



Diplôme Universitaire

Approches vaccinales des infections à filovirus

Olivier FLUSIN

23 novembre 1970



Centre de Recherche de Service de Santé des Armées Emile Pardé
Département de Biologie des Agents Transmissibles

Unité de Virologie

24, avenue des maquis du Grésivaudan

38702 LA TRONCHE

Tel : 04 76 63 97 72

Email : o.flusin@crssa.net

Résumé

Découverts depuis bientôt quarante ans, les virus Ebola et Marburg, appartenant à la famille des *Filoviridae* sont régulièrement responsables en Afrique d'épidémies de fièvres hémorragiques toujours aussi meurtrières. Malgré la réalisation de nombreuses études, le réservoir n'est pas encore clairement identifié et les mécanismes expliquant leur grande virulence ne sont pas distinctement élucidés mais ils semblent liés à une réponse immune défectueuse ou inadaptée. Aucune thérapeutique spécifique n'est actuellement disponible chez l'homme. Des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement vaccinal antifulovirus. Malgré l'échec des approches classiques, d'excellents résultats ont été obtenus chez des primates non humains avec des approches modernes basées sur des VLPs et des vecteurs viraux adénovirus, VSV et virus parainfluenza. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre au mieux les mécanismes d'activation des cellules de l'immunité, évaluer les corrélats de protection, et optimiser les schémas vaccinaux avant la mise en route d'études cliniques chez l'homme.

Abstract

Since forty years Ebola and Marburg viruses emerge frequently in Africa and are responsible of viral hemorrhagic fever outbreaks with a case fatality rate of up to 90%. Despite intensive research studies, the reservoir is not clearly defined, and the mechanisms leading to their high pathogenicity are poorly understood ; a defective or inadapted immune response seems to be the main factor. No specific treatment is available for humans. But significant progress has been made in vaccine developpement against infection by filovirus. Classical approaches have been generally unsuccessful and pose enormous safety concerns as well. Modern approaches, in particular VLPs and recombinant viral vector-based vaccines (adenoviruses, VSV and parainflenza viruses) have met with success in nonhuman primate models. Despite these successes, more work remains to be done before human trials, to better understand the mechanisms of the immune cells stimulation, in assessment of a correlation of specific immune responses with protection efficacy and eventually in delineation of an optimal immunization regimen,.

Liste des abréviations

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

CD : cellules dendritiques

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

C-Ter : COOH terminale ou carboxyterminale

EboV : virus Ebola

EboV-Z : virus Ebola sous-type Zaïre

EboV-S : virus Ebola sous-type Soudan

EboV-CI : virus Ebola sous-type Côte d'Ivoire

EboV-R : virus Ebola sous-type Reston

GP : glycoprotéine

GP-EboV : glycoprotéine du virus Ebola

GP-MarV : glycoprotéine du virus Marburg

IFN : interféron

IP : intrapéritonéale

Kb : kilobase

MarV : virus Marburg

NK : cellules natural killer

NO : monoxyde d'azote

NP : nucléoprotéine

N-ter : NH₂ terminale ou aminotermine

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PFU : plaque formant unité

PNH : primate non humain

RC : République du Congo

RDC : République Démocratique du Congo

RT-PCR : rétrotranscription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne

SC : sous-cutanée

VEEV : virus de l'encéphalite équine du Venezuela

VLPs : particules virus-like ou pseudoparticules virales

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

Table des matières

Table des matières	5
Introduction	6
Les infections à filovirus	7
A. Chaîne épidémiologique	7
1. Agents pathogènes	7
a. <i>Morphologie et structure des filovirus</i>	7
b. <i>Structure du génome et protéines virales</i>	8
c. <i>Cycle viral</i>	10
d. <i>Caractéristiques génétiques</i>	11
2. Réservoir	11
3. Transmission	12
4. Sujet réceptif	13
a. <i>Pouvoir pathogène des infections à filovirus</i>	13
b. <i>Physiopathologie des infections à filovirus</i>	14
5. Aspects épidémiologiques et répartition géographique.....	16
B. Eléments de diagnostic et de thérapeutiques	17
1. Diagnostic des infections à filovirus	17
a. <i>Techniques de détection du virus ou de ses constituants</i>	18
b. <i>Techniques de détection des anticorps</i>	18
2. Aspects thérapeutiques des infections à filovirus.....	18
Approches vaccinales contre les infections à filovirus	19
A. Généralités	19
B. Approches vaccinales classiques	19
1. Vaccins inactivés.....	19
2. Vaccins sous-unitaires.....	20
C. Approches vaccinales modernes	20
1. Vaccins ADN	20
2. Vaccins recombinants basés sur des vecteurs viraux	20
a. <i>Pseudo-particules virales de réplicon VEEV</i>	21
b. <i>Vaccins recombinants basés sur des vecteurs adénovirus</i>	24
c. <i>Vaccins recombinants basés sur des vecteurs de virus de la stomatite vésiculaire</i>	26
d. <i>Vaccins recombinants basés sur des vecteurs de paramyxovirus</i>	29
D. Approche vaccinale pseudoparticules VLP contre les infections à filovirus	31
1. Caractéristiques des VLP	31
2. Assemblage des VLPs de filovirus.....	31
3. VLPs filovirus dérivant de cellules de mammifères	32
a. <i>Production et caractérisations</i>	32
b. <i>Immunisation contre les infections à filovirus</i>	32
4. VLPs filovirus dérivant de cellules d'insectes	33
a. <i>Production et caractérisations</i>	33
b. <i>Immunisation contre les infections à filovirus</i>	34
5. VLPs et réponse immunitaire innée	34
E. Perspectives des approches vaccinales contre les infections à filovirus	35
Conclusion	37
Bibliographie	38

Introduction

Après les travaux de Pasteur, de nombreux progrès ont été réalisés, au 20^{ème} siècle, en matière de lutte contre les maladies infectieuses dont on imaginait pouvoir se protéger par l'intermédiaire de vaccins, de molécules anti-infectieuses et par l'amélioration de l'hygiène. Cependant, comme Nicolle l'avait annoncé dans son « Destin des Maladies Infectieuses », ces hypothèses de maîtrise des agents infectieux n'étaient que fantasmes liés à des schémas bergsoniens, faits pour un temps fini, pour le « temps des hommes », qui ne prenaient pas en compte le formidable génie évolutif et adaptatif des microorganismes. En application des théories de Darwin, de nouveaux agents pathogènes ont émergé, d'autres ont réémergé à la faveur de modifications des écosystèmes où ils étaient confinés jusque là et se sont avérés responsables de maladies souvent mortelles pour l'homme. Parmi les pathogènes émergents figurent, entre autre, les virus des fièvres hémorragiques, responsables de flambées épidémiques ou de manifestations isolées qui, dès 1967, mais surtout depuis 1993, ont été fortement médiatisées. Au premier rang de ces inquiétants virus se trouvent le virus Ebola (EboV) qualifié « d'ultimate pathogen » par Kilbourne et le virus Marburg (MarV). Ces deux virus, dont le génome est caractérisé par une grande variabilité, appartiennent au genre *Filovirus*, de la famille des *Filoviridae*, dans d'ordre des *Mononegavirales*. Ils sont extrêmement pathogènes pour l'homme et les primates non humains (PNH) chez lesquels ils provoquent des tableaux de fièvres hémorragiques fulminantes avec défaillance multiviscérale associés à un taux de mortalité qui peut atteindre 90% (26). Bien que le réservoir ne soit pas clairement identifié, ces deux filovirus semblent endémiques en Afrique centrale et l'incidence des épidémies est en nette augmentation ces dix dernières années. Les virus EboV et MarV sont classés dans la catégorie des agents pathogènes de niveau de risque biologique 4, qui ne peuvent être manipulés qu'en laboratoire de sécurité maximale 4. D'autre part, ils figurent dans la liste A du CDC (Center for Disease Control) des agents du bioterrorisme du fait de leur possible utilisation comme armes biologiques aérosolisables (26).

