

Interférence à la surinfection : un mécanisme non immunitaire de vaccination contre les maladies rétrovirales

Parmi les nombreux vaccins mis au point à ce jour, ceux fondés sur l'utilisation d'une souche vivante atténuée restent les plus efficaces. Plusieurs raisons ont été invoquées pour expliquer ce fait : les vaccins vivants reproduiraient au mieux l'histoire naturelle de l'infection, et induiraient de ce fait l'immunité la mieux adaptée. Notamment, ces types de vaccins reproduiraient les étapes de dégradation protéique qui mènent à la présentation des peptides microbiens immunogènes par les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De plus, ces vaccins vivants sont aussi susceptibles d'entraîner une infection latente dont les effets de rappel conduisent à une protection de longue durée. Enfin, nous pensons qu'un mécanisme non immun de protection, l'interférence à la surinfection dont nous avons récemment démontré l'efficacité dans un modèle de vaccination rétrovirale [1], peut aussi, dans certaines conditions, participer au meilleur effet protecteur de vaccins vivants.

Modèle rétroviral murin de vaccination par interférence

Qu'est-ce que l'interférence à la surinfection ? Des cellules en culture infectées par un rétrovirus deviennent quasi résistantes à la surinfection par tout rétrovirus dont l'enveloppe reconnaît le même récepteur viral. Cette surinfection est bloquée à une étape très précoce, précédant la pénétration même du virus surinfectant dans la cellule. Le mécanisme de blocage semble impliquer une interaction du récepteur avec les glycoprotéines d'enveloppe virale déjà produites par la cellule infectée, entraînant une reconnaissance très inefficace de ce récepteur (figure 1). Nous avons testé un protocole de vaccination chez l'animal fondé sur ce mécanisme

d'interférence. Pour cela, nous avons vacciné des souris nouveau-nées avec une souche virale vivante aux effets pathogènes atténués du virus leucémogène de Friend (Friend-MuLV pour *Friend murine leukemia virus*). L'éducation thymique (reconnaissance du soi) se poursuivant chez la souris après la naissance, les nouveau-nés ne développent pas de réponse immune contre un antigène inoculé en quantité suffisante (tolérance immunitaire). De ce fait, une protection éventuelle, observée lors de notre protocole de vaccination, ne devrait rien à un mécanisme immunitaire. Les animaux non vaccinés inoculés par une souche virulente développent une pathologie lytique (anémie hémolytique précoce) aisément détectée 2-3 semaines après inoculation, suivie d'une érythroleucémie sub-aiguë déclenchée à la suite d'un phénomène de mutagenèse insertionnelle et le plus généralement évidente vers l'âge de 2 mois [2, 3]. Nous avons montré que la vaccination par la souche vivante atténuée de Friend-MuLV induit une protection efficace contre ces deux affections après infection par la souche prototype virulente. Le fait que deux jours soient suffisants entre la vaccination et l'infection par le virus pathogène pour que s'établisse une protection complète confirme que la protection ne dépend pas de l'activation du système immunitaire. En utilisant des souches de MuLV reconnaissant différents récepteurs et des chimères entre ces virus, nous avons montré que la protection n'est observée que si le virus vaccinal et le virus pathogène portent des enveloppes reconnaissant le même récepteur. Ainsi avons-nous établi dans ce modèle le rôle majeur, sinon unique, de l'interférence à la surinfection dans la protection. De plus, nous montrons que cette vaccination néonatale est très efficace et durable

puisque la protection empêche même le développement chez l'adulte d'un effet érythroleucémogène aigu fulgurant provoqué par le virus SFFV (pour *spleen focus forming virus*) [4], lorsque ce virus défectif et oncogène dépend du Friend-MuLV pour sa dissémination.

