat vaccin, basé sur l'utilisation de glycoprotéines d'enveloppe E1/E2 recombinantes (génotype 1a) produites en cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), a également fait l'objet d'un essai clinique de phase I. Ce vaccin a été montré capable d'engendrer une forte

réponse humorale chez l'Homme, neutralisant les principaux génotypes du VHC *in vitro* et évitant une évolution vers la chronicité de l'infection (Law *et al.*, 2013). Par contre, cette stratégie vaccinale rencontre un obstacle majeur qui empêche la poursuite de son développement industriel. En effet, les protéines E1 et E2 présentent l'inconvénient d'être naturellement retenues dans les membranes du RE (Duvet *et al.*, 1998), *via* une interaction impliquant leur DTM, ceci rendant extrêmement complexe leur purification notamment par chromatographie d'affinité (Frey S. E. *et al.*, 2010).

Pour contrecarrer cette problématique, diverses stratégies vaccinales alternatives (utilisant des protéines E1 et E2 délétées de leur DTM et/ou présentées via des VLPs ou sous forme de nanoparticules) ont été développées ces dernières années et évaluées. Il n'y a cependant pas encore de vaccin prêt à être employé (Gomez Escobar *et al.*, 2023).

III. Principe de la bioproduction du vaccin recombinant

La bioproduction du vaccin contre l'hépatite B repose sur la capacité de cellules hôtes à exprimer l'antigène HBs suite à l'introduction du gène viral. Ce processus suit plusieurs étapes clés et notamment une première étape de clonage et d'ingénierie génétique au cours de laquelle le gène codant pour l'antigène de surface du VHB (HBsAg) est isolé et inséré dans un vecteur d'expression (plasmide) introduit dans la cellule hôte (Michel.ML, 2016). Plusieurs cellules hôtes peuvent être utilisées comme par exemple le vaccin Sci-B-Vac™ produit en cellules CHO, mais le système d'expression le plus courant reste la levure, *Saccharomyces cerevisiae* dans lequel est notamment produit le vaccin Engerix B20. Ces cellules permettent une production élevée d'HBsAg sous forme de particules non infectieuses. Ce modèle est le plus utilisé, car il est peu coûteux, permet une production à grande échelle tout en assurant certaines modifications post-traductionnelles qui permettent la bonne mise en conformation de la particule virale et qui sont donc responsables d'une meilleure réponse immunitaire.

Les levures recombinantes sont cultivées dans des bioréacteurs sous des conditions optimisées (pH, température, oxygénation) pour maximiser l'expression de l'HBsAg. Les levures sont souvent cultivées en milieu riche en glucose et sels minéraux. Après la phase de culture,

les cellules sont lysées mécaniquement pour libérer l'antigène HBsAg, qui subit ensuite plusieurs étapes de purification en commençant par l'étape de centrifugation et de filtration pour éliminer les débris cellulaires puis une chromatographie d'affinité permettant d'isoler l'antigène avec une haute spécificité. L'ultracentrifugation va permettre d'obtenir des particules d'HBsAg homogènes par gradients de densité (OMS, 1985).

IV. Application en officine

En officine le pharmacien joue un rôle clé dans la promotion et la réalisation de la vaccination contre l'hépatite B.

Depuis l'élargissement des compétences vaccinales, les pharmaciens peuvent prescrire et administrer les vaccins inactivés ou sous-unitaires inscrits au calendrier vaccinal, dont celui contre le VHB, chez les personnes âgées de 11 ans et plus. Le pharmacien peut administrer le vaccin selon les recommandations en respectant la chaîne de froid et les modalités d'injection intramusculaire tout en informant le patient des potentiels effets indésirables dus à l'injection (douleur au point d'injection, légère fièvre...).

Le pharmacien doit également s'assurer du respect d'intervalle entre les doses et conseiller la vaccination avant tout départ en zone endémique (**Figure 5**), sans oublier la sensibilisation des patients sur les différents modes de transmission du VHB (sang, transmission sexuelle, matériel contaminé).

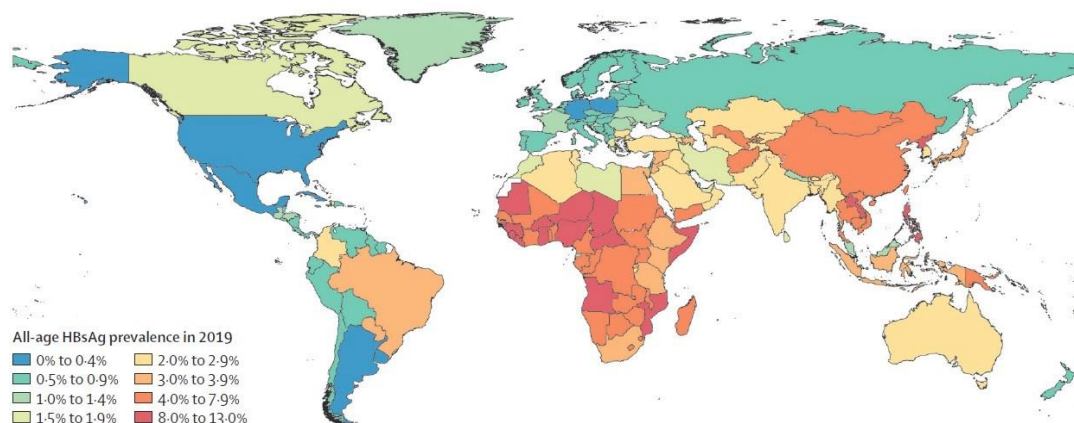


Figure 5. Distribution géographique de la prévalence de l'hépatite B en 2019 (GBD 2019 Hepatitis B Collaborators, 2022). Les zones en orange et rouge peuvent être considérées comme endémiques.

Plusieurs vaccins contre le VHB sont disponibles tel que Engerix B, Hexyon, Infarix-hexa ou encore Vaxelis. Le schéma classique de vaccination chez le nourrisson se fait à 2, 4 et 11 mois en même temps que le vaccin combiné contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche. Pour les adolescents de plus de 11 ans non vaccinés, 2 injections sont pratiquées espacées d'au moins 6 mois. Chez les mères porteuses de l'hépatite B, une dose vaccinale et une dose d'immunoglobulines anti-VHB sont administrées aux nourrissons dans les 24h après la naissance puis à 1 mois et à 6 mois.

Avant départ en zone endémique, le schéma vaccinal suit un schéma accéléré avec une injection à J0, J7 et à J21 puis un rappel est réalisé un an plus tard avec le vaccin EngerixB20.

V. Stratégie vaccinale proposée par l'Unité 1259 MAVIVHe

Actuellement il n'y a pas de vaccin hépatite C, d'où les travaux de recherche menés au sein du laboratoire MAVIVHe pour le développement d'un vaccin bivalent VHB/VHC. Dans ce contexte, l'unité s'est proposée de développer une stratégie de vaccination originale reposant sur le principe du vaccin prophylactique utilisé avec succès depuis le début des années 1980 pour lutter contre l'infection par le VHB (Maupas *et al.*, 1976). Ce candidat vaccin est basé sur la propriété de la protéine d'enveloppe S du VHB (226 acides aminés et 4 DTM) à s'auto-assembler en particules sous-virales d'enveloppe non infectieuses, très immunogènes et sécrétées (Patient *et al.*, 2009). Cette stratégie repose plus particulièrement sur l'utilisation dans leur intégralité de glycoprotéines d'enveloppe E1 ou E2 issues d'un VHC de génotype 1a, qui ont

préalablement été fusionnées à la protéine d'enveloppe S du VHB, en remplaçant le DTM en N-terminal de la protéine S par celui des protéines E1 ou E2 (**Figure 6**). Lorsque ces protéines E1-S et E2-S sont coexprimées avec la protéine S sauvage en cellules CHO, elles sont capables de s'assembler en particules vaccinales efficacement sécrétées et qui exposent les protéines E1 et/ou E2 à leur surface (particules S+E1-S, S+E2-S ou S+E1-S+E2-S). Administrées à des lapins, ces particules vaccinales ont été montrées induire de fortes réponses humores à l'encontre des protéines d'enveloppe du VHB et du VHC (Beaumont *et al.*, 2013, 2016, 2020). Les réponses anti-VHB sont équivalentes à celles engendrées par un vaccin commercial contre le VHB, ceci venant renforcer l'idée que de telles particules pourraient se substituer aux vaccins actuellement utilisés pour lutter contre le VHB et souligner la potentielle bivalence de ce candidat vaccin. En outre, les anticorps anti-E1 et anti-E2 neutralisent efficacement *in vitro* les infections par des souches hétérologues du VHC de différents génotypes, avec une efficacité toutefois génotype-dépendant.

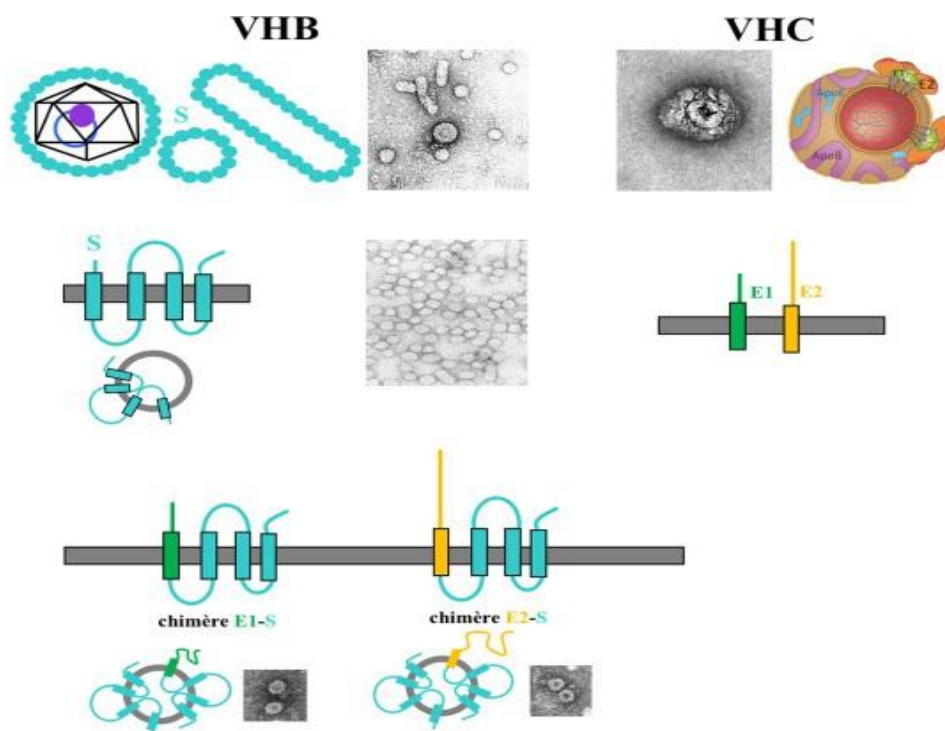


Figure 6. Principe du vaccin bivalent contre les virus des hépatites B et C. Cette stratégie vaccinale repose sur la propriété de la protéine d'enveloppe S du VHB (226 acides aminés ; 4 domaines trans-membranaires [DTM]) à s'auto-assembler en petites particules sous-virales non infectieuses, hautement immunogènes et secrétées. Sont utilisées dans leur intégralité les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC fusionnées à la protéine S du VHB. Le domaine N-terminal de la protéine S a été substitué par le DTM de la glycoprotéine E1 (vert) ou E2 (jaune) du VHC, formant ainsi des protéines chimères E1-S et E2-S. Exprimées en cellules CHO, ces protéines chimères s'assemblent avec la protéine S sauvage et sont secrétées dans les surnageants de culture sous forme de particules sous-virales d'enveloppe très immunogènes (particules S+E1-S et S+E2-S) (d'après Roingeard et al., 2021).

L'efficacité neutralisante des anticorps produits en réponse au candidat vaccin étant démontrée *in vitro*, l'unité 1259 MAVIVHe recherche aujourd'hui à améliorer le mode de présentation des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 en surface des particules vaccinales, de manière à augmenter les propriétés neutralisantes intergénomiques des anticorps induits par la vaccination.

Puisque la N-glycosylation des protéines E1 et E2 module leur mise en conformation et leur immunogénicité, l'unité a souhaité porter une attention toute particulière à cette dernière et évaluer l'impact des N-glycanes sur le mode de présentation des immunogènes. En contribuant au repliement correct des protéines d'enveloppe du VHC, les N-glycanes sont connus jouer un rôle majeur dans différentes étapes du cycle infectieux du VHC (étapes d'entrée et d'assemblage viral). De par leur importante présence en surface des protéines d'enveloppe E1 et E2, ces N-glycanes semblent également jouer un rôle déterminant dans l'échappement du virus au système immunitaire en se présentant sous la forme d'un large bouclier qui masque les épitopes

antigéniques clés et les protège d'une reconnaissance par les anticorps neutralisants (Helle *et al.*, 2011).

L'intérêt de l'unité 1259 MAVIVHe pour la N-glycosylation a également été motivé par les résultats obtenus par un groupe de recherche de l'Institut Pasteur de Shanghai, lors de la conduite d'une analyse comparative de l'immunogénicité d'une protéine E2 tronquée (délétée de son DTM) issue d'un VHC de génotype 1b, produite en cellules de mammifères (cellules HEK-293T) ou en cellules d'insectes (cellules S2 de drosophile) (Li *et al.*, 2016). Puisque les épitopes neutralisants sont présentés dans une configuration extrêmement complexe à la surface virale, il était jusqu'à présent pensé nécessaire de mimer à l'identique ces régions antigéniques et de produire les candidats vaccins prophylactiques en cellules de mammifères. Cette équipe a toutefois montré que la protéine E2 tronquée exprimée en cellules d'insecte présentait un état de glycosylation distinct (moins complexe, mais sur les mêmes sites de glycosylation) lui conférant une immunogénicité accrue. En effet, la glycosylation moins complexe en cellule d'insecte permet une meilleure exposition des épitopes neutralisants qu'en cellule de mammifères.

Compte-tenu de la volonté de l'unité 1259 MAVIVHe d'optimiser son candidat vaccin et de l'impact de la N-glycosylation globale sur la mise en conformation et l'immunogénicité des protéines d'enveloppe du VHC, l'objectif de ce projet a été de mener une analyse comparative de l'immunogénicité du candidat vaccin VHB-VHC, généré à l'aide de différents systèmes d'expression engendrant des processus de glycosylation distincts (cellules de mammifères, cellules d'insectes et levures), de manière à déterminer l'état de glycosylation conférant une immunogénicité optimale et engendrant la production d'anticorps très largement neutralisants. Pour apprécier les différences de glycosylation et d'immunogénicité, seules les particules vaccinales arborant E2 de manière isolée (S+E2-S) ont été considérées lors de la conduite de ce projet car E2 est hautement glycosylée (11 sites de N-glycosylation) et bien plus immunogène que la protéine E1.

Durant mon stage de master 2, j'ai donc participé à de nombreuses expérimentations conduites en vue d'analyser l'impact de la N-glycosylation sur l'immunogénicité du candidat vaccin VHB-VHC et de son optimisation. J'ai eu pour mission d'analyser comparativement les particules vaccinales générées en cellules CHO et en cellules de drosophiles (lignée S2), en termes d'incorporation, de mise en conformation et de glycosylation des immunogènes d'intérêt.

Partie 2 : Travail de recherche mené au sein du laboratoire MAVIVHe sur le vaccin bivalent hépatite B et hépatite C

I. Matériels et méthodes

1. Production des particules vaccinales d'intérêt en lignées CHO et S2

Dès mon arrivée au laboratoire, des échantillons de particules vaccinales S et S+E2-S produites en cellules CHO et de particules vaccinales S produites en cellules S2, dérivant d'une culture primaire d'embryon de *Drosophila melanogaster* ont été mis à ma disposition, de manière à conduire l'ensemble des expérimentations de caractérisation de ces particules. Ces particules vaccinales ont été produites par des clones de CHO et S2 exprimant de manière stable la protéine S sauvage (clone CHO-S et clone S2-S) plus ou moins la protéine chimère E2-S (clone CHO-S+E2-S et clone S2-S+E2-S). Ces différents clones ont été développés lors de précédents travaux par des procédés de transductions lentivirales accompagnés de sélection clonale (Patient *et al.*, 2009) et cultivés selon les conditions requises pour assurer une production en masse des particules vaccinales, comme précédemment décrit (Beaumont *et al.*, 2013).