Pour toutes ces raisons, les filovirus sont considérés comme des virus pathogènes majeurs pour l'homme d'autant qu'il n'existe pas, actuellement, de thérapie antivirale ayant démontré son efficacité dans des essais cliniques randomisés. Les innovations technologiques de biologie moléculaire ont considérablement amélioré et diversifié les stratégies vaccinales disponibles en fonction des contraintes liées à des préoccupations tant d'innocuité, que d'efficacité ou encore de nature économique. Des progrès significatifs ont été obtenus dans la conception de vaccins anti-filovirus. En effet, plusieurs préparations vaccinales ont induit une immunité dans des modèles animaux. Parmi celles-ci, les particules virus-like (VLP) ou pseudoparticules virales et certains vecteurs viraux recombinants sont des technologies prometteuses qui ont prouvées leur efficacité dans la protection de petits rongeurs et de PNH après challenge léthal (24, 42).

Ce travail a pour objectif de présenter, après des rappels sur les infections à filovirus (chaîne épidémiologique, puis éléments de diagnostic et de thérapeutique), les données récentes concernant le développement vaccinal contre les virus EboV et MarV en abordant plus particulièrement les approches vecteurs viraux recombinants et VLPs.

Les infections à filovirus

A. Chaîne épidémiologique

1. Agents pathogènes

a. Morphologie et structure des filovirus

Les virus EboV et MarV se présentent en microscopie électronique comme de longs filaments avec parfois des ramifications étendues. On peut aussi trouver des formes plus courtes, réalisant des figures de chiffres arabes « 6, 8 » ou de lettres « U », ou d'épingles à nourrices (figure 1) (26). Leur diamètre est uniforme de 80 nm environ, en revanche leur longueur est variable pouvant dépasser 10 µm.

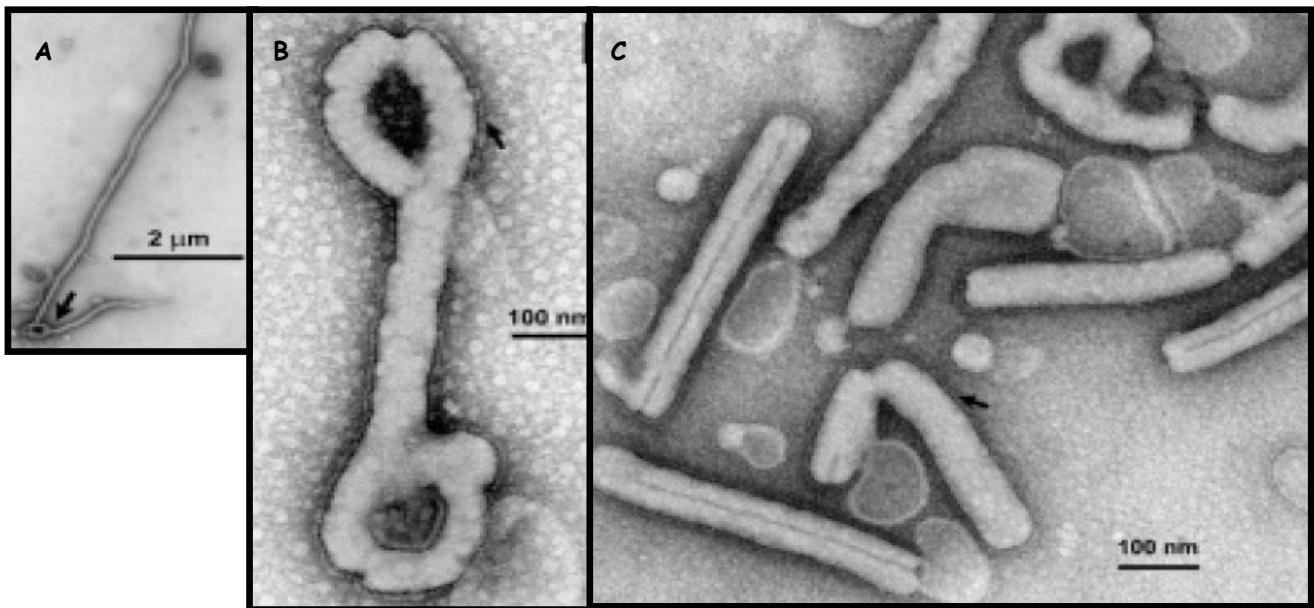


Figure 1 : Images en microscopie électronique de virions de filovirus cultivés sur cellules Vero E-6. (A) virus MarV (B et C) virus EboV-Z. Les flèches indiquent (A) un point d'embranchement dans une particule filamenteuse et (B et C) des péplomères à la surface des virions (26)

Les filovirus sont formés d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (diamètre d'environ 50 nm avec une périodicité de 5 nm par tour d'hélice) entourée d'une simple enveloppe hérissée de projections de 10 nm environ appelées péplomères. Ils contiennent une molécule d'ARN de polarité négative, monocaténaire et non segmentée de 19 kb (figure 2) (26).