Nos résultats démontrent donc qu'une vaccination établie sur la seule base d'un mécanisme non immunitaire peut conférer une protection efficace. Ce type de protection serait d'un intérêt particulier pour les maladies se développant sur un terrain immuno-compromis, ou lorsque la réponse immune elle-même s'avère néfaste, soit du fait que cette réponse participe à la genèse des effets pathogènes (formation de complexes immuns, réactions inflammatoires, réactions cytotoxiques croisées, etc.), soit encore qu'elle facilite la dissémination de l'agent pathogène (phénomènes de facilitation de l'infection par les anticorps). Surtout, une telle vaccination étant fondée sur l'inhibition d'une fonction essentielle à la réplication du virus, la reconnaissance du récepteur cellulaire par l'enveloppe virale, elle serait beaucoup moins sensible aux variations antigéniques qui gênent considérablement certaines stratégies vaccinales classiques, et en particulier celles qui concernent les maladies rétrovirales. En dehors des cas pour lesquels la réponse immune serait en elle-même délétère, les mécanismes non immunitaires de protection telle l'interférence à la surinfection pourraient agir de façon complémentaire, voire synergique, avec ces mécanismes immunitaires.

Limites à l'extension du principe de vaccination par interférence

L'interférence à la surinfection a été décrite dans de très nombreuses

familles rétrovirales, à tel point que la description d'un rétrovirus qui ne la subirait pas constituerait une surprise. De plus, le mécanisme d'interférence concerne des récepteurs rétroviraux aussi différents que peuvent l'être un transporteur d'acides aminés (récepteur du virus de la leucémie murine MuLV de type écotrope, n'infectant que des lignées cellulaires de souris et de rat) [5], une protéine de la famille des récepteurs des LDL (récepteur des rétrovirus leucémogènes aviaires de type A) [6] ou encore la molécule CD4 (récepteur des VIH) [7]. L'interférence serait plus facilement observable avec les rétrovirus du fait de la capacité de ces virus à infecter de façon stable et productive des cellules *in vitro*. Sa mise en évidence nécessiterait dans la plupart des autres modèles l'obtention de

lignées cellulaires exprimant de façon artificielle la protéine virale reconnue par le récepteur cellulaire. Ainsi un phénomène d'interférence a-t-il été décrit dans des cellules transfectées par la glycoprotéine gD du virus Herpès de type I, nécessaire à la pénétration des virions dans le cytosol [8]. Il est vraisemblable que les effets protecteurs éventuels de l'interférence *in vivo* sont généralement masqués par ceux de la réaction immunitaire, ce qui expliquerait que des phénomènes comparables n'aient été observés *in vivo* que lors d'infections virales d'organismes dépourvus de réponse immunitaire, tels que des bactéries [9] et des plantes [10]. Dans ces derniers cas, l'interférence semble, comme dans notre modèle, avoir un effet protecteur contre les maladies déclenchées par une infection

ultérieure, ce qui suggère que des stratégies de vaccination par interférence pourraient être efficaces dans d'autres modèles que celui des MuLV.

Cependant, la vaccination par interférence ne pourra être efficace que si une proportion suffisante des cellules infectables est touchée par le virus vaccinal, de façon à prévenir suffisamment la dissémination du virus pathogène. Toutefois, nos résultats démontrent qu'un blocage complet de l'infection par le virus pathogène n'est pas toujours nécessaire à la protection. C'est le cas de pathologies lytiques, telles que l'anémie hémolytique précoce du Friend-MuLV, pour lesquelles un simple ralentissement de la lyse cellulaire permettant une compensation efficace par l'organisme infecté serait suffisant. De même, il