Puisque le stock de particules vaccinales S+E2-S produites en cellules S2, dérivant d'une culture primaire d'embryon de *Drosophila melanogaster*, était insuffisant pour conduire l'ensemble des expérimentations, il m'a été nécessaire de participer à une nouvelle campagne de production de particules. Pour ce faire, les clones S2-S+E2-S, précédemment développés au laboratoire selon des procédés de transfection et de sélection clonale, ont été décongelés. Ces clones, qui expriment efficacement les protéines S +/- E2-S, ont tout d'abord été progressivement adapté à une culture dans un milieu dépourvu de protéines (Insect XpressTM medium ; Lonza), supplémenté par 100 U/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de streptomycine et 6 µg/mL de puromycine, et ce, à une température de 28°C et en l'absence de CO₂. Ces clones ont ensuite été amplifiés en flasques de 175 cm², puis cultivés en erlenmeyers de 1 L sous agitation (28 °C, 110-120 tr/min) dans le milieu décrit ci-dessus, et enfin soumis à une étape d'induction en présence de 5 µM de chlorure de cadmium (CdCl₂), dès lors qu'ils ont atteint une densité cellulaire de 7x10⁶ cellules/mL. Cette phase d'induction par le CdCl₂ a été maintenue durant plus de 120 h, temps au terme duquel les surnageants de culture ont été collectés et clarifiés par

centrifugation (3500 g pendant 10 minutes à 4 °C) pour éliminer les cellules et les débris cellulaires. Les particules ont par la suite été purifiées par précipitation, suite à une incubation (16 h à 4°C) en présence d'une solution de sulfate d'ammonium (solution (NH₄)₂SO₄ à 45% ; pH 7,5), et récupérées par centrifugation (4000 g pendant 20 minutes à 4 °C). Puisqu'une partie du précipité était flottante, nous avons eu recours à l'utilisation d'une petite cuillère en inox perforée stérilisable (MC17 Moria perforated spoon ; Fine Science Tools) pour collecter cette portion de précipité. Les précipités de protéines ont ensuite été repris dans un tampon Tris 10 mM - NaCl 100 mM - EDTA 1 mM (TNE ; pH = 7) et dialysés contre ce même tampon pendant 16 h à 4°C sous agitation, à l'aide de cassettes de dialyse appropriées (Slide-A-Lyzer®dialysis cassette G2 10K MWCO ; ThermoFisher Scientific). Enfin, les particules vaccinales ont été purifiées par deux ultracentrifugations isopycniques successives (112088 g pendant 17 h à 4 °C) sur gradients de chlorure de césium (CsCl ; densité finale de 1,22 g/cm³). Les fractions récupérées ont été analysées par une technique ELISA commerciale (AIDTM HBsAg ELISA ; Wantai BioPharm) permettant la détection de la protéine S du VHB. Les fractions positives pour la protéine S ont été regroupées, dialysées contre un tampon TNE et concentrées avec un dispositif Amicon Ultra-15 100k (Millipore). Les concentrations finales en particules des différentes préparations ont été déterminées à l'aide de ce même ELISA et d'une gamme de protéine S recombinante purifiée, et leur pureté a été calculée comme le rapport entre la concentration en protéine S et la concentration en protéines totales, évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre (Nanodrop, Denovix).

2. Caractérisation des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2

2.1 Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S par Western Blot

Dès lors que nous avons été en possession des différents types de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, nous avons débuté leur caractérisation. Par une technique de western blot conduite en conditions dénaturantes et réductrices (**Figure 7**), la bonne incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S a été vérifiée. Des échantillons de particules (l'équivalent de 1,5 µg de protéine S pour chaque type de particule) ont tout d'abord été dénaturés par 5% de β-mercaptoéthanol en tampon Laemmli durant 5 minutes à 96 °C, puis soumis à une électrophorèse (migration d'environ 3 h à 100 V) sur gel d'acrylamide (12%) en présence de dodécylsulfate de sodium (tampon 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS (TG-SDS 1X ; pH = 8,3 ; Euromedex)). Les protéines alors séparées en fonction de leur poids moléculaire ont par la suite

été soumises à un électrotransfert (1h30 à 100 V) en tampon 25 mM Tris, 192 mM glycine (TG 1X ; Euromedex), 20% méthanol (VWR) sur des membranes de nitrocellulose *Hybond-C Extra* (Amersham Biosciences). Après saturation des membranes (1 h à température ambiante) par un tampon de blocage TBS (Tris/HCl 50 mM pH = 8, NaCl 5 mM) - 3% albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma-Aldrich), les diverses protéines (S et/ou E2-S) ont été mises en évidence par incubation (1 h à température ambiante) des membranes avec un anticorps monoclonal de souris dilué dans un tampon TBS – 3% BSA reconnaissant spécifiquement un épitope linéaire de E2 (clone H52; anticorps généreusement fournis par le Dr Jean Dubuisson, CNRS-Lille).

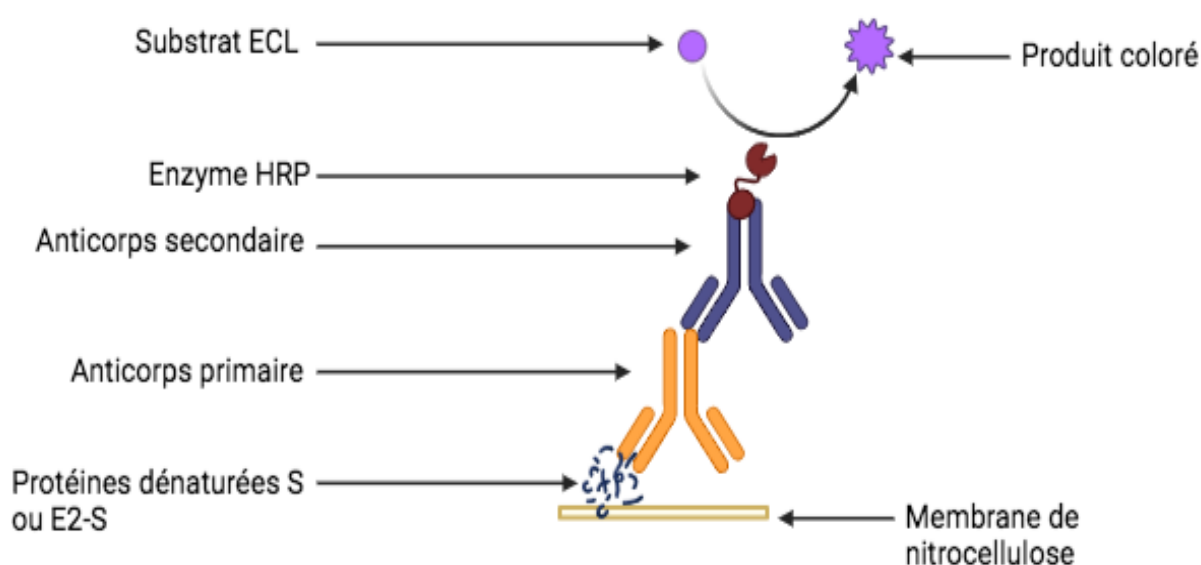
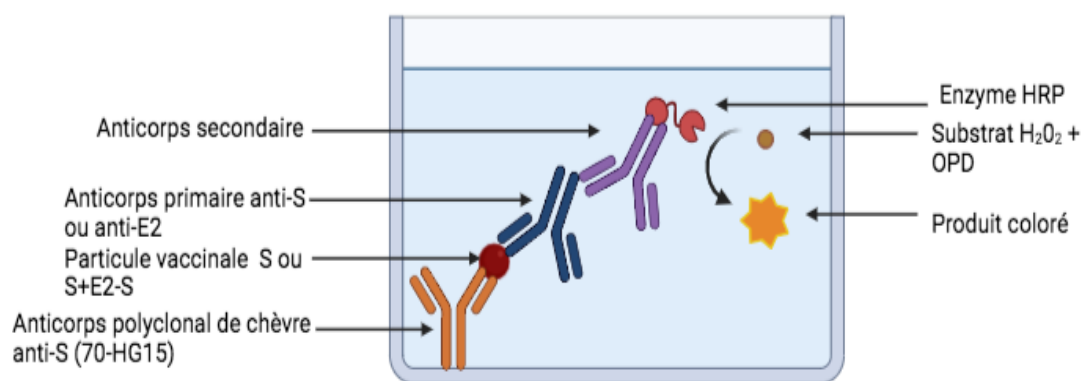


Figure 7. Analyse par Western blot de l'incorporation des protéines S et E2-S dans les particules vac-cinales générées en cellules CHO et S2. Les protéines d'intérêt S et E2-S possiblement incorporées dans les particules S et S+E2S produites en cellules CHO ou S2 ont été préalablement dénaturées, puis séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium, et enfin transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ces protéines d'intérêt ont par la suite pu être détectées grâce à l'usage d'anticorps primaires spécifiques de S (70-HG15) et E2 (H52) et d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP), et révélées par chimiluminescence grâce au substrat ECL.

2.2. Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S, ainsi que de leur mise en conformation par ELISA

La bonne incorporation et mise en conformation de protéines d'intérêt S et E2-S ont par la suite été évaluées par une technique ELISA conduite en conditions natives (**Figure 8**). Pour ce faire, les puits d'une plaque de micro-titration (Immulon® II HB ; Thermo Scientific) ont tout d'abord été recouverts par un anticorps polyclonal anti-S (70-HG15 (fourni par Fitzgerald –

Fitzgerald Industries International) dilué dans un tampon TBS à 0,1 µg/puits par incubation d'une nuit à 4 °C. Après une série de trois lavages avec du tampon TBS - 0,1% Tween 20, les sites non occupés par les anticorps ont été saturés (1 h à 37 °C) à l'aide d'un tampon TBS – 5% lait écrémé – 4% sérum de mouton, puis les puits ont de nouveau été lavés à deux reprises avec du tampon TBS - 0,1% Tween 20. Par la suite, les particules vaccinales (l'équivalent de 0,8 µg de protéine S/puits) ont été capturées durant 1 h à 37 °C, puis soumises à des tests de reconnaissance par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un épitope conformationnel de la protéine S du VHB (clone H25B10; ATCC) ou trois anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes linéaires (clone murin H52 et clone murin AP33 (Genentech)) ou conformationnels (clone humain AR3A ; généreusement donné par le Dr Mansun Law de l'institut de recherche californien *The Scripps*) de la protéine E2 (à des concentrations de 5; 2,5 ou 1 µg/mL). Après une incubation d'une heure à 37 °C, les anticorps primaires non liés ont alors été éliminés par une série de cinq lavages avec du tampon TBS - 0,1% Tween 20 et les complexes antigène-anticorps alors immobilisés au fond des puits ont été révélés par l'usage d'anticorps monoclonaux dirigés contre les immunoglobulines de souris ou humaines et conjugués à l'HRP (clones SB77e et JDC10, respectivement ; Southern Biotech) à la dilution 1/2000 dans une solution composée à 50% du tampon de saturation / 50% TBS. Après 1h d'incubation, le substrat chro-



mogénique o- phénylènediamine a été ajouté et la réaction colorée a été mesurée par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 490 nm/630 nm_{référence}.

Figure 8. Principe de l'ELISA ayant permis l'étude de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines d'intérêt S et E2_S en surface des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Les puits d'une plaque de micro-titration ont tout d'abord été recouverts par un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15). Après des étapes de lavages et saturation des puits, les particules vaccinales ont alors été capturées, puis soumises à des tests de reconnaissance par des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine S du VHB (clone H25B10) ou la protéine E2 du VHC (clones H52, AP33 et AR3A). Les complexes anticorps-particule vaccinale ainsi immobilisés ont ensuite été révélés par l'usage d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP). Après l'ajout du substrat chromogénique (o- Phénylènediamine), la réaction colorée catalysée a été mesurée par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 490 nm/630 nm _{référence}.

2.3 Observation des particules vaccinales au microscope électronique à transmission

Une technique d'immuno-capture des particules vaccinales sur grilles de nickel (S162, Oxford Instruments) recouvertes de Formvar/carbone, accompagnée d'immunomarquages des immunogènes d'intérêt par des anticorps couplés à des billes d'or de différents diamètres, a été mise en œuvre (**Figure 9**). Les grilles de microscopie électronique à transmission (MET) ont préalablement été incubées durant 1 h à température ambiante en présence d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-S (70-HG15 ; 32 µg/mL), puis lavées en tampon phosphate (PBS) et saturées durant 30 minutes à température ambiante à l'aide d'une solution de BSA (BSAcTM 10% ; Aurion). Après une série de trois lavages avec un tampon PBS - 0,1% BSAC, ces grilles ont ensuite été mises en contact avec les préparations vaccinales (l'équivalent de 7 µg de protéine S) durant 1 heure à température ambiante. Après une nouvelle série de trois lavages des grilles avec un tampon PBS – 0,1% BSAC, les particules immobilisées ont été soumises à des tests de reconnaissance par des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes conformationnels des protéines S (clone murin H25B10 ; ATCC ; 100 µg/mL) ou E2 (clone humain AR3A ; 40 µg/mL). Après une incubation d'1 h à température ambiante et une série de 6 lavages des grilles, les complexes antigènes (S ou E2-S)-anticorps alors immobilisés ont été révélés par l'usage d'anticorps secondaires dirigés contre H25B10 (AB6885) ou AR3A (1H) (Aurion) couplés à des billes d'or d'un diamètre de 6 et 10 nm, respectivement, puis par coloration négative à l'aide du produit de contraste contenant 2% d'acétate d'uranyle. L'ensemble des grilles expérimentales ont ensuite été analysées par observation au microscope électronique à transmission JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd).

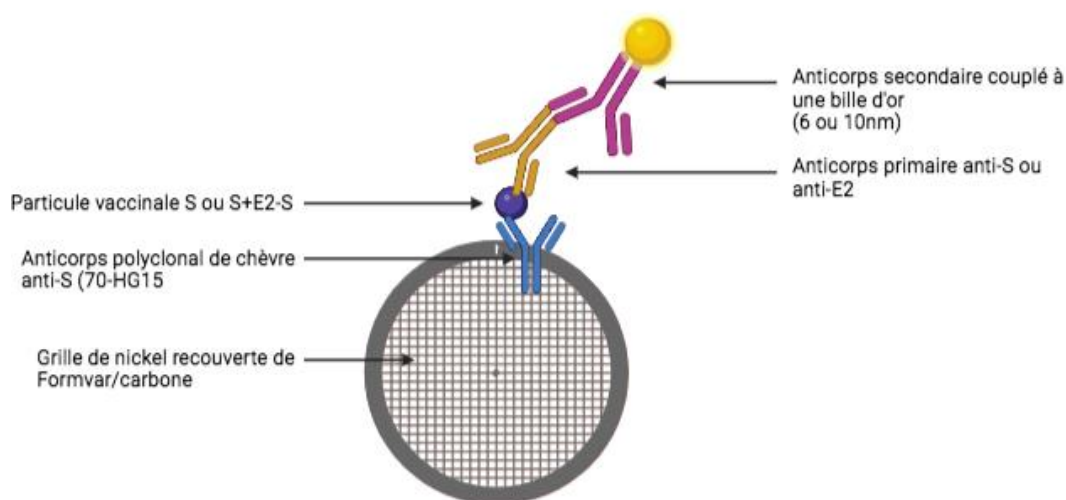


Figure 9. Principe de la technique d'immunocapture, accompagnée d'immunomarquages, mise en œuvre pour observer par microscopie électronique à transmission les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Une grille de nickel recouverte de Formvar/carbone a été préalablement incubée avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-S (70-HG15), puis mises en contact avec les particules S ou S+E2-S. Les complexes anticorps-particule vaccinale immobilisés ont ensuite été détectés grâce à l'usage d'anticorps primaires dirigés contre la protéine S (H25B10) ou la protéine E2 (AR3A), puis d'anticorps secondaires appropriés couplés à des billes d'or d'un diamètre de 6 ou 10 nm. L'observation des grilles a été réalisée à l'aide du microscope électronique à transmission JEOL JEM-1400.