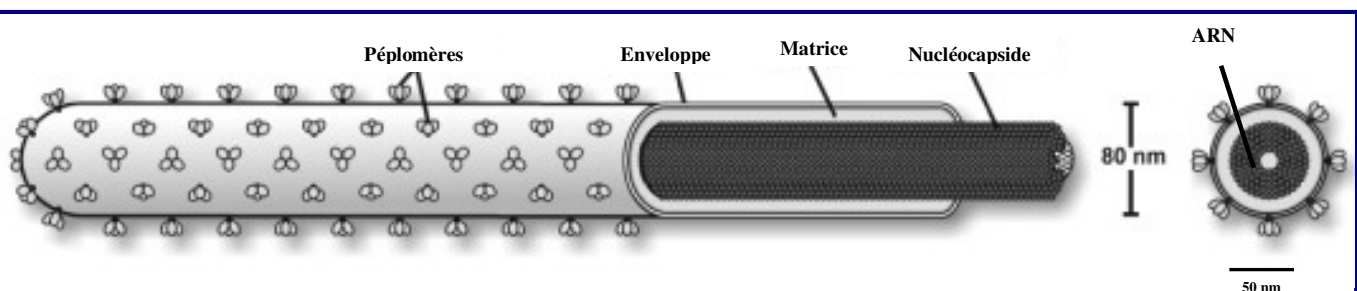
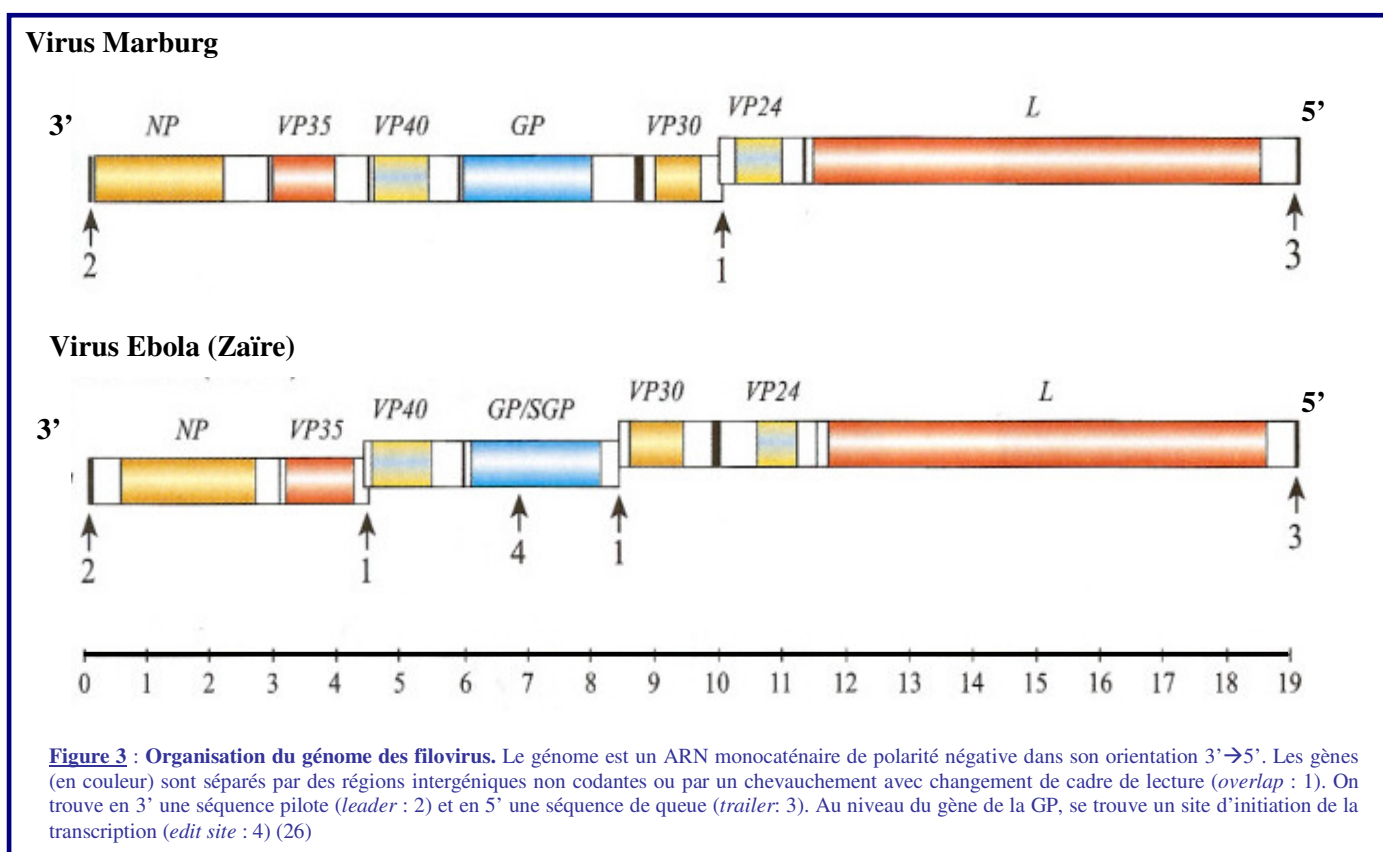


Figure 2 : Schéma représentant une particule de filovirus. Les filovirus sont formés d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (diamètre d'environ 50 nm avec une périodicité de 5 nm par tour d'hélice) entourée d'une simple enveloppe hérissée de projections de 10 nm environ appelées péplomères. Ils contiennent une molécule d'ARN de polarité négative, monocaténaire et non segmentée de 19 kb (26)

b. Structure du génome et protéines virales

• Structure du génome :

Le génome des filovirus est constitué de 7 gènes codant dans le sens 3'-5' pour : la nucléoprotéine NP, la VP35, la VP40, la glycoprotéine de surface (GP), la VP30, la VP24 et l'ARN polymérase ARN dépendante (L) (26). Ces gènes sont séparés par des séquences intergéniques non codantes ou par des zones de chevauchement (figure 3). Ils sont encadrés par des signaux de transcription conservés commençant avec un signal d'initiation en 3' et finissant par un signal de terminaison en 5'. Ces signaux de transcription contiennent une séquence commune UAAUU à l'extrémité 5' du site d'initiation et 3' du site de terminaison. Enfin, de part et d'autre du génome se situent des séquences extragéniques (*leader* en 3' et *trailer* en 5') qui sont conservées et complémentaires.



• Protéines virales (26):

Les protéines des filovirus sont classées en deux catégories : d'une part, les protéines formant la nucléocapside qui jouent un rôle dans la transcription et la réplication du génome et d'autre part, les protéines associées à l'enveloppe virale qui sont impliquées dans les processus d'entrée et d'assemblage des virions (tableau 1).

La nucléocapside virale est constituée par les protéines NP, VP30, VP35 et L. La NP et la VP30 sont des protéines phosphorylées qui constituent, respectivement, les nucléoprotéines majeures et mineures qui interagissent avec la molécule d'ARN. La VP30 permet l'activation de la transcription du génome viral alors que la NP a pour fonction d'encapsider l'ARN viral. Les NP des filovirus présentent, dans leur région centrale, une séquence de 130 acides aminés de forte homologie avec les paramyxovirus, et à un degré moindre, avec les rhabdovirus.

Les protéines L et VP35 forment le complexe polymérase responsable de la transcription et la réplication du génome viral. La protéine L fournit l'activité ARN polymérase ARN dépendante. La protéine VP35 joue un rôle essentiel comme cofacteur de cette activité en régulant le mode de synthèse de l'ARN viral (transcription ou

réplication) et comme lien entre les protéines L et NP. De plus, la VP35 est une protéine antagoniste de la voie de production des interférons de type I.

Ordre du gène (3'→5')	Gène	Fonction de la protéine	Poids de la protéine (kDa)
1	Nucléoprotéine (NP)	Nucléoprotéine majeure ; encapsidation de l'ARN viral	90-104
2	VP35	Cofacteur du complexe polymérase ; antagoniste IFN	35
3	VP40	Protéine majeure de matrice ; assemblage et bourgeonnement	35-40
4	Glycoprotéine (GP)	GP = entrée du virus, fixation récepteur cellulaire et fusion membranaire GPs = fonction inconnue	150-170 50-55
5	VP30	Nucléoprotéine mineure ; interaction avec l'ARN viral et activation transcription	27-30
6	VP24	Protéine mineure de matrice ; assemblage virions ; antagoniste IFN	24, 25
7	Polymérase (L)	ARN polymérase ARN dépendante ; composant enzymatique du complexe polymérase	~ 250

Tableau 1 : Gènes de filovirus (orientation 3'→5'), fonction et poids moléculaire des protéines codées.

Les protéines associées à l'enveloppe virale sont représentées par la glycoprotéine de surface, les protéines VP40 et VP24. La glycoprotéine GP (120-150 kDa) est la protéine de filovirus qui a été le mieux étudiée en raison de son rôle majeur dans l'entrée du virus, son influence dans la pathogénèse, son antigénicité et son intérêt comme immunogène pour la recherche vaccinale. La GP du virus EboV est codée dans deux cadres ouverts de lecture (ORF : open reading frame) tandis que la GP du virus MarV est codée dans un unique ORF. Malgré cette différence, leur séquence en acides aminés est très similaire. Cette glycoprotéine (N et O-glycosylation) est formée de deux sous-unités, GP1 (trimère) extracellulaire de 140 kDa (extrémité N-ter) et GP2 (trimère) transmembranaire de 26 kDa (extrémité C-ter) qui résultent du clivage post-transcriptionnel d'une pré-GP par une protéase cellulaire type furine et qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. La GP, composant les péplomères exprimés à la surface des particules virales, est responsable de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire, qui permet l'entrée du virus dans la cellule. Elle est rattachée à la famille des glycoprotéines de type I qui possède, à l'état inactif, un peptide hydrophobe, le peptide de fusion, caché au cœur de sa structure et situé à proximité de l'extrémité N-ter de la sous-unité GP2. Ce peptide de fusion se retrouve exposé à la faveur d'un changement conformationnel, et peut alors s'insérer dans la membrane cible et déclencher le mécanisme de fusion membranaire.