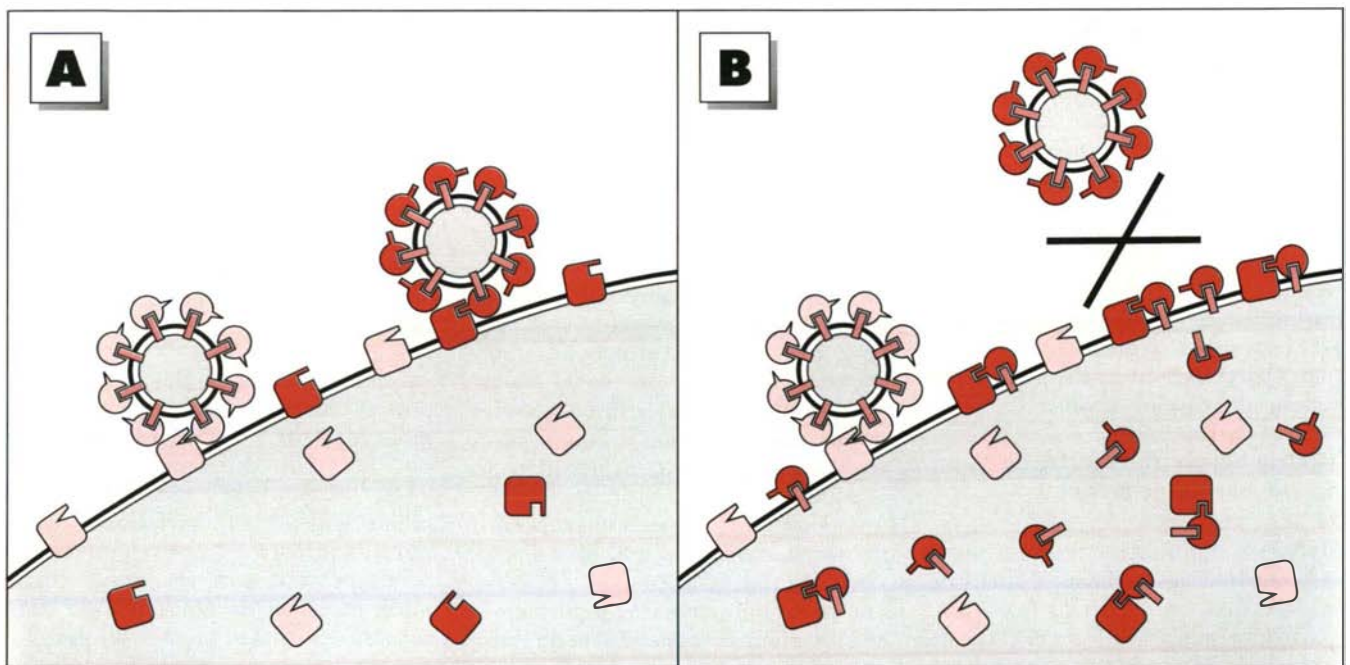


Figure 1. **Représentation schématique du mécanisme de l'interférence à la surinfection.** **A.** La première étape de la pénétration des rétrovirus dans leurs cellules cibles consiste en la reconnaissance spécifique d'une protéine membranaire, le récepteur viral, par la sous-unité de surface de la glycoprotéine d'enveloppe. Une même cellule peut produire et exprimer à sa membrane plusieurs protéines reconnues comme récepteurs par des rétrovirus possédant des glycoprotéines d'enveloppe différentes. **B.** Lorsqu'une cellule est infectée par un rétrovirus, elle exprime les protéines virales, et en particulier la glycoprotéine d'enveloppe. Celle-ci interagit avec son propre récepteur aussi bien au niveau du réticulum endoplasmique qu'à la surface cellulaire. Il en résulte un blocage du récepteur qui ne permet plus l'adsorption et la pénétration des rétrovirus qui l'utilisent. La cellule reste parfaitement infectable par tout rétrovirus utilisant un autre récepteur. Le mécanisme exact du blocage n'est pas complètement élucidé. L'hypothèse représentée est celle d'une inhibition compétitive de l'interaction virus-récepteur du fait de l'occupation du récepteur par la glycoprotéine d'enveloppe produite par la cellule. Il est aussi possible que l'interaction enveloppe endogène-récepteur dans le réticulum endoplasmique bloque la surinfection parce qu'elle modifie le devenir du récepteur (conformation, modifications post-traductionnelles ou localisation cellulaire). L'interaction enveloppe-récepteur peut altérer significativement ou non la fonction naturelle du récepteur.