2.4. Étude du profil de glycosylation des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2

a. Analyse par western blot en conditions dénaturantes après traitements par des glycosidases

La N-glycosylation de nos particules vaccinales produites dans les lignées CHO et S2 a pu en premier lieu être appréciée en conduisant des analyses par western blot en conditions dénaturantes des particules, plus ou moins traitées enzymatiquement par la peptide-N-glycosidase F (PNGase F), une amidase qui élimine l'ensemble des N-glycanes (clivage entre les résidus N-acétylglucosamine [GlcNAc] et Asparagine [Asn]), ou par l'endo- β -N-acétylglucosaminidase H (endo H), une endoglycosidase qui s'attaque préférentiellement aux oligosaccharides riches en mannoses ou hybrides (clivage entre les résidus centraux GlcNAc) (**Figure 10**).

Pour ce faire, les particules vaccinales (l'équivalent de 20 μ g de protéines totales) ont tout d'abord été incubées en présence d'un tampon dénaturant de glycoprotéines (*New England Biolabs*) contenant 0,5% de SDS et 40 mM de dithiothréitol (DTT) et incubées durant 10 minutes à 100°C, puis dans la glace. Les particules ont ensuite été soumises à l'action de 500

unités d'enzyme (PNGase F ou Endo H ; *New England Biolabs*) en présence de détergent NP-40 (1%) et du tampon spécifique de chacune des enzymes (*Glycobuffer 2* : 50 mM phosphate de sodium ; pH7,5 pour la PNGase F et *Glycobuffer 3* : 50 mM acétate de sodium ; pH6 pour l'endo H). Après une digestion d'une heure à 37°C, les particules dénaturées et traitées enzymatiquement ont été étudiées par western blot en conditions dénaturantes comme précédemment décrit, comparativement à des particules dénaturées, mais non traitées par la PNGase F ou l'endo H. Des anticorps anti-S (70-HG15) et anti-E2 (H52/AP33) ont été utilisés dans le but de révéler respectivement les protéines d'intérêt S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales produites dans les lignées CHO et S2. Seule une détection de la protéine E2-S a toutefois été réalisée pour les particules traitées par l'endo H.

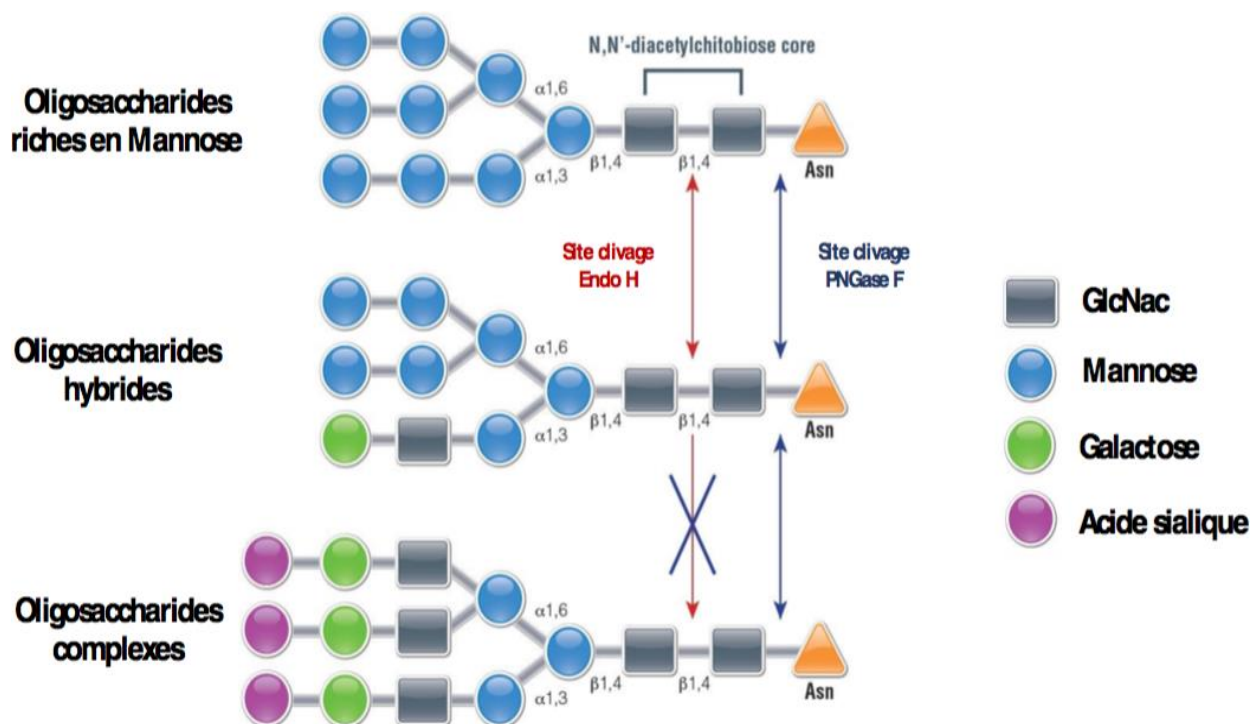


Figure 10. Mode d'action de la peptide-N-glycosidase F (PNGase F) et l'endo- β -N- acétylglucosamini-dase H (endo H). La PNGase F est une amidase qui clive l'ensemble des N-glycanes entre les résidus N- acétylglucosamine (GlcNAc) et Asparagine (Asn), alors que l'endo H est une endoglycosidase qui clive préférentiellement les oligosaccharides riches en mannoses ou hybrides entre les résidus centraux GlcNAc (Gary Kobs, 2012).

b. Analyse qualitative de la glycosylation des protéines S et S+E2-S par lectine-blot

Dans un second temps, nous avons souhaité identifier la nature des N-glycanes liés aux protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Pour ce faire, nous avons développé une technique dite de lectine-blot (**Figure 11**), qui consiste en une analyse des particules vaccinales par western blot en conditions dénaturantes et réductrices, se caractérisant par une phase de révélation des protéines d'intérêt S et E2-S à l'aide d'un panel de lectines reconnaissant spécifiquement certains types de glucides (**Tableau 1**).

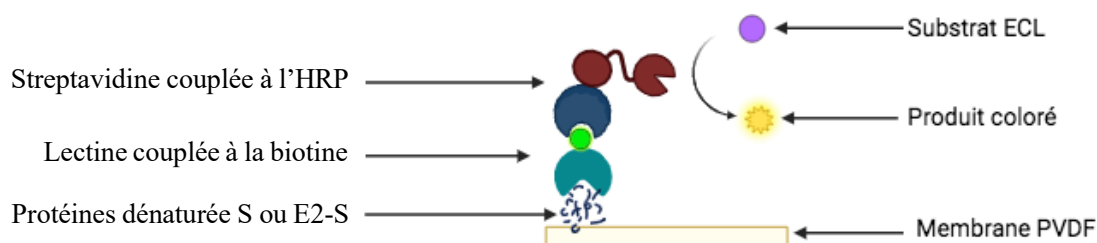


Figure 11. Analyse par une technique de lectine-blot de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Les protéines d'intérêt S et E2-S incorporées dans les particules S et S+E2S produites en cellules CHO ou S2 ont été préalablement dénaturées, puis séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium, et enfin transférées sur une membrane de PVDF. Ces protéines d'intérêt ont par la suite été détectées grâce à l'usage de lectines conjuguées à la biotine ciblant spécifiquement des carbohydrates particuliers et de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP), et révélées par chimiluminescence grâce au substrat ECL.

Des échantillons de particules (l'équivalent de 2,5 μ g de protéine S pour chaque type de particule) ont tout d'abord été dénaturés par 5% de β -mercaptoéthanol en tampon Laemmli durant 5 minutes à 96°C, puis soumis à une électrophorèse (migration d'environ 3 h à 100 V) sur gel d'acrylamide (12%) en présence de dodécylsulfate de sodium (tampon TG-SDS ; pH = 8,3). Les protéines alors séparées en fonction de leur poids moléculaire ont par la suite été soumises à un électrotransfert (1h30 à 100 V) en tampon TG - 20% méthanol sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF ; Amersham Biosciences) pré-incubées durant 10 secondes en méthanol. Après saturation des membranes (1h à température ambiante) par un tampon de blocage TBS- 3% BSA, les diverses protéines (S et/ou E2-S) ont été mises en évidence par incubation (1 h à température ambiante) des membranes avec chacune des lectines

d'intérêt conjuguées à la biotine à une concentration de 5µg/mL (**Tableau 1**). Cette incubation a toutefois été conduite dans des conditions particulières permettant un bon repliement de chacune des lectines et favorisant leur interaction avec le carbohydrate ciblé, à savoir dans un tampon NaCl 150 mM – acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) 10 mM ; pH = 7,5, supplémenté d'ions spécifiques (0,1 mM) (détaillés dans le **Tableau 1**). Après une série de trois lavages des membranes en tampon TBS-0,3% Tween 20, leur incubation (1 h à 37°C) avec de la streptavidine couplée à l'HRP (Biolegend ; dilution 1/5000 dans du tampon TBS - BSA 3% - Tween 20 0,3%) et une seconde série de trois lavages en tampon TBS-0,3% Tween 20, les protéines ont été révélées à l'aide d'un kit de détection chimiluminescent (*PierceTM ECL Western Blotting substrate* ; Thermo Scientific), puis détectées avec l'appareil Image-Quant LAS500 (GE Helthcare).

Tableau 1. Spécificités des lectines utilisées pour conduire les techniques de lectine-blot et lectine-ELISA. Dans ce tableau sont indiqués les carbohydrates ciblés par chacune des lectines considérées, ainsi que les ions requis pour assurer leur bon repliement en vue d'une reconnaissance optimale de leur cible.

Lectines biotinylées	Ions divalents requis	Carbohydrate ciblé
WFA/WFL <i>Wisteria floribunda</i> (issue de la glycine japonaise)	Ca ²⁺	N-acétylgalactosamine (GalNAc)
STA/STL <i>Solanum tuberosum</i> (issue du la pomme de terre)	Aucun ion nécessaire	N-acétylglucosamine (GlcNAc)
DBA <i>Dolichos biflorus</i> (issue du pois de cheval)	Ca ²⁺ /Mn ²⁺ /Mg ²⁺ /Zn ²⁺	α-N-acétylgalactosamine (α-GalNAc)
GNL/GNA <i>Galanthus nivalis</i> (issue du perce-neige)	Aucun ion nécessaire	α-1,3 mannose
LTL <i>Lotus tetragonolobus</i> (issue du pois asperge)	Ca ²⁺ /Mn ²⁺	α-Fucose
PHA-L <i>Phaseolus vulgaris</i> (issue du haricot rouge)	Ca ²⁺ /Mn ²⁺	N-glycane complexe
SNL EBL <i>Sambucus nigra</i> (issue du sureau)	Ca ²⁺	Acide sialique
ECL/ECA <i>Erythrina cristagalli</i> (issue de l'arbre corail)	Ca ²⁺ /Mn ²⁺ /Zn ²⁺	N-acétyllactosamine (Galβ4GlcNAc)

c. Analyse de la composition glycosidique des protéines S et S+E2-S par lectine-ELISA

De manière à identifier la nature des N-glycanes liés aux protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2 et rendre encore plus spécifique la reconnaissance de ces protéines par les lectines, nous avons développé une autre technique dite de lectine-ELISA (**Figure 12**), qui consiste en une capture spécifique des particules vaccinales sur une plaque de micro-titration et en leur reconnaissance par un panel de lectines reconnaissant spécifiquement certains types de glucides (détaillés dans le **Tableau 1**).

Comme précédemment décrit, les particules vaccinales (l'équivalent de 2,5 µg de protéine S/puits) ont été capturées au fond des puits d'une plaque de micro-titration (Immulon® II HB) préalablement recouverts par un anticorps polyclonal anti-S (70-HG15 ; 0,1 µg/puits) et saturés (1 h à 37°C) à l'aide d'un tampon TBS – 3% BSA. Par la suite, les particules vaccinales ont été soumises à des tests de reconnaissance par un panel de lectines conjuguées à la biotine (à une concentration de 5 µg/mL) et incubées selon les mêmes conditions décrites précédemment pour la technique lectine-blot (tampon NaCl 150 mM – HEPES 10 mM [pH = 7,5] – ions spécifiques 0,1 mM). Après une incubation d'une heure à 37°C, les lectines non liées ont alors été éliminées par une série de cinq lavages avec du tampon TBS – 0,1% Tween 20 et les complexes carbohydre-lectine alors immobilisés au fond des puits ont été révélés par l'usage de streptavidine conjuguée à l'HRP (dilution 1/5000 dans du tampon PBS-BSA 1%) et du substrat o- phénylènediamine. La coloration a été mesurée par spectrophotométrie (490/630 nm).

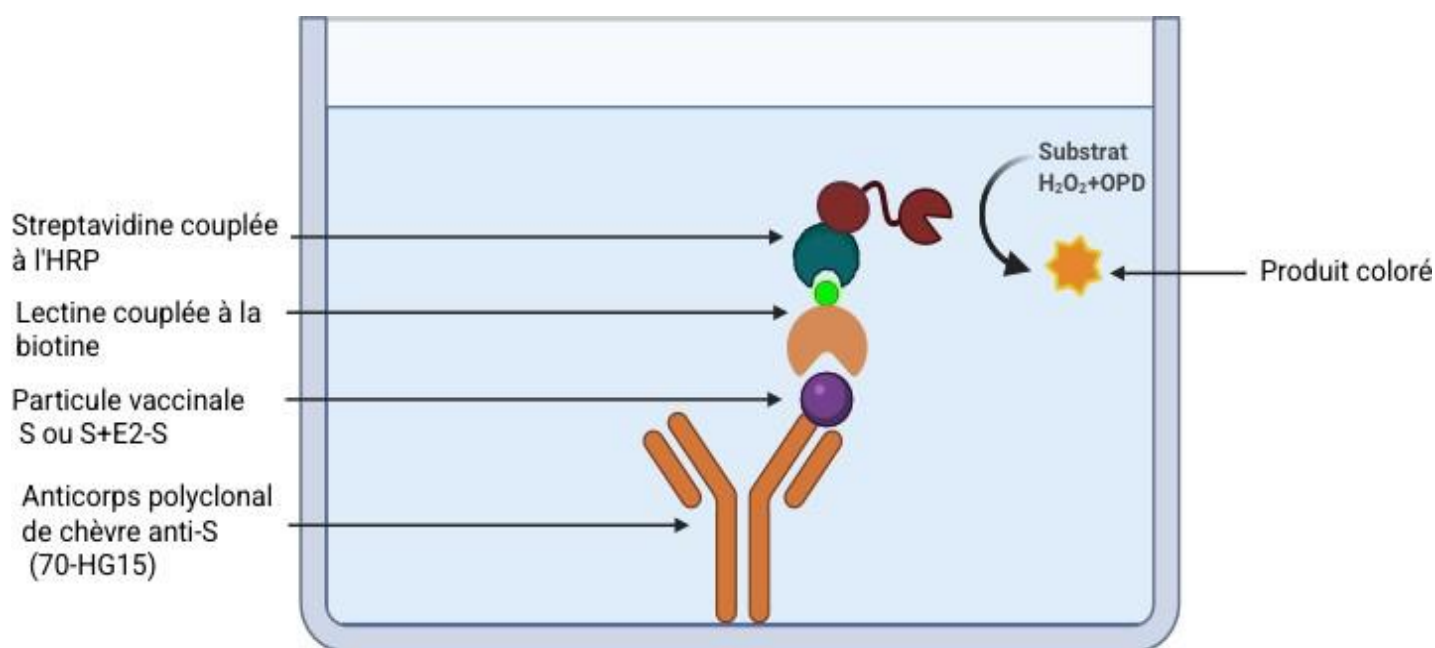


Figure 12.. Analyse par une technique de lectine-ELISA de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Les puits d'une plaque de micro- titration ont tout d'abord été recouverts par un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15). Après des étapes de lavages et saturation des puits, les particules vaccinales ont alors été capturées, puis soumises à des tests de reconnaissance par des lectines conjuguées à la biotine ciblant spécifiquement des carbohydrates particuliers. Les complexes carbohydre-lectine ainsi immobilisés ont ensuite été révélés par l'usage de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP). Après l'ajout du substrat chromogénique (o- phénylènediamine), la réaction colorée catalysée a été mesurée par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 490 nm/630 nm_{référence}.