L'expression d'une glycoprotéine non structurale soluble GPs (50-70 kDa) par le gène GP du virus EboV est une caractéristique peu commune qui n'est pas retrouvée chez le virus MarV. En effet, le gène GP est transcrit en deux ARNm grâce à l'insertion d'un résidu adénosine par un mécanisme d'édition transcriptionnelle de l'ARN. La plupart (80%) des ARNm de la GP sont non édités et dirigent la synthèse vers la GPs (homodimère à orientation antiparallèle et relié par un pont disulfure) qui est uniquement O-glycosylée, 20% sont édités et donnent naissance à la glycoprotéine de surface GP. Les deux glycoprotéines sont identiques à leurs extrémités N-ter de 295 acides aminés et différent à leurs extrémités C-ter. La GPs possède dans sa structure une poche qui permettrait l'interaction avec un ligand dont la nature n'est pas actuellement connue. Sa fonction n'est pas encore clairement identifiée mais elle pourrait jouer un rôle dans la progression de la maladie puisqu'on la détecte en grande quantité

dans le sang de patients infectés en phase aiguë. La principale conséquence du phénomène d'édition est de limiter la quantité de GP produite dans les cellules infectées qui produisent le virus ; cette protéine étant connue pour sa forte cytotoxicité

La VP40 et la VP24 sont, respectivement, les protéines de matrice majeures et mineures. La VP40 est la protéine de structure la plus abondante dans le virion. Elle joue un rôle primordial dans le bourgeonnement du virus en facilitant l'interaction entre les protéines de la nucléocapside et les glycoprotéines de surface. En effet, elle initie et contrôle le processus d'empaquetage de la nucléocapside par la membrane plasmique de la cellule hôte. La fonction de la VP24 dans le cycle de réplication des filovirus n'est pas clairement établie. Toutefois, elle agirait comme facteur antagoniste de la voie de signalisation IFN de type I.

c. Cycle viral

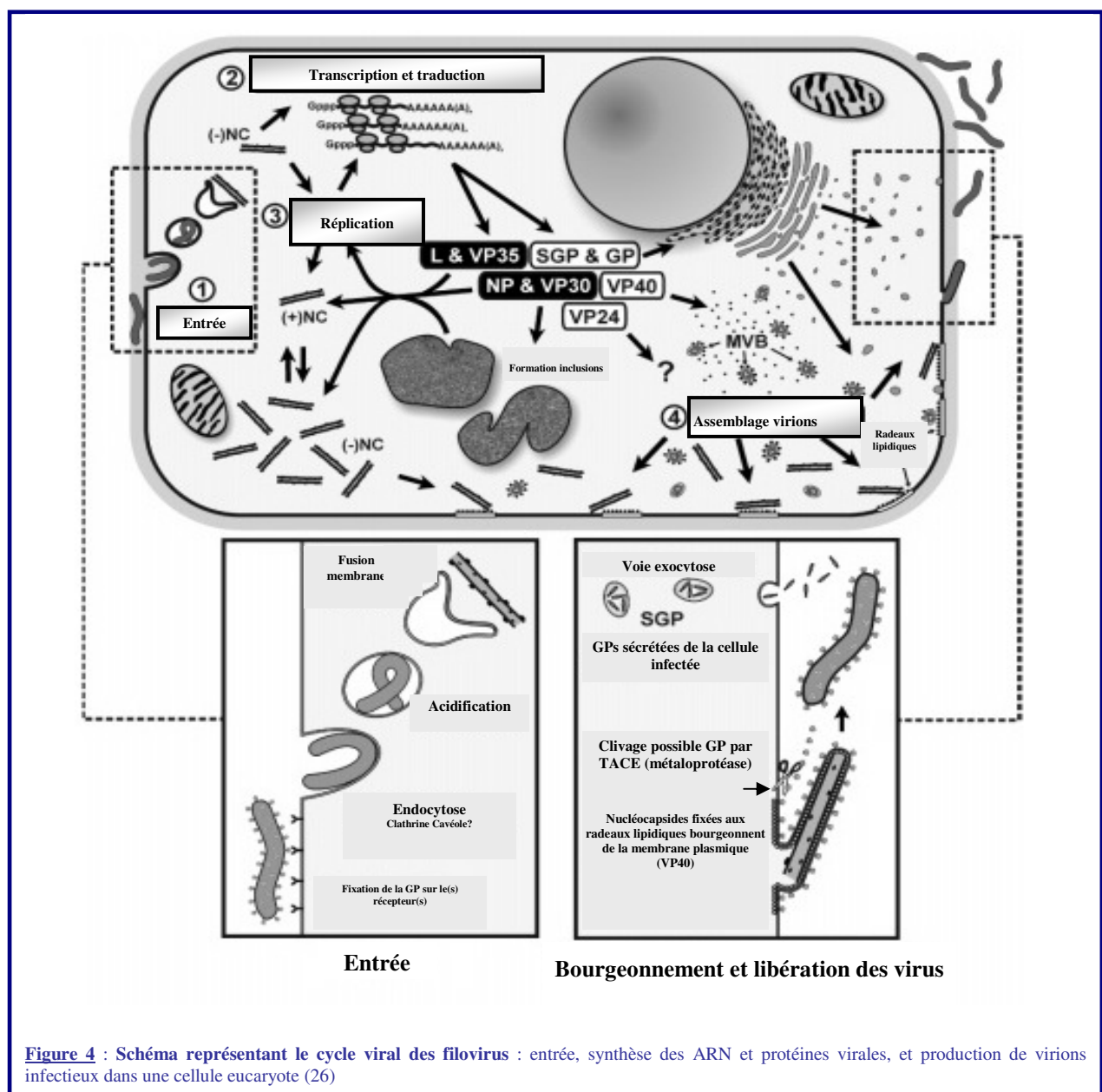


Figure 4 : Schéma représentant le cycle viral des filovirus : entrée, synthèse des ARN et protéines virales, et production de virions infectieux dans une cellule eucaryote (26)