a été montré qu'une vaccination classique fondée sur la réponse immune contre le virus leucémogène SFFV est parfaitement protectrice sans pour autant empêcher une dissémination et un maintien partiels de ce virus chez les animaux protégés [11]. En fait, seule la prévention de l'infection dans les compartiments cellulaires jouant un rôle clé dans la maladie — cible primaire de l'infection, réservoir de cellules infectées, cellules cibles de l'effet pathogène — pourrait être nécessaire. Nous avons observé que les souris vaccinées par le Moloney-MuLV, apparenté au Friend-MuLV mais qui provoque des leucémies lymphoïdes et non érythroïdes, sont protégées contre l'anémie hémolytique mais ne sont que très partiellement protégées contre l'érythroleucémie du Friend-MuLV. La protection passant par le blocage de l'infection des cellules cibles de l'érythroleucémogénèse n'est donc pas suffisamment efficace dans le cas d'une vaccination par le virus de Moloney, bien que ce dernier reconnaisse le même récepteur que le Friend-MuLV. Ce résultat suggère que le virus de Moloney, qui s'exprime moins bien dans le compartiment érythroïde, pourrait interférer moins efficacement avec le Friend-MuLV dans ce compartiment, soulignant la nécessité dans ce modèle de l'atteinte des cellules cibles de l'effet pathogène pour l'obtention d'une protection efficace. Inversement, il a été montré qu'un mécanisme non immunitaire différent de l'interférence à la surinfection, agissant uniquement au niveau des cibles primaires de l'infection, suffit au blocage de l'infection par le rétrovirus murin de la tumeur mammaire (MMTV pour *mouse mammary tumor virus*). La dissémination initiale du MMTV au niveau de l'intestin s'accompagne de l'expression d'un superantigène* viral qui active les populations lymphocytaires T avoisinantes exprimant un récepteur T portant un réarrangement V β particulier, et qui induit la réplication efficace du virus dans ces cellules. Ces cellules infectées permettent la dissémination à d'autres organes, tels que le thymus et les glandes mammaires. L'expression de ce superantigène chez des souris transgéniques

provoque la délétion polyclonale des cellules reconnaissant cet antigène au cours de l'éducation thymique et semble abolir toute dissémination virale après infection [12]. La vaccination par interférence requiert aussi que l'enveloppe virale soit exprimée de façon stable dans les cellules touchées par le virus vaccinal. Une infection latente, en l'absence d'expression d'enveloppe, ne pourrait donc suffire. Une telle expression constitutive nécessite que le virus vaccinal ne soit pas rapidement éliminé par suite d'un effet cytopathogène éventuel ou de la reconnaissance par le système immunitaire. Il est aussi nécessaire que cette expression n'ait que peu d'effets néfastes pour l'hôte et que, notamment, l'interaction intracellulaire de l'enveloppe interférente avec son récepteur n'entrave pas la fonction normale de ce dernier. Alors que dans le cas des MuLV écotropes, la fonction de transporteur du récepteur ne semble pas gravement altérée, il a été abondamment rapporté que le récepteur CD4 n'est plus exprimé à la surface des cellules infectées par le virus VIH-1, au moins *ex vivo*.

Applications possibles de la vaccination par interférence

Une application potentielle de la vaccination par interférence serait la protection contre les maladies rétrovirales animales et humaines, et en particulier contre les leucoses et les immunodéficiences. L'interférence à la surinfection a été clairement démontrée sur des cultures cellulaires dans le cas du VIH-1 [13]. *In vivo*, il a été rapporté que des macaques vaccinés par une souche vivante atténuée du virus de l'immunodéficiences simienne (ou SIV), très proche du VIH par son pouvoir pathogène et sa physiopathologie, sont très efficacement protégés contre l'infection par deux isolats virulents différents [14]. De l'aveu même des auteurs, le mécanisme de cette protection reste obscur. Elle ne s'accompagne que d'une réaction immunitaire d'intensité moyenne, inférieure même à celle observée chez des singes vaccinés par différentes préparations inactivées qui n'induisent pour