II. Résultats de recherche obtenus au sein du laboratoire MAVIVHe

1. Production des particules vaccinales S et S+E2-S en cellules de drosophile S2

Au cours de cette production, nous avons pu observer des concentrations de purification particulaire de 2 et 0,690 mg/L respectivement pour les clones cellulaires S2-S et S2-S+E2-S. Ces concentrations se sont révélées supérieures à celles observées précédemment pour les clones CHO-S et CHO-S+E2-S (respectivement 0,33 et 0,34 mg/L).

Les concentrations finales en particules vaccinales S+E2-S, purifiées à partir des surnageants de culture des cellules S2 d'intérêt, ont été évaluées en conduisant un test ELISA commercial permettant la détection de la protéine S (*AIDTM HbsAg ELISA*), rendu quantitatif grâce à l'usage d'une gamme de protéine S recombinante purifiée. Nous en avons profité pour réévaluer les lots vaccinaux S produits en cellules CHO et S2, et S+E2-S produits en cellules CHO mis à ma disposition au début du stage. Grâce à la conduite de ce test, des concentrations en protéine S de 250,3 µg/mL et 146,3 µg/mL ont respectivement été mesurées pour les lots vaccinaux S et S+E2-S produits en cellules de drosophile S2. De manière similaire, des concentrations en protéine S de 198,7 µg/mL et 142,9 µg/mL ont respectivement été déterminées pour les lots vaccinaux S et S+E2-S produits en cellules de mammifère CHO.

Afin de déterminer la pureté de chacun des lots vaccinaux, les concentrations en protéines totales ont par la suite été déterminées en mesurant l'absorbance à 280 nm des préparations. Ainsi, des concentrations protéiques de 4 et 3,4 mg/mL ont respectivement été observées pour les lots vaccinaux S et S+E2-S produit en cellules S2, et de 2,5 et 2,4 mg/mL respectivement pour les lots vaccinaux S et S+E2-S produit en cellules CHO. En considérant le rapport entre la concentration en protéine S et la concentration en protéines totales pour chacune des préparations, nous avons ainsi pu déterminer leur pureté : 6,3% et 4,3% respectivement pour les préparations de particules S et S+E2-S générées en cellules S2, et 8% et 6% respectivement pour les lots vaccinaux S et S+E2-S produits en cellules CHO. Nous obtenons ainsi pour les différents lots de production des taux de pureté très faibles.

2. Caractérisation des particules vaccinales S et S+E2-2 générées en lignées S2 et CHO

2.1. Évaluation de l'incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S par Western Blot

Dès lors que nous avons été en possession des différents types de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, nous avons pu procéder à leur caractérisation. Nous avons tout d'abord analysé ces particules en conduisant un western blot en conditions dénaturantes et réductrices de manière à nous assurer de la bonne incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S. En marquant la première membrane avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-S (70-HG15), nous avons pu observer une incorporation de la protéine S sous ses deux formes non glycosylée (24 kDa) et glycosylée (27 kDa) dans les particules vaccinales issues des cellules CHO et S2 (**Figure 13, panel du haut**). De manière intéressante, nous avons remarqué que la protéine S était principalement incorporée dans les particules produites en CHO sous sa forme glycosylée, et que le phénomène inverse était observé pour les particules produites en S2. De par ce même marquage S, nous n'avons en revanche pas pu observer de manière spécifique et précise la protéine E2-S, en raison de la présence de nombreux bandes non identifiées. L'incorporation de la protéine E2-S, sous ses formes non glycosylée (62 kDa) et glycosylée (85kDa), dans les particules vaccinales S+E2-S générées en cellules S2 et CHO a toutefois pu être confirmée en procédant au marquage de la seconde membrane avec un anticorps monoclonal de souris anti-E2 (H52) (**Figure 13, panel du bas**). Comme précédemment, nous avons pu constater que la protéine E2-S était essentiellement incorporée dans les particules S+E2-S générées en cellules CHO sous sa forme glycosylée, alors que les particules S+E2-S générées en cellules S2 semblaient présenter les deux formes glycosylée/non glycosylée de E2-S.

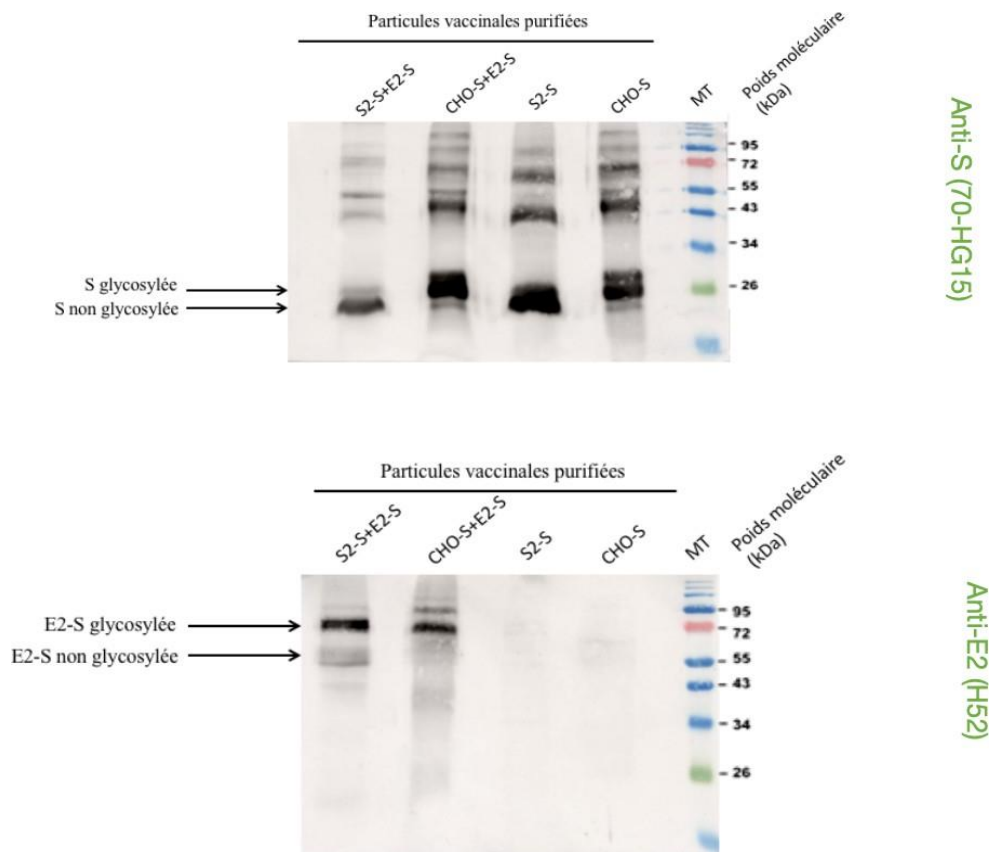


Figure 13. Étude par western blot de l'incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S dans les particules vaccinales issues de cellules de mammifères (CHO) ou de drosophiles (S2). Pour mener cette expérience, les particules vaccinales (l'équivalent de 1,5 µg de protéine S) ont été dénaturées, puis soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide (12%) en présence de SDS. Les protéines alors séparées en fonction de leur poids moléculaire ont par la suite été soumises à un électrotransfert sur des membranes de nitrocellulose. Les protéines S et E2-S, pouvant apparaître sous deux formes non glycosylée (24 kDa pour S et 62 kDa pour E2-S) ou glycosylée, ont été mises en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques (anticorps polyclonal 70-HG15 et anticorps monoclonal H52, respectivement) et d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP), et révélées par chimiluminescence grâce au substrat ECL. (MT : Marqueur de poids moléculaire).

2.2 Analyse de l'incorporation des protéines S et E2-S, ainsi que de leur mise en conformation par ELISA

Après avoir montré par western blot que les protéines d'intérêt S et E2-S entraient bien dans la composition des particules vaccinales générées, nous avons par la suite souhaité confirmer leur bonne incorporation et exposition en surface des particules, en vue de nous assurer de leur bonne reconnaissance par le système immunitaire. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre une technique ELISA en conditions natives qui nous a permis d'évaluer les capacités d'un panel

d'anticorps, ciblant des épitopes linéaires ou conformationnels des protéines S et E2-S, à reconnaître spécifiquement les particules vaccinales S et S+E2-S générées en lignées CHO et S2. Ainsi, les particules vaccinales ont été capturées au fond des puits d'une plaque de micro-titration (l'équivalent de 0,8 µg de protéine S/puits) et soumises à des tests de reconnaissance par différents anticorps, utilisés selon des concentrations décroissantes (allant de 5 à 1 µg/mL) qui nous ont permis de mieux apprécier les différentiels de reconnaissance et de confirmer les résultats. En utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre un épitope conformationnel de la protéine S du VHB (H25B10), nous avons pu confirmer la bonne incorporation et exposition de la protéine S en surface de l'ensemble des particules d'intérêt (**Figures 14 et 15**). Nous avons toutefois observé une capacité moindre de cet anticorps à reconnaître les protéines S exposées en surface des particules générées en cellules S2. En utilisant deux anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes linéaires de E2 (H52 (épitope de E2 418-431) et AP33 (épitope particulier 412-423 sous forme de boucle en « épingle à cheveux »), nous avons également pu confirmer la bonne incorporation et exposition de la protéine E2-S en surface des particules S+E2-S générées en cellules CHO et S2. Même si les densités optiques mesurées pour l'anticorps H52 semblaient similaires, nous avons néanmoins remarqué un différentiel de reconnaissance de ces mêmes particules par l'anticorps AP33. Compte-tenu de la configuration particulière de l'épitope reconnu par cet anticorps, ces résultats semblent souligner une différence de mise en conformation de la protéine E2-S en surface des particules S+E2-S générées en cellules CHO et S2. Cette dernière observation a d'ailleurs été confortée par les résultats obtenus avec l'anticorps humain AR3A qui reconnaît un épitope conformationnel de E2. En effet, les protéines E2-S exposées en surface des particules S+E2-S générées en cellules S2 se sont révélées une nouvelle fois être bien mieux reconnues par cet anticorps, suggérant là encore une différence de mise en conformation de la protéine E2-S.

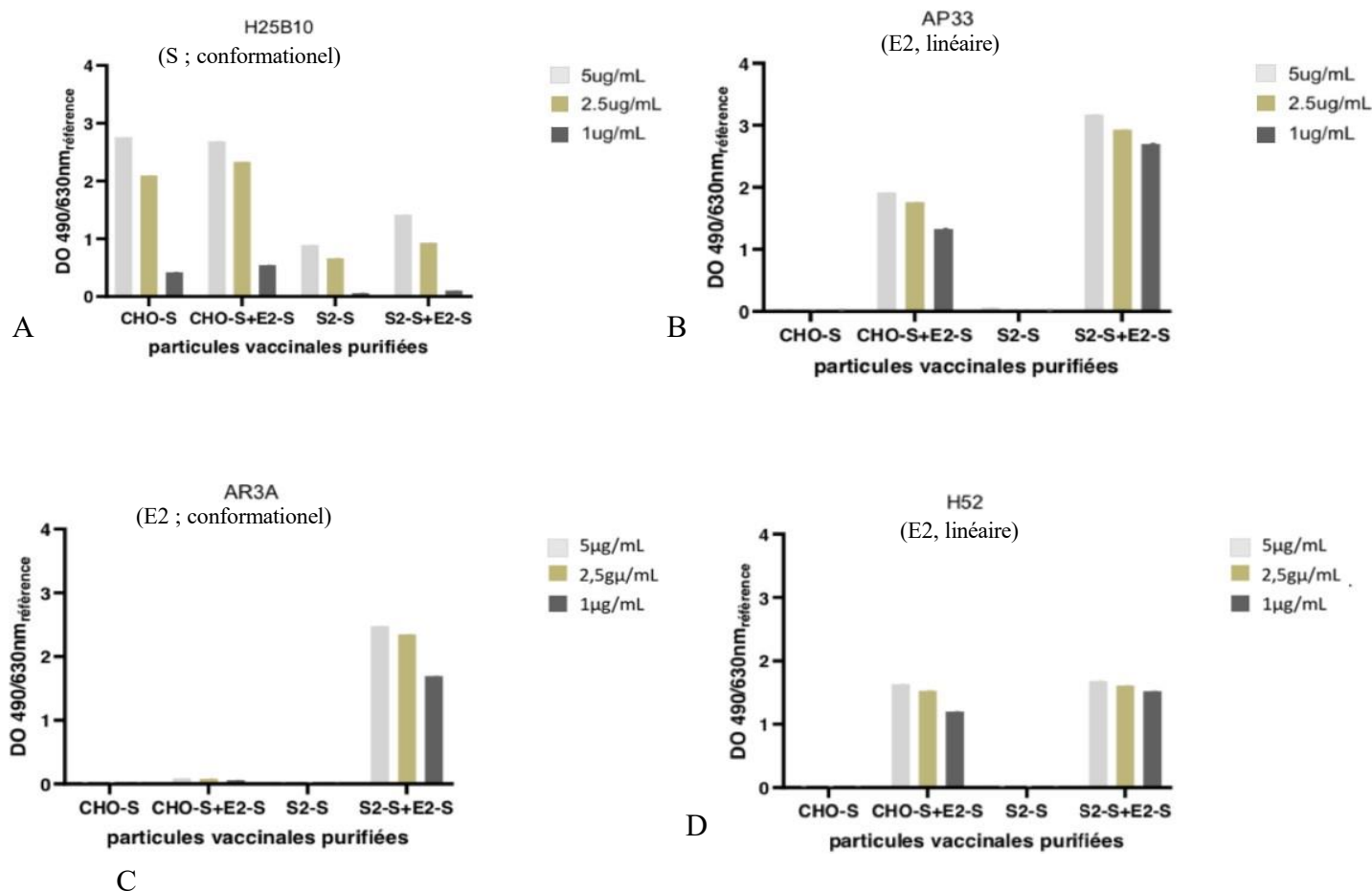


Figure 14. Étude par ELISA de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines d'intérêt S et E2-S en surface de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2. Les particules vaccinales ont tout d'abord été capturées au fond des puits d'une plaque de micro-titration (l'équivalent de 0,8 µg de protéine S/puits) à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15 ; 0,1 µg/puits). Elles ont ensuite été soumises à des tests de reconnaissance par des anticorps monoclonaux ciblant un épitope conformationnel de la protéine S (H25B10 (A)) ou des épitopes linéaires (H52 (D) et AP33 (B)) ou conformationnel (AR3A (C)) de la protéine E2, utilisés à des concentrations de 5, 2,5 ou 1 µg/mL. Les complexes anticorps-particule vaccinale ainsi immobilisés ont ensuite été révélés par l'usage d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP). Après l'ajout du substrat chromogénique (o-phénylènediamine), la réaction colorée catalysée a été mesurée par spectrophotométrie. L'expérience a été réalisée une seule fois et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes des densités optiques (DO) mesurées à des longueurs d'onde de 490 nm/630 nm_{référence}.