Les mécanismes d'attachement et de pénétration des filovirus dans la cellule hôte ne sont pas totalement élucidés (figure 4) (26). Différents cofacteurs, pouvant participer à leur entrée dans la cellule, ont été décrits comme le récepteur α des folates ou bien encore les lectines de type C (DC-SIGN) retrouvées dans certaines formes

de cellules dendritiques, les macrophages et les cellules endothéliales. La pénétration du virus a lieu par un processus d'endocytose chlatrine-dépendant ou cavéoline-dépendant, d'acidification des vésicules d'endocytose et de fusion des membranes cellulaires et virales, qui aboutit à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. Le mécanisme de fusion des membranes dépend de la protéolyse des péplomères au sein des vésicules endosomales. Cette protéolyse aboutit au clivage de la sous-unité GP1 qui induirait un changement conformationnel du trimère GP2 permettant l'exposition du peptide de fusion. Cette protéolyse est assurée par les cathepsines L et B (CatL et CatB), des protéases endosomales actives uniquement à pH acide. Les transcriptions et répliquions virales se déroulent dans le cytoplasme des cellules infectées. L'expression initiale des gènes viraux conduit à l'accumulation des protéines virales, à l'origine de corps d'inclusions constitués de nucléoprotéines et d'autres protéines de nucléocapside. Après la synthèse des protéines virales, a lieu l'étape de réplication. Elle consiste dans un premier temps en la synthèse d'une copie du génome, l'antigénome, molécule strictement complémentaire, qui à son tour servira de matrice pour la production de nouveau génome. L'étape de réplication est régulée par la NP qui doit être en quantité suffisante pour s'associer à l'ARN néo-synthétisé et former des ribonucléocapsides. Au cours du cycle de réplication, la glycoprotéine virale subit différentes étapes de maturation en passant du réticulum au cis- et trans-Golgi. L'assemblage des virions est régulé par la protéine VP40 et est réalisé au niveau de la voie endosomale tardive ou par l'intermédiaire de radeaux lipidiques membranaires. La libération des particules virales se fait par bourgeonnement des nucléocapsides à la surface de la membrane plasmique de la cellule infectée.

d. Caractéristiques génétiques

Les analyses phylogénétiques de la famille *Filoviridae* reposent sur la région codante du gène GP (26). Il n'existe aucune réaction croisée entre les virus EboV et MarV qui présentent approximativement 55% de différence en séquence nucléotidique et peptidique. Il n'existe qu'une seul sous-type de virus MarV, lac Victoria, mais cinq pour le virus EboV (figure 5) : les sous-types Zaïre, Soudan, Côte d'Ivoire et un nouveau sous-type Ouganda sont d'origine africaines et sont pathogènes pour l'homme, le sous-type Reston vient des Philippines et ne semble pas pathogène pour l'homme. Au sein de chaque sous-type EboV ont été décrits plusieurs lignages en raison d'une différence de 40% environ en séquence nucléotidique et en acides aminés. Pour le virus MarV, il existe cinq lignages différents : les lignages des souches Ravn (Kenya, 1987), Ozolin (Afrique du Sud, 1975), Ratayczak-Popp (Europe, 1967), Musoké (Kenya, 1980) et Angola (2005). Ces mêmes variations en séquence sont aussi retrouvées en comparant d'autres gènes. Pourtant au sein des sous-types EboV, on retrouve une remarquable stabilité génétique (26). Cette caractéristique signifie que ces virus ont atteint un haut niveau de fitness pour s'adapter à leur niche respective.

2. Réservoir

Le réservoir n'est toujours pas clairement identifié. Les PNH, s'ils ont été à l'origine de plusieurs épidémies, ne peuvent représenter le réservoir puisqu'ils sont aussi, voire plus, sensibles que l'homme aux virus. Les populations de PNH (grands singes et petits singes) ont été décimées dans les zones où ont eu lieu les dernières épidémies africaines (Gabon, et République Démocratique du Congo) à virus EboV-Z. Les singes semblent jouer un rôle d'amplificateur du virus et d'intermédiaire avec l'homme (26).

De nombreuses recherches effectuées sur les arthropodes, les petits mammifères et plus particulièrement, les rongeurs dans des zones d'épidémie au cours ou au décours de celles-ci sont revenues négatives.

Le candidat le plus sérieux reste la chauve-souris ; cette hypothèse est basée sur différents arguments (16):

- Plusieurs cas d'infection à virus MarV sont survenus après la visite de grotte ou de mines infestées par des chauves-souris.
- Au laboratoire, des chauves-souris frugivores peuvent être infectées par le virus EboV qu'elles répliquent et éliminent dans les selles sans présenter de signes cliniques.
- Dans les zones des épidémies Gabon-Congo, des séquences génétiques du virus EboV ont été mises en évidence par RT-PCR et de nombreuses séroconversions observées chez des chauves-souris situées dans les mêmes zones que les carcasses de singes trouvées positives.

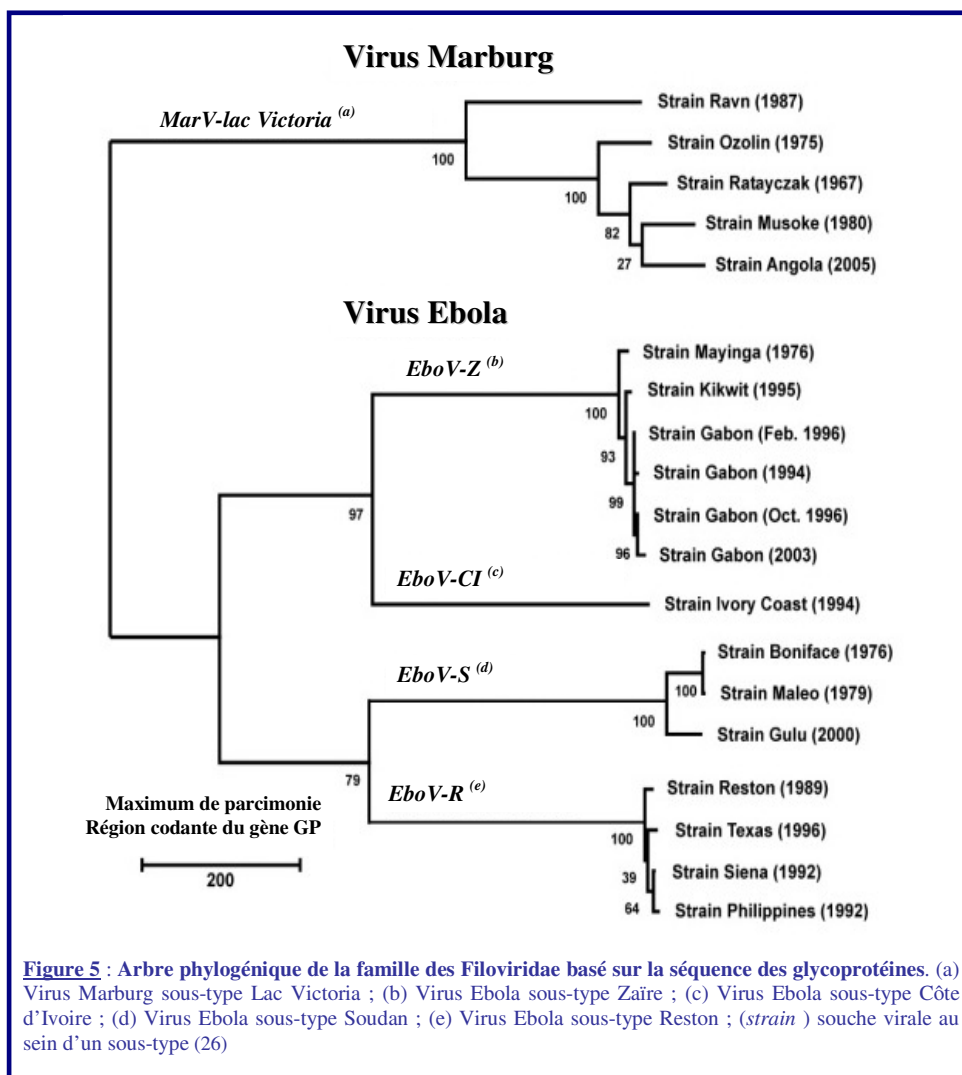


Figure 5 : Arbre phylogénétique de la famille des Filoviridae basé sur la séquence des glycoprotéines. (a) Virus Marburg sous-type Lac Victoria ; (b) Virus Ebola sous-type Zaïre ; (c) Virus Ebola sous-type Côte d'Ivoire ; (d) Virus Ebola sous-type Soudan ; (e) Virus Ebola sous-type Reston ; (*strain*) souche virale au sein d'un sous-type (26)