tant aucune protection significative. Il n'est pas exclu que, dans ce modèle aussi, l'interférence à la surinfection joue un rôle dans la protection. Il reste bien sûr possible que des différences qualitatives de la réponse immune soient en cause dans cette observation. De plus, le fait que le virus vaccinal ne soit pas détectable dans les cellules mononucléées du sang périphérique pourrait suggérer que ce virus vaccinal n'est pas présent en quantité suffisante pour conférer une bonne protection par interférence. Il semble, cependant, que la présence de cellules mononucléées périphériques infectées ne soit pas un bon reflet de la dissémination et de l'activité rétrovirale chez les sujets séropositifs en phase de latence. Les ganglions, et peut-être les autres organes lymphoïdes secondaires de ces patients constitueraient des réservoirs permanents de virus. Les centres germinatifs ganglionnaires sont le siège d'une importante activité virale, et une proportion importante des cellules lymphoïdes T y expriment le virus [15], ce qui pourrait expliquer les taux très élevés de virions détectés dans le sang périphérique, malgré l'absence de cellules circulantes infectées [16]. Il est possible que ces cellules échappent à la vigilance immunitaire parce que les centres germinatifs, spécialisés dans la maturation de la réponse antigénique dépendante des lymphocytes T et le maintien de la mémoire antigénique B, sont dépourvus de lymphocytes T CD8⁺ [17] et constitueraient un sanctuaire d'où les effecteurs cellulaires seraient exclus. Quoi qu'il en soit, il est clair que l'absence de cellules infectées dans le sang périphérique des macaques vaccinés par la souche atténuée de SIV n'exclut pas que le virus vaccinal soit exprimé dans une proportion notable de lymphocytes ganglionnaires. Si cette proportion était suffisante pour être représentative du répertoire immunitaire, ces cellules, protégées de l'infection par le virus virulent par un mécanisme d'interférence à la surinfection, permettraient le maintien de ce répertoire et empêcheraient l'apparition du SIDA. Quant à savoir si ces cellules infectées par le virus vaccinal pourraient se maintenir de façon stable, trop peu

de choses sont connues des effets cytopathogènes de ces virus *in vivo*, et des capacités d'élimination par le système immunitaire des cellules ganglionnaires infectées, pour pouvoir en juger.

L'utilisation des vaccins rétroviraux vivants atténués ne devrait pas dépasser le stade expérimental pour au moins trois raisons. Le virus vaccinal vivant, potentiellement transmissible, pourrait provoquer à terme des affections tumorales par son intégration dans le génome cellulaire à proximité de proto-oncogènes qu'il activerait (mutagenèse insertionnelle). La très grande variabilité des rétrovirus et la présence de nombreuses séquences rétrovirales endogènes pourrait conduire à l'émergence de nouveaux virus dérivés du virus vaccinal et ayant acquis un potentiel pathogène important. Enfin, la co-infection par le virus vaccinal et un autre rétrovirus peu pathogène pourrait aboutir à la potentialisation du pouvoir pathogène de l'un des deux virus. En effet, nous avons observé un tel phénomène dans notre modèle murin, où les souris vaccinées par la souche atténuée du Friend-MuLV développent une affection très sévère après infection par un complexe viral utilisant un autre récepteur, pourtant très peu pathogène pour des souris non vaccinées.

Ces risques pourraient conduire à l'utilisation de méthodes alternatives de protection. En particulier dans une approche de thérapie génique, il serait imaginable de repeupler la moelle des patients par leurs propres cellules hématopoïétiques, transfectées *ex vivo* de façon à exprimer une glycoprotéine dérivée de l'enveloppe virale. L'étude du locus *Fv-4* des souris sauvages fournit la preuve que cette approche peut conférer une protection efficace. Ce locus code chez les souris *Fv-4*⁺ pour une enveloppe rétrovirale endogène, exprimée à partir d'un promoteur cellulaire [18], qui confère une excellente protection naturelle contre différentes maladies déclenchées par des virus utilisant le même récepteur viral. Il a été montré, *ex vivo*, que les cellules *Fv-4*⁺ sont résistantes à la surinfection [19]. De plus, cette glycoprotéine, déficiente mais incorporée très efficacement

dans les virions, pourrait aussi avoir un effet négatif *trans*-dominant sur l'infectivité des virions [20]. En outre, des fragments ou des protéines chimères, portant la région d'enveloppe impliquée dans la reconnaissance du récepteur, conservent leur capacité d'interférence à la surinfection *ex vivo* [21]. Plutôt que d'exprimer une glycoprotéine complète, dont les effets cytopathogènes et/ou immunisants éventuels pourraient conduire à l'élimination des cellules transfectées, il serait intéressant d'utiliser de tels fragments ou chimères d'enveloppe ayant conservé leur pouvoir interférent mais perdu leur potentiel toxique pour les cellules ■

* Superantigène : antigène capable d'activer les cellules T de manière non restreinte par les molécules du CMH et interagissant uniquement avec la chaîne β du récepteur T.