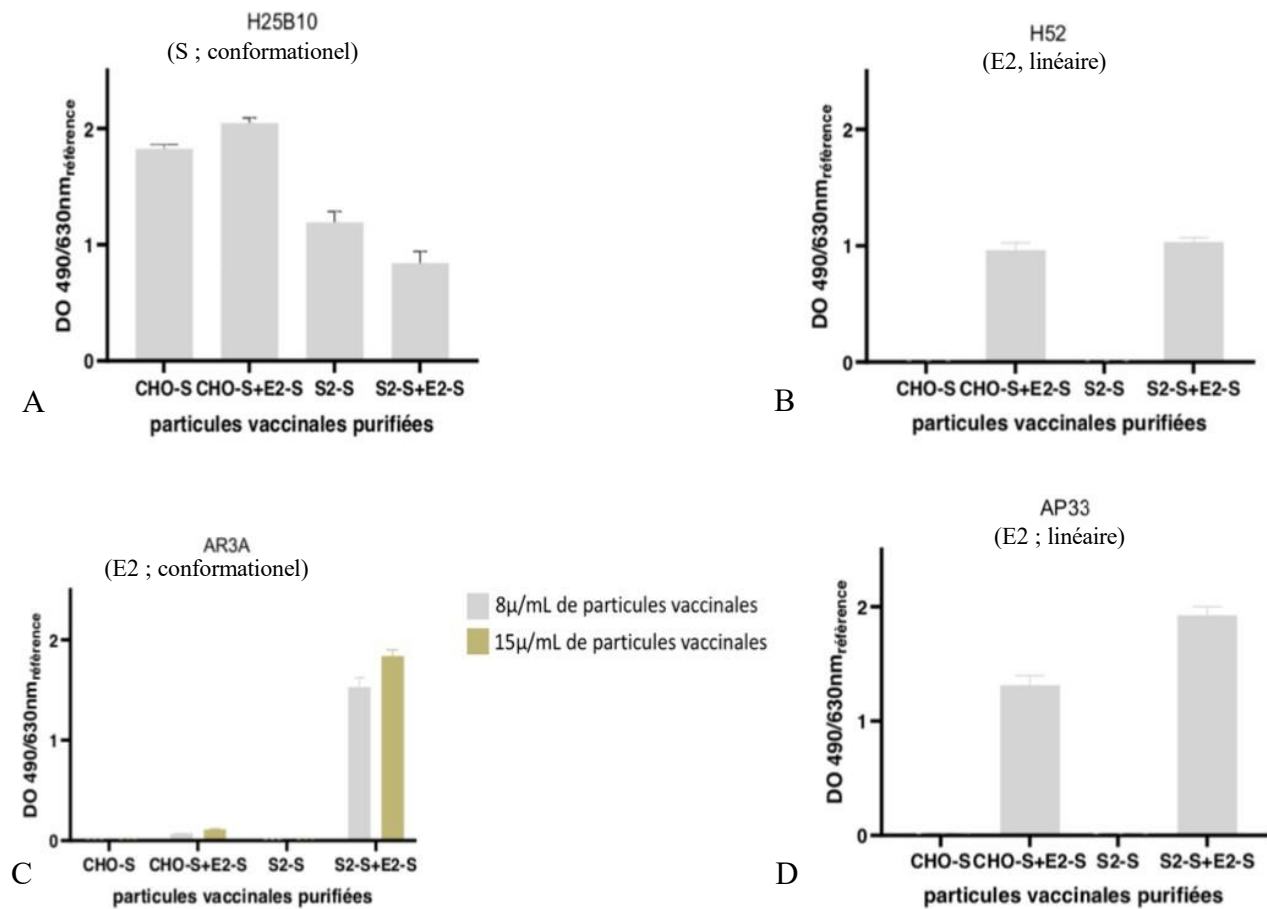


Figure 15. Étude par ELISA de l'incorporation et de la mise en confirmation des protéines d'in- térêt Sur et E2-S en surface de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2. Les particules vaccinales ont tout d'abord été capturées au fond des puits d'une plaque de micro-titration (l'équivalent de 0,8 μg de protéines S/puits ou 0,5 μg de protéines S/puits) à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70GH15 ; 0,1 μg/puits). Elles ont ensuite été soumises à des tests de reconnaissance par des anticorps monoclonaux ciblant une épitope conformationnel de la protéine S (H25B10 (A)) ou des épitopes linéaires (H52 (B) et AP33 (D)) ou conformationnel (AR3A (C)) de la protéine E2, utilisés une concentration de 2,5 μg/mL. Les complexes anticorps-particule vaccinale ainsi immobilisés ont ensuite été révélés par l'usage d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxy- dase de raifort (HRP). Après l'ajout du substrat chromogénique (o-phénylènediamine), la réaction cata- lysée a été mesurée par spectrophotométrie. L'expérience a été réalisée une seule fois, en triplicat et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écart-type des densités optiques (DO) mesurées à des longueurs d'onde de 490nm/630nm_{référence}.

2.3. Observation des particules vaccinales au microscope électronique à transmission et évaluation de l'incorporation et de la mise en conformation des protéines S et E2-S à leur surface

Par la suite, nous avons souhaité poursuivre nos investigations, et notamment observer au microscope électronique à transmission les particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, de manière à non seulement apprécier leur forme et leur taille, mais aussi évaluer l'incorporation et la mise en conformation des protéines S et E2-S à leur surface. Pour ce faire, les particules vaccinales ont tout d'abord été immuno-capturées (en configuration native) sur des grilles de nickel recouvertes de Formvar/carbone et d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15). Ces particules ont ensuite été immuno-marquées par un couple d'anticorps monoclonaux ciblant des épitopes conformationnels des protéines S (H25B10) ou E2 (AR3A) et des anticorps secondaires appropriés couplés à des billes d'or de différents diamètres (billes de 6 nm pour la protéine S et de 10 nm pour la protéine E2-S). Après coloration négative des grilles expérimentales, l'observation de l'ensemble des particules vaccinales au microscope électronique a permis de constater qu'elles se présentaient homogènement sous une forme sphérique et que leur taille avoisinait les 22 nm de diamètre (**Figure 16**). Au reflet des résultats obtenus précédemment par ELISA, des particules présentant une multitude de billes d'or d'une taille de 6 nm à leur périphérie ont été observées pour l'ensemble des lots vaccinaux explorés, ceci confirmant une bonne incorporation et exposition de la protéine S à leur surface. En outre, nous avons remarqué que seules certaines particules S+E2-S générées en cellules CHO ou S2 arboraient des billes d'or d'une taille de 10 nm à leur périphérie, ceci confirmant une bonne incorporation et exposition de la protéine E2-S à leur surface et une bonne spécificité de reconnaissance des anticorps primaires et secondaires utilisés. Sur certaines prises de vue, nous avons même pu mettre en lumière la présence simultanée des immunogènes S et E2-S en surface de certaines particules S+E2-S, comme en témoignent les doubles marquages aux billes d'or de 6 nm et de 10 nm observés.

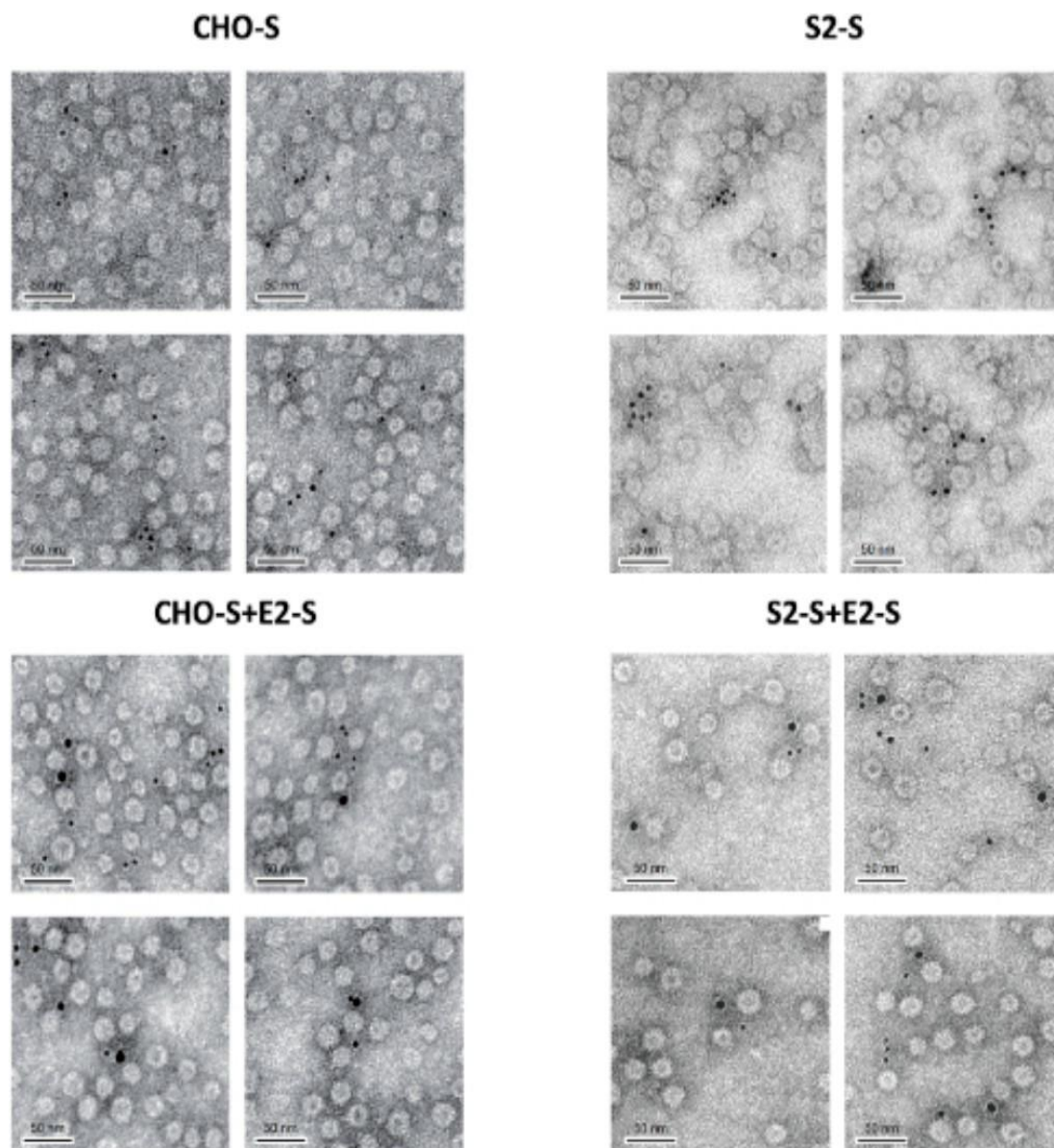


Figure 16. Observation au microscope électronique à transmission des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, et évaluation de l'incorporation et de la mise en conformation des immunogènes d'intérêt S et E2-S à leur surface. Les particules vaccinales ont été capturées sur des grilles de nickel recouvertes de Formvar-carbone (l'équivalent de 7 μg de protéine S) et d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15 ; 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ces particules ont été immuno-marquées par un couple d'anticorps monoclonaux ciblant des épitopes conformationnels des protéines S (H25B10) ou E2 (AR3A), à 100 et 40 g/mL , respectivement. Les complexes antigènes (S ou E2-S)-anticorps ont été révélés par l'usage d'anticorps secondaires appropriés couplés à des billes d'or d'un diamètre de 6 et 10 nm, respectivement. Après coloration négative, les grilles expérimentales ont été observées au microscope électronique à transmission JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd) et les prises de vue ont été réalisées au grossissement $\times 40\,000$ (barre d'échelle : 50 nm).

2.4. Étude du profil de glycosylation des particules vaccinales générées en lignées CHO et S2

a. Analyse par western blot en conditions dénaturantes après traitements par des glycosidases

Dès lors que nous avons montré la bonne incorporation et l'exposition des immunogènes d'intérêt S et E2-S en surface des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, nous nous sommes ensuite tout particulièrement intéressées à leur N-glycosylation. Dans un premier temps, nous avons souhaité déglycosyler pleinement nos immunogènes S et E2-S, en procédant à leur traitement par une amidase qui s'attaque à l'ensemble des N-glycanes, la PNGase F, et les soumettre à une analyse par western blot en conditions dénaturantes comparativement à des immunogènes non traités. Comme attendu après ce traitement de nos différents lots de particules vaccinales, nous avons pu constater que la protéine S présente dans l'ensemble des particules générées était retrouvée uniquement sous sa forme déglycosylée (à un poids moléculaire attendu de 24kDa), contrairement aux particules non traitées qui exhibent encore les deux formes glycosylée/non glycosylée (**Figure 17, A,B**). De la même manière, nous avons pu remarquer après ce même traitement que la protéine E2-S présente dans les particules S+E2-S générées en cellules CHO et S2 n'était plus observable sous sa forme glycosylée, mais uniquement sous sa forme déglycosylée (à un poids moléculaire attendu de 62 kDa), contrairement aux particules non traitées qui présentent essentiellement la forme glycosylée de la protéine (**Figure 17, C,D**).

Dans un second temps, toujours en investiguant des procédés de déglycosylation, nous avons cherché à évaluer le degré de complexité des N-glycanes notamment liés aux immunogènes E2-S (12 sites de N-glycosylation au total), en traitant ces derniers par une endoglycosidase qui s'attaque préférentiellement aux oligosaccharides riches en mannoses ou hybrides, l'endo H, et en les soumettant à une analyse par western blot en conditions dénaturantes, comparativement à des immunogènes E2-S non traités. Après ce traitement de nos différents lots de particules vaccinales, nous avons pu constater que la protéine E2-S présente dans les particules S+E2-S générées en cellules CHO et S2 était retrouvée uniquement sous sa forme déglycosylée (à un poids moléculaire attendu de 62 kDa), contrairement aux particules non traitées qui exhibent essentiellement la forme glycosylée de la protéine (**Figure 17, E**). De manière étonnante, nous avons surtout pu remarquer que l'ensemble des immunogènes E2-S étaient pleinement

déglycosylés, ceci soulignant le fait qu'ils ne présentent que des N-glycanes oligo-mannosidiques ou hybrides sensibles à l'endo H, et non pas des N-glycanes paucimannosidiques qui sont toutefois souvent retrouvés chez les glycoprotéines générées en cellules d'insectes.