3. Transmission

La contamination humaine se fait normalement par contact avec des singes infectés, ou ingestion de « viande de brousse » (26). La propagation des épidémies à filovirus a lieu par transmission interhumaine et implique un contact étroit avec le sujet infecté. Celui-ci n'est contagieux qu'en période de maladie. La contagion se fait par contact avec les liquides biologiques riches en virus et le matériel contaminé par ces liquides (26). Les transmissions nosocomiales sont fréquentes en début d'épidémie par défaut d'hygiène : rareté des gants de protection, utilisation multiple des seringues, préparation du corps lors des cérémonies funéraires sans aucune

précaution. Elles deviennent très rares une fois que le diagnostic a été établi et les mesures de protection et de désinfection mises en place. La possibilité de contamination par aérosol est peu probable dans les conditions naturelles. En effet, si elle a pu être réalisée expérimentalement chez le macaque avec le virus EboV, il s'agissait de très fortes doses de virus et la contamination naturelle observée entre macaques infectés et non infectés dans une animalerie pourrait simplement être due à une erreur de manipulation humaine.

4. Sujet réceptif

a. Pouvoir pathogène des infections à filovirus

- *Manifestations cliniques chez l'homme :*

Les syndromes cliniques de la fièvre hémorragique à virus EboV et de la fièvre hémorragique à virus MarV sont pratiquement identiques (26). Après contamination, la période d'incubation est de 3 à 21 jours et se termine par un accès pseudo-grippal non spécifique avec fièvre, myalgies et céphalées. Dans les jours suivants, ces signes s'aggravent avec des troubles digestifs tels que nausée, vomissement, diarrhée, anorexie, douleurs abdominales accompagnés d'un état de prostration, voire d'obnubilation. Vers le cinquième jour, un rash maculo-papulaire apparaît, facile à voir sur peau blanche. Les signes hémorragiques sont présents dans environ 50 % des cas, allant de simples hémorragies conjonctivales, gingivorragies, épistaxis, ecchymoses, à des hémorragies digestives massives (hématémèse, méléna, selles sanglantes), des métrorragies, des pétéchies et des saignements au point de piqûre. Ces dernières formes cliniques sont rares et toujours fatales, souvent due à une coagulation intravasculaire disséminée. En général, le décès survient dans un tableau de collapsus consécutif à l'atteinte multiviscérale, aux troubles de la volémie et de la coagulation entre le sixième et douzième jour. Chez les survivants, la convalescence est longue, accompagnée d'une asthénie prolongée, d'arthralgies d'orchite ou d'uvéite. A côté de ces formes graves souvent mortelles, différentes données d'enquêtes épidémiologiques laissent supposer l'existence de formes asymptomatiques ou modérées dont on ne connaît pas la prévalence (26). Ces résultats ont été confirmés par l'observation de séroconversion et la mise en évidence de séquences génétiques du virus EboV par RT-PCR chez des sujets contacts de malades restés totalement asymptomatiques.

Les modifications pathologiques observées à la suite de l'infection par les virus EboV et MarV sont identiques et sont responsables de nécroses tissulaires et d'hémorragies à des degrés variables (26). Les nécroses sont particulièrement évidentes dans le foie et les tissus lymphoïdes. Les hémorragies sont visibles au niveau de la peau, des muqueuses et des organes. Les particules et inclusions virales sont visibles dans tous les tissus mais surtout dans les hépatocytes, les macrophages et les cellules endothéliales. Les lésions au niveau de l'endothélium vasculaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire sont à la base de la pathogénie du syndrome de choc et des hémorragies. L'infection des macrophages et des cellules endothéliales joue aussi un rôle par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines et de médiateurs de l'inflammation.

- *Modèles animaux d'infection :*

Différentes espèces de PNH, macaques cynomolgus ou rhésus, singes verts, babouins..., sont sensibles à l'infection expérimentales par les filovirus et reproduisent les mêmes symptômes que l'homme. Parmi eux, seul le macaque est couramment utilisé pour les études de physiopathologie, thérapeutique et de vaccinologie des infections à filovirus (26). Infectés par le virus EboV sauvage, les cobayes présentent une chute de poids mais ne meurent pas, mais les passages successifs d'animal à animal augmentent le taux de létalité chez cet animal.

Cependant, les rongeurs infectés ne présentent pas certaines caractéristiques de pathogénicité retrouvées chez l'homme ou les modèles PNH. Seules les souris nouveau-nés sont sensibles à l'infection par le virus EboV-Z sauvage. Un modèle d'infection a été développé chez la souris à l'aide d'une souche de virus EboV-Z adaptée à cette espèce après neuf passages successifs (trois par voie intracrânienne, un par voie IP et les cinq autres par voie SC) du virus sur des souris de moins en moins jeunes : cette souche est capable de tuer la souris adulte lorsqu'elle est inoculée par voie IP mais elle ne présente pas de CIVD observée chez l'homme. L'inoculation de la souche adaptée par voie SC n'est pas létale, au contraire, elle protège l'animal contre une inoculation mortelle par voie IP.

Les différences de pathogénicité entre les modèles rongeurs et PNH présentent un intérêt pour l'évaluation des stratégies vaccinales contre les infections à filovirus dans les modèles rongeurs. En effet, des études ont montré qu'il était plus facile de protéger les rongeurs contre ces infections virales et que l'efficacité éventuelle de candidats vaccins dans le modèle rongeur ne permettait pas toujours de prévoir le même résultat chez les PNH. Pourtant, il paraît clair qu'une préparation vaccinale ne protégeant pas les rongeurs ne peut, probablement, pas être efficace chez les PNH et l'homme. En outre, les modèles rongeurs sont moins onéreux et plus facilement manipulables par rapport aux PNH, spécialement sous condition de niveau de biosécurité 4. De plus, le modèle murin est particulièrement pratique pour la caractérisation des réponses immunitaires induites par la vaccination, en raison du fond génétique bien défini et de leur disponibilité. Par ailleurs, ces modèles rongeurs sont d'un grand intérêt pour la sélection initiale de nouvelles stratégies vaccinales. Néanmoins, l'efficacité de candidats vaccins antifilovirus doit être confirmée dans le modèle PNH avant la mise en route d'essais cliniques chez l'homme.

b. Physiopathologie des infections à filovirus

Les mécanismes responsables du caractère gravissime des infections à filovirus restent encore mal élucidés (19). Différentes données et hypothèses dérivent d'expériences *in vitro*, d'expérimentations animales ainsi que d'analyses de rares prélèvements obtenus chez les patients (figure 6). Les études cinétiques réalisées lors d'expérimentations animales ont montré que les premières et les principales cibles des filovirus étaient les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont infectées au site d'entrée du virus, cutané ou muqueux. Elles amènent ensuite le virus au sein des ganglions lymphatiques drainant, où les premiers cycles de réplication virale ont lieu, permettant ensuite la dissémination des particules virales, *via* la circulation sanguine et lymphatique, dans les organes lymphoïdes, rate et foie. Par la suite, d'autres types cellulaires sont infectés et dans les stades ultimes les cellules endothéliales (augmentation de la perméabilité vasculaire par action possible des protéines virales VP40 et GP au sein de la cellule endothéliale infectée). Le virus est retrouvé dans de nombreux organes : poumons, cœur, reins, surrénales, testicules, moelle osseuse. Des modifications sévères de la formule sanguine sont observées : lymphopénie, thrombocytopénie et neutrophilie persistante. Une atteinte hépatique sévère avec cytolysse majeure (élévation sanguine des ALAT et surtout ASAT) et une défaillance rénale sont décrites au cours de l'infection. Enfin, des troubles de l'hémostase, impliqués majoritairement dans les modifications physiopathologiques, sont précocement induits et s'aggravent jusqu'à la mort.