Antoine Corbin Marc Sitbon

Laboratoire d'oncologie cellulaire et moléculaire, Inserm U. 363. Institut Cochin de génétique moléculaire, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Corbin A, Sitbon M. Protection against retroviral diseases after vaccination is conferred by interference to superinfection with attenuated murine leukemia viruses. *J Virol* 1993 ; 67 : 5146-52.
2. Sitbon M, Sola B, Evans L, et al. Hemolytic anemia and erythroleukemia, two distinct pathogenic effects of Friend-MuLV : mapping of the effects to different regions of the viral genome. *Cell* 1986 ; 47 : 851-9.
3. Sitbon M, d'Auriol L, Ellerbrok H, et al. Substitution of leucine for isoleucine in a sequence highly conserved among retroviral envelope surface glycoproteins attenuates the lytic effect of the Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5932-6.
4. Kabat D. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989 ; 148 : 1-42.
5. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 1991 ; 352 : 725-8.
6. Bates P, Young JAT, Varmus H. An LDL receptor-related protein is the subgroup-A ALV receptor. *Meeting on RNA Tumor Viruses* 1992 ; 85 (abstr).
7. Klatzmann D, Champagne E, Charet S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984 ; 312 : 767-8.
8. Campadelli-Fiume G, Arsenakis M, Farabegoli F, Roizman B. Entry of Herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J Virol* 1988 ; 62 : 159-67.
9. Grumet R, Sanford JC, Johnston SA. Pathogen-derived resistance to viral infection using a negative regulatory molecule. *Virology* 1987 ; 161 : 561-9.
10. Abel PP, Nelson RS, Barun D, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 1986 ; 232 : 738-43.
11. Earl PI, Moss B, Morrison RP, Werhly K, Nishio J, Chesebro B. T-lymphocyte priming and protection against Friend leukemia by vaccinia-retrovirus *env* gene recombinant. *Science* 1986 ; 234 : 728-31.
12. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor viral superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992 ; 69 : 637-45.
13. Stevenson M, Meier C, Mann AM, Chappman N, Wasiak A. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytotoxicity resistance in CD4⁺ cells : mechanism for persistence in AIDS. *Cell* 1988 ; 53 : 483-96.
14. Daniel MD, Kirchoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with deletion in the *nef* gene. *Science* 1992 ; 258 : 1938-41.
15. Pantaleo G, Graziosi C, Desmarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993 ; 362 : 355-8.
16. Piatac M Jr, Saag MS, Tang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993 ; 259 : 1749-54.
17. Berek C. The development of B-cells and the B-cell repertoire in the micro-environment of the germinal centre. *Immunol Rev* 1992 ; 126 : 5-19.
18. Ikeda H, Laigret F, Martin MA, Repaske R. Characterization of a molecularly cloned retroviral sequence associated with *Fv-4* resistance. *J Virol* 1985 ; 55 : 768-77.
19. Kai K, Sato H, Odaka T. Relationship between the resistance to Friend murine leukemia virus infection and the expression of murine leukemia virus-gp70-related glycoprotein on cell surface of Balb/c-*Fv-4*^w mice. *Virology* 1986 ; 150 : 509-12.
20. Masuda M, Yoshikura H. Construction and characterization of recombinant Moloney murine leukemia virus bearing the mouse *Fv-4 env* gene. *J Virol* 1990 ; 64 : 1033-43.
21. Heard JM, Danos O. An amino-terminal fragment of the Friend murine leukemia virus envelope glycoprotein binds the ecotropic receptor. *J Virol* 1991 ; 65 : 4026-32.

TIRÉS A PART

A. Corbin.