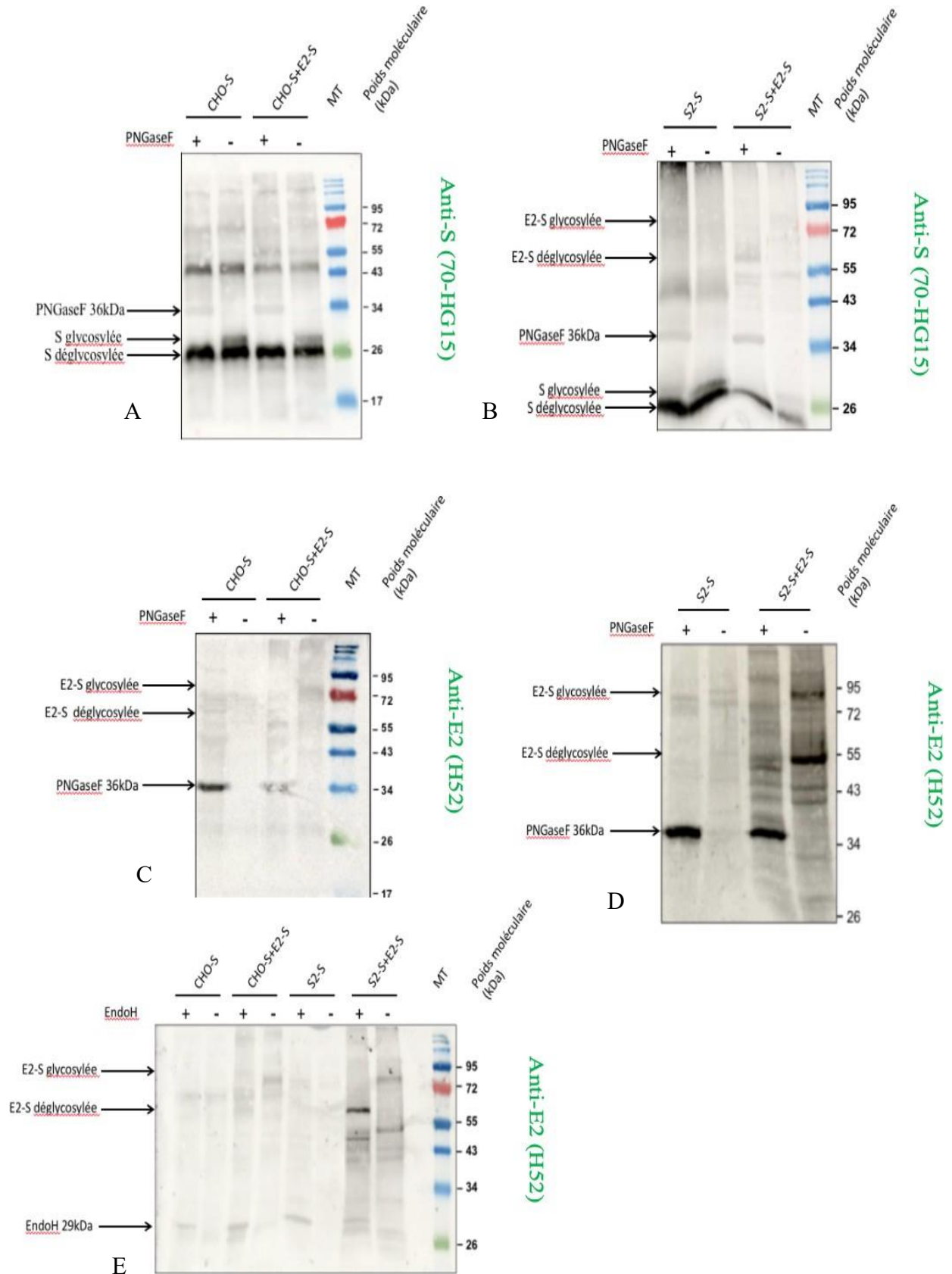


Figure 17. Analyse par western blot en conditions dénaturantes de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2, plus ou moins traitées par des glycosidases. Les particules vaccinales (l'équivalent de 20 µg de protéines totales) ont été dénaturées, plus ou moins traitées par la PNGase F (A,B,C,D) ou l'endo H (E), puis soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide (12%) en présence de SDS. Les protéines d'intérêt ont ensuite été soumises à un électrotransfert sur des membranes de nitrocellulose. Les protéines S et E2-S, pouvant apparaître sous deux formes non glycosylée (24 kDa pour S et 62 kDa pour E2-S) ou glycosylée, ont été mises en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques dilués à 1/500 (anticorps polyclonal 70-HG15 (A,B) et anticorps monoclonal H52 (C,D,E), respectivement) et d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP), et révélées par chimiluminescence grâce au substrat ECL. (MT : Marqueur de poids moléculaire).

b. Identification des N-glycanes par des techniques de Lectine-Blot et Lectine-ELISA

Dans la continuité de nos expérimentations, nous avons souhaité identifier la nature des N-glycanes liés aux protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps développé une technique de lectine-blot reposant sur une analyse des différents lots de particules vaccinales par western blot en conditions dénaturantes et réductrices et sur une phase de révélation des protéines d'intérêt S et E2-S à l'aide d'un panel de lectines reconnaissant spécifiquement certains types de glucides. Bien que ces expériences aient été réalisées à deux reprises, elles n'ont jamais permis une identification claire et certaine des types de N-glycanes liés aux immunogènes S et E2-S, certainement en raison du manque de pureté des préparations (**Figure 18**). En effet, les observations ont systématiquement été contrariées par un ensemble de signaux aspécifiques relatifs certainement à de potentiels contaminants. Seuls certains signaux spécifiques de la protéine S exprimée en cellules CHO et glycosylée semblent se distinguer lors des tests de reconnaissance par les lectines LTL, SNL/EBL et ECL/ECA, suggérant respectivement la potentielle liaison d' α -fucose, d'acides sialiques et de N-acétyllactosamine à cette protéine.

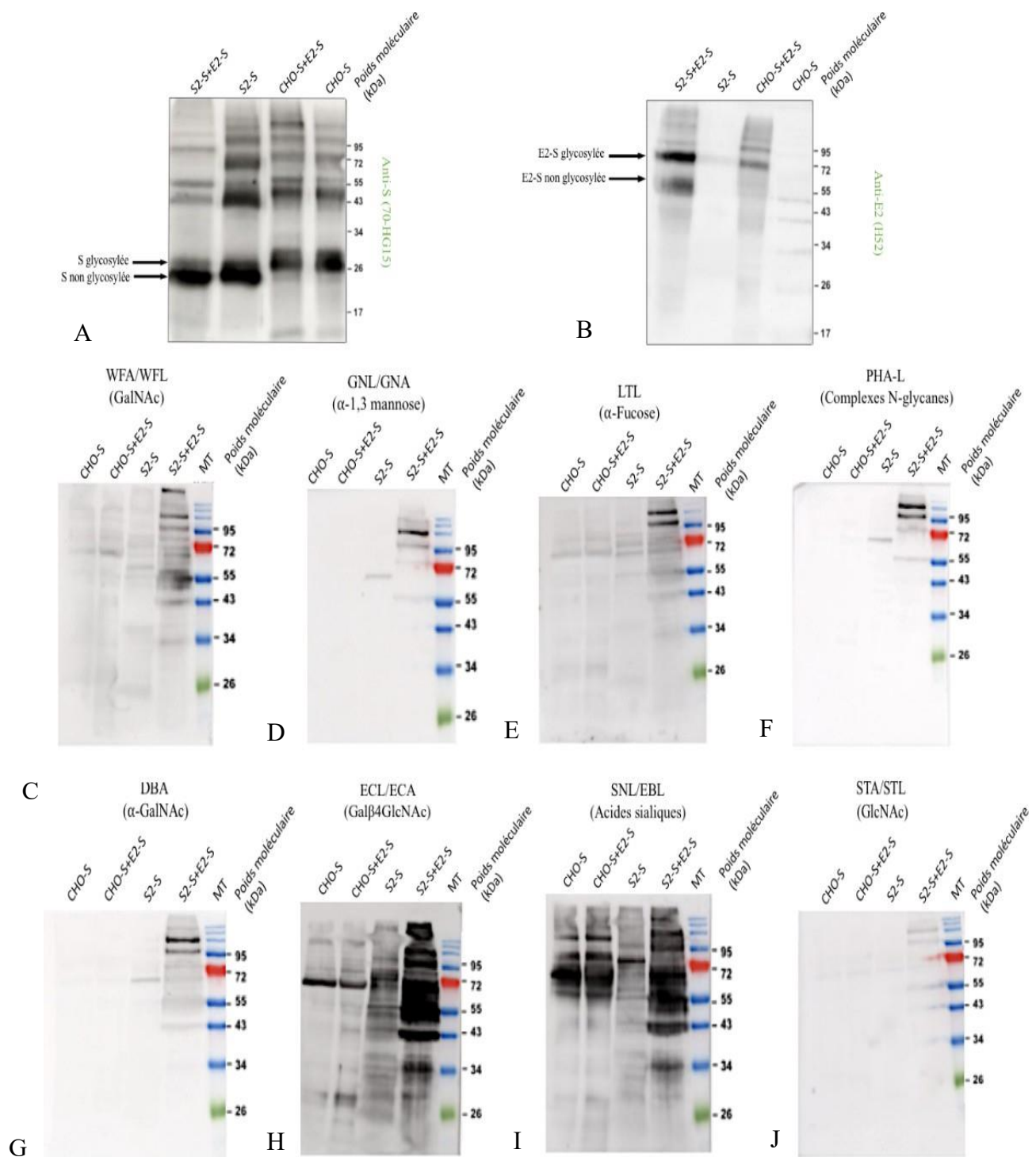


Figure 18. Analyse par lectine-blot de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2 (Figures A – J). Les particules vaccinales (l'équivalent de 2,5 μ g de protéine S) ont été analysées par western-blot en conditions dénaturantes et réductrices. La présence des immunogènes d'intérêt S et E2-S a été confirmée à l'aide d'anticorps primaires anti-S (anticorps polyclonal 70-HG15 (A)) ou anti-E2 (anticorps monoclonal H52 (B)) et d'anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP). Le test lectine-blot a été réalisé grâce à un panel de lectines biotinylées utilisées à une concentration de 5 μ g/mL reconnaissant spécifiquement certains types de glucides et de streptavidine couplée à l'HRP. (MT : Marqueur de poids moléculaire).

Pour pallier ces difficultés, nous avons développé une autre technique dite de lectine-ELISA, qui repose sur une capture au fond des puits d'une plaque de micro-titration des particules vaccinales en conditions natives et sur leur reconnaissance par le même panel de lectines utilisé pour conduire la technique de lectine-blot.

L'avantage de cette technique est que, lors du processus de capture des particules potentiellement associées à d'autres molécules capables d'interagir avec elles, les contaminants libres sont éliminés par les différentes étapes de lavages. De par cette technique, nous avons ainsi pu mettre en évidence une potentielle liaison de N-acétylgalactosamine, d'acides sialiques, d' α -fucose, de N-acétyllactosamine, d' α -N-acétylgalactosamine et de N-acétylglucosamine à l'ensemble des particules vaccinales générées, avec des niveaux globalement étrangement similaires entre les différents types de particules ou parfois quelque peu différents en fonction de la cellule productrice considérée, comme pour la lectine WFA/WFL (**Figure 18**). Certains de ces résultats sont venus conforter les quelques observations faites par lectine-blot, mais demandent toutefois à être confirmés en réitérant les expérimentations. De façon étonnante, nous avons également constaté l'absence de reconnaissance de nos particules par la lectine GNL/GNA, pourtant habituellement utilisée au laboratoire pour capturer nos particules vaccinales en ELISA, ou encore par la lectine PHA-L.

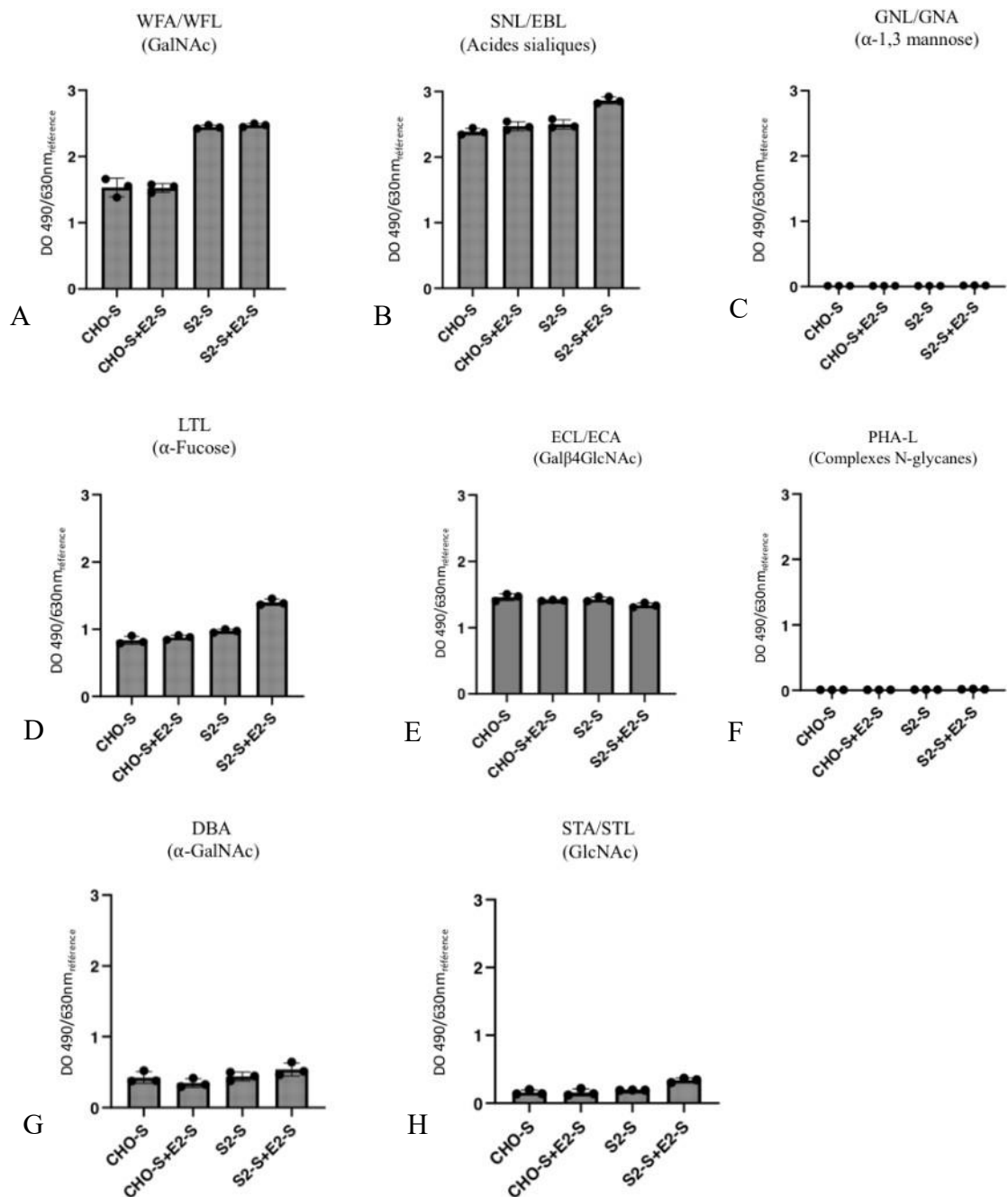


Figure 19. Analyse par lectine-ELISA de l'état de glycosylation des protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en lignées CHO et S2 (Figures A – H). Les particules vaccinales ont été capturées au fond des puits d'une plaque de micro-titration (l'équivalent de 2,5 µg de protéine S/puits) à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la protéine S du VHB (70HG15 ; 0,1 µg/puits). Des lectines biotinylées reconnaissant spécifiquement certains types de glucides ont été utilisées à une concentration de 10µg/mL. Les complexes lectine-particule vaccinale (glycanes) ainsi immobilisés ont été révélés par la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP). Après l'ajout du substrat chromogénique (o-phénylènediamine), la réaction colorée catalysée a été mesurée par spectrophotométrie. L'expérience a été réalisée une seule fois en triplicat et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écart-type des densités optiques (DO) mesurées à des longueurs d'onde de 490 nm/630nm_{réf}.

III. Discussion

Les infections chroniques par le VHC et le VHB affectent de nos jours respectivement environ 50 millions et 296 millions de personnes à travers le monde ce qui constitue un défi majeur de santé publique. Bien que les thérapeutiques actuelles soient très efficaces et permettent le contrôle des infections induites par les différents génotypes, le réservoir mondial d'individus infectés ne cesse d'augmenter chaque année avec 1,3 million de décès combinés représentant un défi de santé publique majeur (OMS, 2024). Malgré des avancées thérapeutiques, l'épidémie ne régresse pas à la hauteur des objectifs mondiaux.

Concernant l'hépatite B, bien qu'il n'existe actuellement aucun traitement capable d'éradiquer définitivement l'hépatite B, les thérapies antivirales modernes permettent de contrôler efficacement l'infection, de réduire les risques de complications, et d'améliorer la qualité de vie des patients. Cependant, de nouvelles approches thérapeutiques, y compris des traitements immunologiques et des stratégies combinées, sont activement explorées pour répondre aux défis persistants liés à l'hépatite B chronique. Bien qu'il existe un vaccin sûr et efficace, la couverture vaccinale reste tout de même partielle.