Les filovirus sont capables d'inhiber les réponses innées (IFN type I) par l'intermédiaire des protéines virales VP35 et VP24 et semblent empêcher l'induction des réponses adaptatives par les CD. Les macrophages infectés produisent des cytokines inflammatoires (TNF α) et des chimiokines qui sont impliquées dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, mais expriment aussi à leur surface le facteur tissulaire qui est à l'origine de la CIVD. D'autres facteurs sont probablement impliqués dans la pathogenèse, comme le NO, Fas ligand, TRAIL,...

L'infection fatale par le virus EboV est caractérisée par des réponses immunes défectueuses et un effondrement total du système immunitaire. Les expériences *in vitro* ont démontré que l'infection des CD par les virus EboV-Z et MarV entraînait un défaut d'induction de cytokines pro-inflammatoires, un défaut de maturation et une inhibition de leur capacité à induire la stimulation des cellules T. La production d'anticorps est également défectueuse chez les patients décédés, puisque seulement 30% développent une réponse faible de type IgM et aucune réponse de type IgG. Cela pourrait être lié à un problème de présentation d'antigènes et à l'absence de lymphocytes T *helper*. Après une très forte activation au début de la maladie, un grand nombre de lymphocytes T est détruit par apoptose. Ces phénomènes d'apoptose sont liés à la réponse de l'hôte. Les études chez les PNH infectés par le virus EboV mettent en évidence la destruction non seulement des lymphocytes CD4+ et CD8+, mais également des cellules NK (19).

En revanche, le contrôle de l'infection par le virus EboV est associé chez l'homme à l'induction de réponses immunitaires bien régulées. Chez les survivants et les sujets asymptomatiques, la réponse inflammatoire est précoce et correctement contrôlée. De plus, les survivants développent rapidement une réponse humorale robuste, comprenant des IgM et un switch IgM/IgG. Enfin, une activation des lymphocytes T, y compris cytotoxiques, est observée au moment du contrôle de la virémie et de la disparition des symptômes.

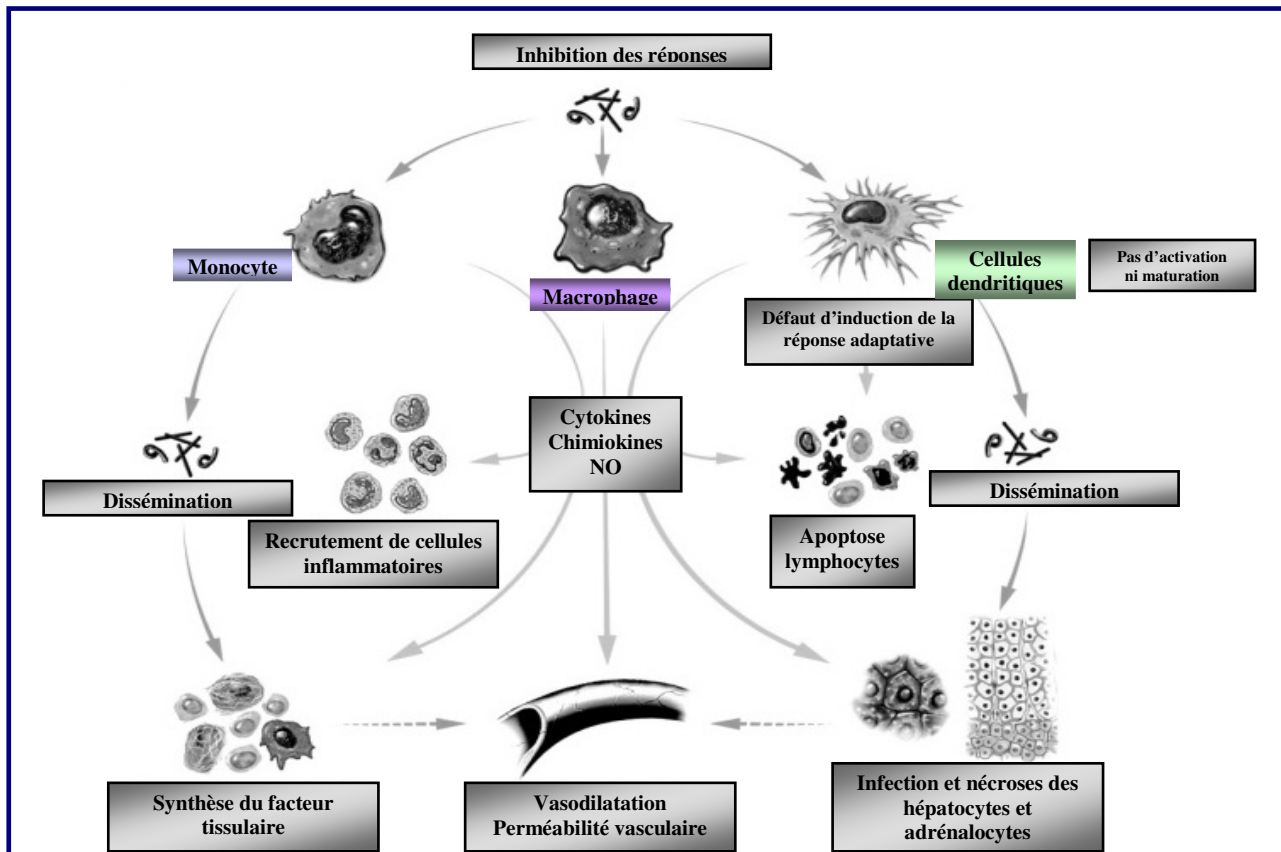
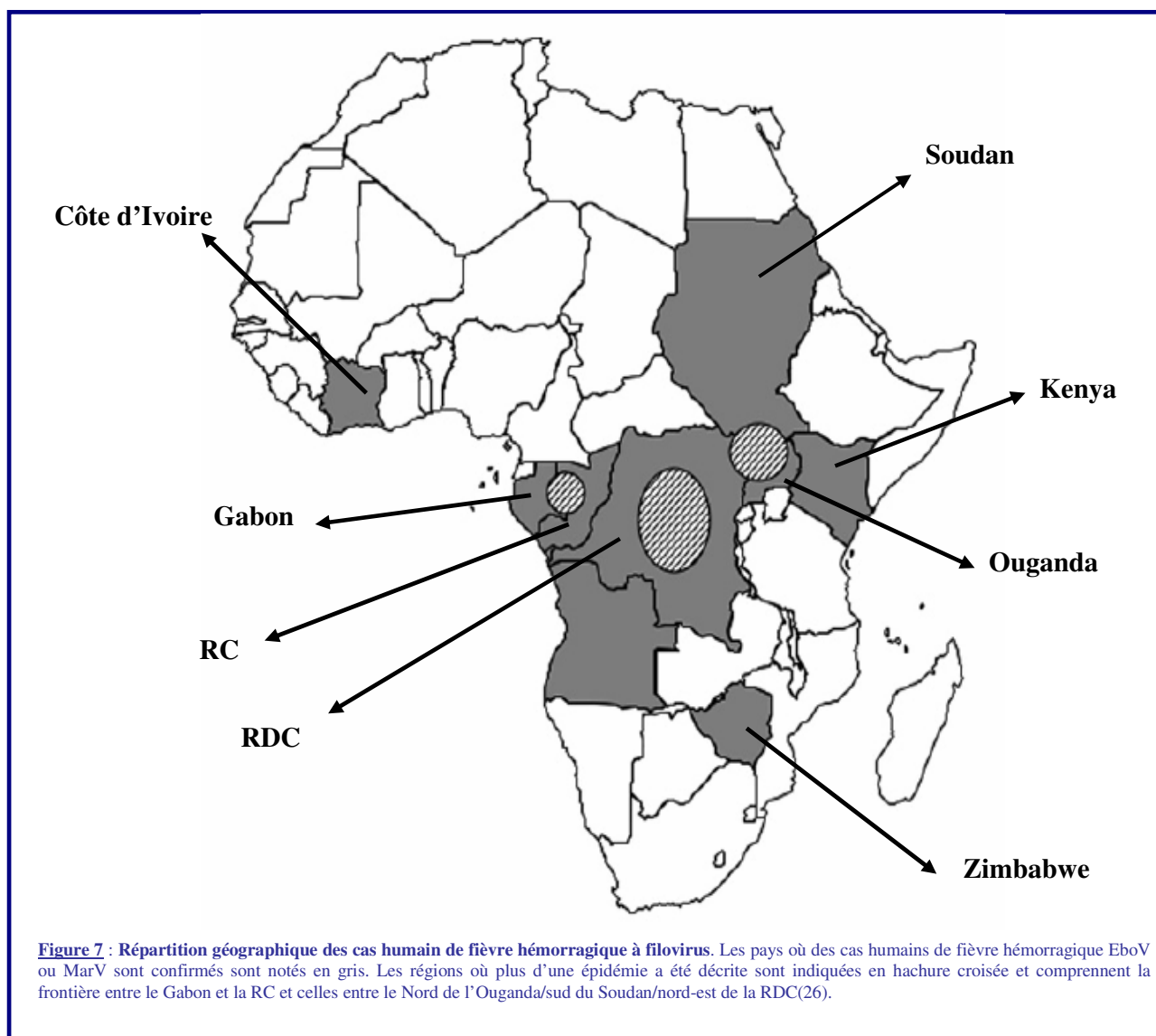