La bioproduction du vaccin contre l'hépatite B repose sur des technologies avancées d'expression recombinante de l'antigène de surface (HBsAg) dans *Saccharomyces cerevisiae* et des procédés de purification rigoureux tels que la chromatographie d'affinité, garantissant sécurité et efficacité avec notamment une absence de risque de soumission aux pathogènes humains. Le vaccin peut être produit en plus grande quantité avec une indépendance vis-à-vis des donneurs de plasma. Les coûts de productions sont réduits avec un processus optimisé et un rendement élevé. Les vaccins de deuxième génération, notamment Engerix-B et des formulations récentes comme Heplisav-B, offrent une immunogénicité renforcée grâce à des adjuvants novateurs. Le vaccin Heplisav-B contient notamment un HBsAg recombinant combiné à un nouvel adjuvant agoniste du récepteur 9 de type Toll-like qui contient des motifs CpG immunostimulateurs qui en se fixant à ce récepteur, stimule les cellules B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ainsi l'immunogénicité du vaccin s'élève de 20 à 60% chez les personnes à risque notamment les personnes immunodéprimées (Zhao et al, 2020).

L'évolution des biotechnologies ouvre la voie à des vaccins encore plus performants, accessibles et adaptés aux besoins mondiaux. L'amélioration des systèmes de production et la

recherche sur de nouveaux adjuvants et modes d'administration permettront d'optimiser encore davantage la prévention de cette infection virale à l'échelle mondiale. Malgré ses avantages, la bioproduction des vaccins contre l'hépatite B présente encore des défis tels que l'optimisation des lignées cellulaires pour faciliter la synthèse et la purification et ainsi augmenter la production d'HBsAg. Mais également le développement de nouvelles formulations, comme l'utilisation d'adjuvants alternatifs qui permettraient de renforcer l'immunogénicité. Sont également envisagés des alternatives aux systèmes d'expression actuels telles que les cellules végétales (Thanavala *et al*, 1995).

Dans le contexte de contrôle de l'épidémie à l'échelle mondiale avec notamment l'absence d'un vaccin efficace contre l'hépatite C, l'UMR 1259 MAVIVHe a développé une stratégie vaccinale prometteuse, reposant sur l'utilisation des protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC qui ont préalablement été fusionnées à la protéine S du VHB et qui s'assemblent en particules très immunogènes, non infectieuses et sécrétées (Patent *et al.*, 2009). C'est notamment la stratégie utilisée dans le vaccin Mosquirix (RTS,S) contre le paludisme, dans lequel une protéine de sporozoïte de *Plasmodium* est fusionnée à une protéine du VHB en raison de sa forte immunogénicité (Fidel, 2022). L'unité a mené une analyse comparative de son candidat vaccin VHB-VHC, généré à l'aide de différents systèmes d'expression engendrant des processus de glycosylation distincts (notamment cellules de mammifères et d'insecte), de manière à déterminer l'état de glycosylation conférant une immunogénicité optimale et engendrant la production d'anticorps très largement neutralisants. On retrouve essentiellement dans les cellules de mammifères, une N-glycosylation de type oligomannosidique (caractérisé par de longues chaînes de mannoses), complexe (caractérisé par des chaînes formées de N-acétylglucosamine, de galactose, de fructose ou d'acide sialique) ou encore hybride. Dans les cellules d'insectes on retrouve essentiellement une N-glycosylation de type oligomannosidique et paucimannosidique bien moins complexe que celle observée en cellules de mammifères. Et enfin, en cellule de levures, une N-glycosylation de types oligomannosidique est retrouvée.

Différents lots de particules vaccinales ont été mis à ma disposition : des particules vaccinales S et S+E2-S produites en cellules CHO, couramment utilisées pour la production de protéines recombinantes à usage thérapeutique) et des particules S produites en cellules de drosophile (cellules S2). Au cours de ce stage, j'ai eu l'opportunité de participer activement à la constitution de ce nouveau stock de particules, notamment en remettant en culture le clone

cellulaire S2 co-exprimant de manière stable les gènes codant les protéines S et E2-S et en procédant à la production/purification en masse des particules d'intérêt S+E2-S. Par la suite, j'ai également contribué à la caractérisation de ce nouveau lot vaccinal, en termes de concentration en protéine S (directement corrélée à la concentration en particules présentes dans la préparation) et de pureté. A cette occasion, nous en avons profité pour réévaluer les lots déjà disponibles, mis à ma disposition à mon arrivée. En tenant compte du volume de surnageant de culture à partir duquel les différentes particules vaccinales ont été purifiées et en prenant en considération les concentrations en protéines S déterminées pour chacune des préparations et les volumes globaux de vaccins préparés, nous avons pu définir les différents rendements de production/purification particuliers. Nous avons ainsi pu constater que les procédés de production des particules vaccinales en cellules de drosophile nous permettaient d'atteindre des rendements de 2 (pour les particules S+E2-S) à 6 fois (pour les particules S) supérieurs à ceux observés en cellules CHO, mais que ces rendements restaient toutefois faibles par rapport à nos attentes. En effet, les productions de protéines recombinantes en cellules d'insectes sont relativement simples et rapides à mettre en œuvre et se caractérisent habituellement par des concentrations très importantes, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes de protéines par litre de surnageant de culture. De la même manière, nous avons également constaté que nos différents lots vaccinaux présentaient des degrés de pureté très faibles (allant de 4 à 8%). En système d'expression CHO, cette faible pureté s'explique notamment du fait que les cultures cellulaires sont conduites en présence de faibles pourcentages de sérum de veau fœtal riche en protéines, et notamment en albumine (67 kDa). Ces protéines sériques, représentant les principaux contaminants de nos lots vaccinaux produits en cellules CHO, sont difficilement éliminées par nos procédés de purification restant très académiques. Puisque les cellules de drosophile S2 sont cultivées dans un milieu dépourvu de protéines, la faible pureté observée pour les deux lots vaccinaux S2-S et S2-S+E2-S peut cette fois-ci s'expliquer possiblement par des phénomènes de lyse cellulaire survenant lors de la phase de production en masse des particules et relarguant de nombreux contaminants cellulaires alors même que les concentrations et la viabilité cellulaire avaient été contrôlées tout au long du processus de production. Pour améliorer la qualité des différents lots vaccinaux, il faudrait que l'unité fasse évoluer ses procédés académiques de production et purification en masse vers des procédés respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF), c'est-à-dire en utilisant des bioréacteurs régulant tous les paramètres physico-chimiques liés à la survie cellulaire, en s'affranchissant de l'utilisation du sérum

de veau fœtal et en utilisant des procédés de purification plus performants et en adéquation avec un maintien de la conformation des immunogènes d'intérêt.

Dès lors que nous avons été en possession des différents types de particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, nous avons alors débuté leur caractérisation. Nous avons tout d'abord analysé ces particules en conduisant un western blot en conditions dénaturantes et réductrices de manière à nous assurer de la bonne incorporation des protéines d'intérêt S et E2-S. De par cette technique, nous sommes parvenus à montrer que les immunogènes S et/ou E2-S entraient bien dans la composition des particules S et/ou S+E2-S, sous leurs deux formes non glycosylée et glycosylée. De façon récurrente, nous avons constaté que les particules générées en cellules CHO arboraient principalement les formes glycosylées de ces protéines, alors que les particules générées en cellules S2 pouvaient présenter les deux formes, mais avec toutefois une prédominance systématique de leur forme non glycosylée. Ces résultats sont venus souligner le net différentiel de procédé de glycosylation entre les deux systèmes d'expression, différentiel qui a d'ailleurs été corroboré par les poids moléculaires des protéines glycosylées exprimées en cellules d'insecte qui se sont révélés légèrement inférieurs à ceux observés pour les protéines glycosylées produites en cellules de mammifère, ceci soulignant l'existence de N-glycosylations moins complexes. Au cours de cette expérience, nous ne sommes pas parvenus à mettre en lumière la protéine E2-S lors d'un marquage de la membrane avec un anticorps anti-S (70-HG15). Ceci peut s'expliquer par la polyclonalité de cet anticorps qui le conduit à engendrer l'apparition de nombreux signaux aspécifiques gênant nos observations. Une solution à cette problématique pourrait être d'utiliser un anticorps monoclonal anti-S présentant une meilleure spécificité de reconnaissance.

Par la suite, nous avons approfondi nos investigations et cherché à montrer que ces immunogènes S et E2-S, outre le fait d'être présents dans les particules, étaient bien exposés en surface de ces dernières et dans une conformation adéquate. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre une technique ELISA en conditions natives qui nous a permis d'évaluer les capacités d'un panel d'anticorps, ciblant des épitopes linéaires ou conformationnels des protéines S et E2-S, à reconnaître spécifiquement les particules vaccinales S et S+E2-S générées en lignées CHO et S2.

Au reflet des résultats de western blot précédents, nous sommes parvenus de par cette technique à démontrer la bonne incorporation et exposition de la protéine S en surface de l'ensemble des particules d'intérêt. En ELISA, nous avons toutefois observé une capacité moindre de l'anticorps anti-S (H25B10) à reconnaître les protéines S exposées en surface des particules S et S+E2-S générées en cellules S2. Comme les niveaux d'incorporation en protéines S et/ou E2-S en surface des particules générées en cellules S2 et CHO semblent similaires, nous pourrions expliquer ce phénomène par le fait que l'épitope conformationnel reconnu par l'anticorps H25B10 soit dans une mauvaise configuration suite au repliement de la protéine S (et d'éventuelles molécules cellulaires associées pouvant être propres au système d'expression) ou qu'il soit masqué par les protéines E2-S dont la mise en conformation est dépendante de la glycosylation, mais aussi des éventuelles molécules cellulaires associées. La seconde possibilité est toutefois moins plausible puisque ce défaut de reconnaissance est également observé pour les particules S2-S, dépourvues d'immunogènes E2-S. Conformément aux résultats obtenus par western blot, nous avons également réussi à mettre en lumière la bonne incorporation et la bonne exposition de la protéine E2-S en surface de l'ensemble des particules S+E2-S générées en cellules S2 et CHO, avec des niveaux relativement comparables, comme en témoignent les densités optiques observées avec l'anticorps H52 qui reconnaît un épitope linéaire de la protéine E2. Dès lors que nous avons utilisé des anticorps anti-E2 reconnaissant des épitopes présentés dans une configuration particulière (AP33 : épitope linéaire dans une configuration de boucle type « épingle à cheveux » ; AR3A : épitope conformationnel), nous avons observé des différentiels de reconnaissance des particules S+E2-S générées en CHO ou S2, soulignant une différence de repliement et de mise en conformation de la protéine E2-S en surface des particules. Il est vrai que la reconnaissance des immunogènes E2-S exprimés en cellules S2 de drosophile par l'anticorps anti-E2 AR3A est remarquable et d'autant plus encourageante que cet anticorps a été isolé à partir d'un patient infecté par une souche de VHC circulante (Giang et al., 2012) et reconnaît un épitope très conservé entre les différents géotypes du VHC. Outre le fait que la moindre glycosylation engendrée par les cellules de drosophile S2 puisse favoriser l'accessibilité à l'épitope reconnu par cet anticorps, cette excellente reconnaissance des protéines E2-S générées en cellules S2 souligne en plus le fait que le repliement de cette protéine se fasse dans une configuration proche de celle observée lors d'une infection naturelle. A l'inverse, la très faible reconnaissance des protéines E2-S générées en cellules CHO par l'anticorps AR3A a

conduit l'unité à se poser de sérieuses questions quant à l'utilisation de ce système pour produire en masse le candidat vaccin, la cellule de mammifère CHO n'étant pas la candidate idéale pour mimer au mieux l'interface virale. Bien que la cellule CHO soit issue d'un petit mammifère (hamster chinois), elle est toutefois très différente des hépatocytes qui constituent le site préférentiel de l'infection naturelle par le VHC, non seulement au niveau de sa glycosylation, beaucoup moins complexe, mais aussi au niveau du métabolisme des lipides et des glucides.

Dans la continuité de ces expérimentations, nous sommes parvenus à observer au microscope électronique à transmission les particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, et à apprécier leur forme homogène sphérique et leur taille de 22 nm de diamètre. Par ailleurs, nous sommes parvenus de par cette nouvelle technique conduite en conditions natives à confirmer la bonne incorporation et mise en conformation des protéines S et E2-S à leur surface, au reflet des résultats obtenus en ELISA. La protéine S a bien été identifiée à la surface de l'ensemble des particules vaccinales et la protéine E2 a pu être identifiée à la surface des particules S+E2-S générées en cellules S2 et CHO grâce à l'utilisation de l'anticorps AR3A qui reconnaît un épitope conformationnel extrêmement complexe à la surface de E2. Cette approche expérimentale n'étant que qualitative, nous n'avons toutefois pas eu l'opportunité d'apprécier les différentiels de reconnaissance par les anticorps AR3A et AP33 observés précédemment par ELISA. Par contre, nous sommes parvenus dans de rares cas à mettre en évidence la présence des immunogènes S et E2-S en surface d'une même particule S+E2-S, générée en cellules S2 ou en cellules CHO. Même si ces observations se font rares, cela ne signifie pas pour autant que cette co-expression des deux immunogènes d'intérêt en surface des particules soit réellement si peu fréquente. Cette technique est complexe de mise en œuvre car bien que l'immuno-capture des particules nous permette l'observation d'une grande quantité de particules, elle provoque quand même un important encombrement stérique qui empêche les anticorps de trouver correctement leur cible. Pour pallier ces problématiques d'encombrement stérique, une solution pourrait être de conduire une nouvelle série d'immuno-marquages en maintenant une concentration constante en anticorps (AR3A et H25B10), mais en procédant à des captures de quantités décroissantes de particules sur les grilles, de manière à définir les conditions adéquates pour observer une grande quantité de particules, tout en restant facilement marquées par les anticorps d'intérêt. D'autres options pourraient être de ne pas faire d'immuno-capture préalable à l'im-

immuno-marquage, mais le risque serait d'observer trop peu de particules, ou encore de s'affranchir de l'étape de capture des particules et de concentrer les préparations avant immuno-marquages, mais le risque serait de concentrer les contaminants qui pourraient eux aussi provoquer un encombrement stérique.

Dès lors que nous sommes parvenus à montrer la bonne incorporation et exposition des immunogènes d'intérêt S et E2-S en surface des particules vaccinales générées en cellules CHO et S2, nous nous sommes ensuite tout particulièrement intéressés à leur N-glycosylation. En procédant au traitement de nos différentes particules par la PNGase F et l'Endo H, nous cherchions avant toute chose à comparer la N-glycosylation engendrée par les cellules CHO et S2, et à évaluer le degré de complexité des N-glycanes liés par chacun de ces systèmes d'expression. Contrairement aux connaissances relatives aux processus de glycosylation engendrés par les cellules de mammifère et d'insecte (liaison de N-glycanes principalement de type oligomannosidique, complexe ou hybrides pour les cellules CHO et liaison de N-glycanes principalement de type oligomannosidique et paucimannosidique pour les cellules S2) et à ce qui avait pu être reporté dans la littérature par les équipes de recherche développant un vaccin basé sur l'usage d'une protéine d'enveloppe E2 soluble exprimée en cellule d'insecte ou de mammifère (Li et al., 2016 ; Urbanowicz et al., 2019), nous avons été étonnés de remarquer que l'ensemble des immunogènes E2-S exprimés en cellules CHO, et surtout en cellules S2, étaient pleinement déglycosylés par l'Endo H, et qu'ils présentaient essentiellement des N-glycanes oligomannosidiques ou hybrides sensibles à l'Endo H, et non pas des N-glycanes paucimannosidiques qui sont pourtant souvent retrouvés chez les glycoprotéines générées en cellules d'insecte. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la nature même de l'immunogène utilisé. Dans les travaux de Li *et al.* (2016) et de Urbanowicz *et al.* (2019), la protéine E2 est déletée de son DTM et se présente sous une forme soluble, engendrant certainement une conformation moins dépliée et moins propice aux processus de glycosylation. Dans notre cas, la protéine E2 est utilisée dans son entièreté, avec son DTM qui permet un ancrage de la protéine et certainement un meilleur déploiement de la protéine, plus propice à une glycosylation complexe.

Dans la continuité, de nos expérimentations, nous avons souhaité identifier la nature des N-glycanes liés aux protéines S et E2-S incorporées dans les particules vaccinales générées en

lignées CHO et S2. Pour ce faire, nous avons développé deux techniques faisant appel à un panel de lectines reconnaissant spécifiquement certains types de glucides. Malheureusement, ces expériences de lectine-blot et lectine-ELISA n'ont pas permis une identification claire des types de N-glycanes liés aux protéines S et E2-S, certainement en raison du manque de pureté des préparations. Dans le cas des expériences de lectine-blot, les observations ont systématiquement été contrariées par des signaux aspécifiques relatifs certainement à des contaminants. Dans le cas des expériences de lectine-ELISA, les résultats se sont révélés aberrants. En effet, nous avons par exemple mis en évidence une potentielle liaison d'acides sialiques aux protéines exprimées en cellules d'insecte S2, alors que la sialylation est décrite comme inexistante en cellules d'insecte (Gomez et al., 2014). De plus, en utilisant la lectine GNL/GNA, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence d' α -1,3 mannose, alors que les N-glycanes liés par les cellules de mammifère et d'insecte sont essentiellement de cette nature et que cette lectine est classiquement utilisée au laboratoire pour capturer les particules vaccinales. Il semblerait donc que nos lectines biotinylées ne soient pas toutes fonctionnelles ou qu'elles réagissent de manière non spécifique avec certains éléments présents dans les préparations. De manière à assigner correctement les N-glycanes à chaque système d'expression, il serait nécessaire de faire une caractérisation par spectrométrie de masse, mais cette méthode requiert au préalable d'obtenir un bon niveau de pureté des échantillons, ce qui n'est pas le cas actuellement. L'unité travaille aujourd'hui à l'optimisation des conditions de production comme la suppression du sérum de veau fœtal, pouvant contenir des contaminants, dans le processus de production et travaille également l'optimisation des procédés de purification des particules, le tout en assurant d'une bonne conservation de la conformation des immunogènes d'intérêt. Il serait également intéressant d'étudier la N-glycosylation de ses particules vaccinales en cellule de levure ce qui n'a pas pu être traité durant ce projet. Cependant, les glycosylations sont encore d'une autre nature dans ce système d'expression.

Pour conclure les hépatites B et C constituent un défi majeur de santé publique avec respectivement près de 296 et 50 millions de personnes infectées dans le monde, responsables de 1,3 million de décès annuels. Si les traitements antiviraux actuels permettent de contrôler efficacement ces infections, l'absence de guérison définitive pour le VHB et l'absence de vaccin contre le VHC freinent l'atteinte des objectifs mondiaux d'élimination.

La vaccination contre l'hépatite B repose aujourd'hui sur la bioproduction recombinante de l'antigène de surface (HBsAg), principalement dans *Saccharomyces cerevisiae*. Cette technologie permet une production sécurisée, standardisée et à coûts réduits, avec des vaccins de deuxième génération (Engerix-B, Heplisav-B, Fendrix) offrant une meilleure immunogénicité, notamment chez les patients immunodéprimés. Néanmoins, des améliorations restent nécessaires concernant le rendement, la pureté des préparations et l'utilisation d'adjuvants plus innovants à l'origine d'une meilleure immunogénicité.

Dans ce contexte, de nouvelles stratégies de bioproduction émergent, notamment le développement de vaccins bivalents VHB-VHC. L'unité MAVIVHe a mis au point des particules pseudo-virales associant les protéines d'enveloppe du VHC (E1/E2) et la protéine S du VHB, produites dans différents systèmes d'expression (cellules CHO de mammifère et cellules S2 d'insecte). Les résultats montrent que les cellules S2 offrent de meilleurs rendements mais une pureté moindre, tandis que la glycosylation des immunogènes diffère selon le système, influençant leur reconnaissance par les anticorps neutralisants. Ces travaux soulignent l'importance de l'optimisation des procédés de production (bioréacteurs GMP, purification avancée, analyse fine par spectrométrie de masse) pour améliorer l'efficacité et la reproductibilité des candidats vaccins. La bioproduction à moindre coût (plantes, levures, insectes) pourraient faciliter l'accès aux vaccins dans les pays à revenu faible ou intermédiaire.

En officine, ces avancées se traduisent par une perspective de mise à disposition de vaccins plus efficaces, mieux tolérés et adaptés aux populations vulnérables. L'officine devient un lieu de vaccination de proximité, ce qui facilite la couverture vaccinale contre l'hépatite B. Le pharmacien d'officine jouera un rôle clé dans la dispensation, la vaccination et l'éducation des patients, contribuant ainsi directement au contrôle des hépatites virales à l'échelle mondiale. Ainsi, les innovations biotechnologies alliés à l'intégration du pharmacien dans les campagnes vaccinales renforcent la perspective d'atteindre l'objectif fixé par l'OMS d'élimination des hépatites virales à l'horizon 2030.

Références bibliographiques

Adkins, J C, et A J Wagstaff. « Vaccin recombinant contre l'hépatite B : un examen de son immunogénicité et de son efficacité protectrice contre l'hépatite B. » *BioDrugs : immunothérapie clinique, biopharmaceutiques et thérapie génique* vol. 10,2 (1998) : 137-58. doi:10.2165/00063030-199810020-00005

André, P et al. "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." *Journal of virology* vol. 76,14 (2002): 6919-28. doi:10.1128/jvi.76.14.6919-6928.2002

Barnes, Eleanor et al. "Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man." *Science translational medicine* vol. 4,115 (2012): 115ra1. doi:10.1126/scitranslmed.3003155

Bartenschlager, Ralf et al. "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." *Nature reviews. Microbiology* vol. 11,7 (2013): 482-96. doi:10.1038/nrmicro3046

Beaumont, Elodie et al. "Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 57,4 (2013): 1303-13. doi:10.1002/hep.26132

Beaumont, Elodie et al. "Hepatitis C Virus E1 and E2 Proteins Used as Separate Immunogens Induce Neutralizing Antibodies with Additive Properties." *PloS one* vol. 11,3 e0151626. 11 Mar. 2016, doi:10.1371/journal.pone.0151626

Beaumont, Elodie et al. "Mixing particles from various HCV genotypes increases the HBV-HCV vaccine ability to elicit broadly cross-neutralizing antibodies." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* vol. 40,8 (2020): 1865-1871. doi:10.1111/liv.14541

Blumberg, B S. "Australia antigen and the biology of hepatitis B." *Science (New York, N.Y.)* vol. 197,4298 (1977): 17-25. doi:10.1126/science.325649

Borgia, Sergio M et al. "Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes." *The Journal of infectious diseases* vol. 218,11 (2018): 1722-1729. doi:10.1093/infdis/jiy401

Burki, Talha. "WHO's 2024 global hepatitis report." *The Lancet. Infectious diseases* vol. 24,6 (2024): e362-e363. doi:10.1016/S1473-3099(24)00307-4

Choo, Q L et al. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science (New York, N.Y.)* vol. 244,4902 (1989): 359-62. doi:10.1126/science.2523562

Duvet, S et al. "Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval." *The Journal of biological chemistry* vol. 273,48 (1998): 32088-95. doi:10.1074/jbc.273.48.32088

European Association for the Study of the Liver. "EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection." *Journal of hepatology* vol. 67,2 (2017): 370-398. doi:10.1016/j.jhep.2017.03.021

Farci, Patrizia. "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;244:359-362]." *Journal of hepatology* vol. 36,5 (2002): 582-5. doi:10.1016/s0168-8278(02)00051-x

Fidel, Zavala. « RTS,S : le premier vaccin contre le paludisme. » *Le Journal d'investigation clinique* vol. 132,1 (2022) : e156588. doi:10.1172/JCI156588

Freedman, Holly et al. "Computational Prediction of the Heterodimeric and Higher-Order Structure of gpE1/gpE2 Envelope Glycoproteins Encoded by Hepatitis C Virus." *Journal of virology* vol. 91,8 e02309-16. 29 Mar. 2017, doi:10.1128/JVI.02309-16

Frey, Sharon E et al. "Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults." *Vaccine* vol. 28,38 (2010): 6367-73. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.084

Gary Kobs "EndoH application : Monitoring proteines trafficking" (2012)

Giang, Erick et al. "Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109,16 (2012): 6205-10. doi:10.1073/pnas.1114927109

Goffard, Anne, and Jean Dubuisson. "Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins." *Biochimie* vol. 85,3-4 (2003): 295-301. doi:10.1016/s0300-9084(03)00004-x

Gomez-Escobar, Elsa et al. "Current Hepatitis C Vaccine Candidates Based on the Induction of Neutralizing Antibodies." *Viruses* vol. 15,5 1151. 11 May. 2023, doi:10.3390/v15051151

Helle, François et al. "The hepatitis C virus glycan shield and evasion of the humoral immune response." *Viruses* vol. 3,10 (2011): 1909-32. doi:10.3390/v3101909

Kay, Alan, and Fabien Zoulim. "Hepatitis B virus genetic variability and evolution." *Virus research* vol. 127,2 (2007): 164-76. doi:10.1016/j.virusres.2007.02.021

Law, John Lok Man et al. "A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans." *PloS one* vol. 8,3 (2013): e59776. doi:10.1371/journal.pone.0059776

Li, Dapeng et al. "Altered Glycosylation Patterns Increase Immunogenicity of a Subunit Hepatitis C Virus Vaccine, Inducing Neutralizing Antibodies Which Confer Protection in Mice." *Journal of virology* vol. 90,23 10486-10498. 14 Nov. 2016, doi:10.1128/JVI.01462-16

Lok, Anna S F, and Brian J McMahon. "Chronic hepatitis B: update 2009." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 50,3 (2009): 661-2. doi:10.1002/hep.23190

Maupas, P et al. "Immunisation against hepatitis B in man." *Lancet (London, England)* vol. 1,7974 (1976): 1367-70. doi:10.1016/s0140-6736(76)93023-3

Meunier, J C et al. "Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex." *The Journal of general virology* vol. 80 (Pt 4) (1999): 887-896. doi:10.1099/0022-1317-80-4-887

Michel, Marie-Louise. "Vaccination contre l'hépatite B - Succès et perspectives" [Vaccination against hepatitis B: success and challenges]. *Medecine sciences : M/S* vol. 32,8-9 (2016): 739-45. doi:10.1051/medsci/20163208022

Op De Beeck, Anne et al. "Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *The Journal of general virology* vol. 82,Pt 11 (2001): 2589-2595. doi:10.1099/0022-1317-82-11-2589

Page, Kimberly et al. "Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection." *The New England journal of medicine* vol. 384,6 (2021): 541-549. doi:10.1056/NEJMoa2023345

Pawlotsky. "Hepatitis C virus." *Médecine/Sciences* vol. 18,3 (2002): 303-14. doi:10.1051/medsci.2002183303

Patient, Romuald et al. "Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies." *New biotechnology* vol. 25,4 (2009): 226-34. doi:10.1016/j.nbt.2009.01.001

Phelps, Christopher C et al. "Where to Next? Research Directions after the First Hepatitis C Vaccine Efficacy Trial." *Viruses* vol. 13,7 1351. 13 Jul. 2021, doi:10.3390/v13071351

Piver, Eric et al. "Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture." *Gut* vol. 66,8 (2017): 1487-1495. doi:10.1136/gutjnl-2016-311726

Roger, Steven et al. "HCV virology and diagnosis." *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* vol. 45,3 (2021): 101626. doi:10.1016/j.clinre.2021.101626

Roingeard, Philippe, and Elodie Beaumont. "Hepatitis C Vaccine: 10 Good Reasons for Continuing." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 71,5 (2020): 1845-1850. doi:10.1002/hep.31182

Smith, Donald B et al. "Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 59,1 (2014): 318-27. doi:10.1002/hep.26744

Swadling, Leo et al. "A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory." *Science translational medicine* vol. 6,261 (2014): 261ra153. doi:10.1126/scitranslmed.3009185

Thanavala, Y et al. « Immunogénicité de l'antigène de surface de l'hépatite B dérivé de plantes transgéniques. » *Actes de l'Académie nationale des sciences des États-Unis d'Amérique* vol. 92,8 (1995) : 3358-61. doi:10.1073/pnas.92.8.3358

Tsukuda, Senko, and Koichi Watashi. "Hepatitis B virus biology and life cycle." *Antiviral research* vol. 182 (2020): 104925. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104925

Tzeng, Horng-Tay et al. "PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model." *PloS one* vol. 7,6 (2012): e39179. doi:10.1371/journal.pone.0039179

Urbanowicz, Richard A et al. "Antigenicity and Immunogenicity of Differentially Glycosylated Hepatitis C Virus E2 Envelope Proteins Expressed in Mammalian and Insect Cells." *Journal of virology* vol. 93,7 e01403-18. 21 Mar. 2019, doi:10.1128/JVI.01403-18

Vieyres, Gabrielle et al. "Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus." *Journal of virology* vol. 84,19 (2010): 10159-68. doi:10.1128/JVI.01180-10

World Health Organization. "Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries." (2024).

Zhao, Hong et al. "Hepatitis B vaccine development and implementation." *Human vaccines & immunotherapeutics* vol. 16,7 (2020): 1533-1544. doi:10.1080/21645515.2020.173216

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) HANANE BAHNES

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21600341

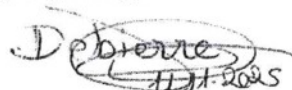
N° Thèse : 119

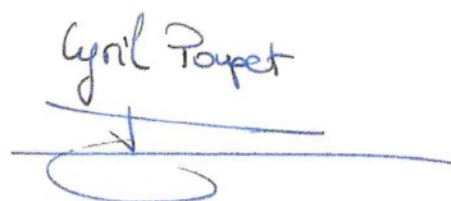
Nom et Prénom : HANANE BAHNES

Sujet : Bioproductions et optimisation des vaccins contre l'hépatite B et C

Tours, le : 11 / 11 / 2025

Le(s) Directeur(s) de Thèse :
Nom(s) et signature(s)


11/11/2025



Vu et Transmis :
Le Doyen

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



Mme BAHNES Hanane

n°19

TITRE DE LA THESE

Bioproductions et optimisation des vaccins contre l'hépatite B et C

RESUME DE LA THESE

La vaccination représente le meilleur espoir de contrôler l'épidémie d'hépatite C à l'échelle mondiale. L'UMR 1259 MAVIVHe a développé une stratégie vaccinale originale basée sur les particules générées dans le cadre du vaccin contre le virus de l'hépatite B (VHB), exprimant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC. Produites en lignée de cellules ovariennes de hamster, elles induisent chez l'animal la production d'anticorps neutralisant efficacement *in vitro* des souches hétérologues de VHC. Le travail présenté ici compare les glycosylations du candidat vaccin produit par différents systèmes d'expression engendrant des processus de glycosylation distincts (cellules de mammifère *versus* cellules d'insecte). Différents anticorps spécifiques des protéines du VHC et du VHB ont permis de mettre en évidence leur bonne conformation et leur exposition à la surface des particules. Les glycosylations des deux systèmes de production ont pu être partiellement définies par la fixation de lectines reconnaissant des glycanes spécifiques. Une optimisation de la production des immunogènes est à l'étude. Les pharmaciens d'officine sont habilités à administrer des vaccins inactivés ou sous-unitaires. Un vaccin bivalent contre les hépatites B et C, d'un grand intérêt pour protéger efficacement et simultanément contre deux agents pathogènes hépatotropes majeurs, pourrait à l'avenir rejoindre le panel des vaccins concernés.

Mots-clés : Vaccin, hépatites, protéines, glycosylation, anticorps neutralisants, systèmes d'expression

JURY

PRESIDENTE : Mme DEBIERRE-GROCKIEGO Françoise, Maitre de conférences-HDR, co-directrice de thèse – Faculté de Pharmacie, Tours

MEMBRES : Mr POUPET Cyril, Maitre de conférences, co-directeur de thèse – Faculté de Pharmacie, Tours

Mme BRAIBANT Martine, Professeur – Faculté de Pharmacie, Tours

Mme NBOUZID Naïma, Pharmacien d'officine, Dreux

Mme HAFID Asmâa, Pharmacien d'officine, Vendôme

Date et lieu de soutenance : Le 16 décembre 2025, Faculté de pharmacie Philippe Maupas à Tours