Figure 6 : Modèle de pathogenèse des fièvres hémorragiques à virus Ebola. Les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques sont les premières et principales cibles du virus EboV. L'infection d'une grande proportion de ces cellules dans les organes lymphoïdes permet la dissémination du virus à d'autres cibles, comme les hépatocytes (et d'autres cellules parenchymateuses) et les cellules endothéliales dans les stades tardifs. Le virus EboV est capable d'inhiber les réponses innées (IFN type I), mais semble sensible aussi empêcher l'induction des réponses adaptatives par les cellules dendritiques. Les macrophages infectés produisent des cytokines inflammatoires et des chimiokines qui sont impliquées dans la pathogenèse (augmentation de la perméabilité endothéliale), mais aussi expriment à leur surface le facteur tissulaire qui est à l'origine de la CIVD. D'autres facteurs sont probablement impliqués dans la pathogenèse comme le NO. Enfin, l'apoptose massive des lymphocytes T et des cellules NK, vraisemblablement induites par ces derniers facteurs et/ou par des interactions défectueuses avec les cellules présentatrices d'antigènes, contribue à l'immunosuppression qui caractérise les infections fatales (19)

5. Aspects épidémiologiques et répartition géographique

Les filovirus EboV-Z, EboV-S, EboV-CI et MarV circulent de façon endémique en Afrique Sub-Saharienne où des épidémies de fièvre hémorragique sévère surviennent occasionnellement (figure 7 et tableau 2) (26). Le taux de létalité pour le virus EboV peut atteindre 50% voire 80% respectivement pour le virus EboV-S et le virus EboV-Z. Bien qu'en 1967, l'épidémie initiale de virus MarV ait été à l'origine d'un taux de mortalité plus faible de l'ordre de 22 %, il semble que le virus MarV soit aussi virulent que le virus EboV-Z. En effet, les épidémies de 1995 au Congo et de 2005 en Angola ont été mortelles pour 80% des sujets infectés (26). Le virus EboV-R dont l'origine philippine est confirmée, étend la répartition géographique du virus à l'Asie. Cependant, aucune épidémie humaine n'a été rapportée ce jour sur ce continent malgré un taux de létalité élevé chez les PNH.

Depuis ces dernières années, l'incidence des épidémies de virus EboV et MarV est en nette recrudescence. En outre, la dernière épidémie de 2007-2008 en Ouganda a permis de mettre évidence un nouveau sous-type de virus EboV élargissant le nombre à cinq. Ainsi, il devient nécessaire de développer des stratégies vaccinales pan-filovirus capables d'assurer une protection optimale contre ces différents sous-types pour contrôler de manière efficace de futures épidémies humaines.



Filovirus	Année	Localisation épidémie	Origine de l'infection primaire	Facteurs favorisant dissémination	Cas humains (% mortalité)
<i>MarV</i>	1967	Marburg et Francfort Allemagne ; Belgrade, Yougoslavie	Importation de singes Ouganda	Dissection de singes pour récolte d'organes, transmission nosocomiale	32 (23)
	1975	Zimbabwe ; Johannesburg, Afrique du Sud ^(a)	Inconnue	Transmission nosocomiale	3 (33)
	1976	Angleterre	Contamination de laboratoire	–	1 (0)
	1980	Kisumu et Nairobi, Kenya	Exposition dans une grotte? Contact avec singes?	Transmission nosocomiale	2 (50)
	1987	Mombasa, Kenya	Exposition dans une grotte?	–	1 (100)
	1990	Russie	Contamination de laboratoire	–	1 (0)
	1998	Durba, RDC	Exposition dans une mine d'or ?	Introductions primaires et répétées chez l'homme	154 (83)
	2004	Uíge, Angola	Inconnue	Transmission nosocomiale et communautaire	252 (90)
	2007	Kamwenge, Ouganda	Exposition dans une mine d'or ?	Introduction primaire supposée pour 2 cas, avec propagation interhumaine	4 (25)
	<i>EboV-Z</i>	1976	Yambuku, RDC	Inconnue	Transmission nosocomiale
1977		Tandala, RDC	Inconnue	–	1 (100)
1994		Province d'Ogooué-Inwindo, Gabon	Inconnue	Coutumes traditionnelles de soins, transmission nosocomiale et communautaire	49 (59)
1995		Kikwit, RDC	Inconnue	Transmission nosocomiale	315 (81)
1996		Mayibout, Gabon	Consommation de chimpanzés morts	Dissémination secondaire aux sujets s'occupant d'un parent malade	31 (68)
1996		Booué, Gabon	Inconnue	Exposition durant une chasse, coutumes traditionnelles de soins	60 (75)
1996		Johannesburg, Afrique du Sud (b)	Importation du Gabon par l'intermédiaire de médecins infectés	Transmission nosocomiale	2 (50)
2001		Province d'Ogooué-Inwindo, Gabon ; Cuvette Région Ouest, RC	Chasse et consommation de PNH	Exposition durant une chasse, dissémination secondaire aux sujets s'occupant d'un parent malade, coutumes traditionnelles de soins	124 (78)
2002		Cuvette Région Ouest, RC	Chasse et consommation de PNH	Exposition durant une chasse, dissémination secondaire aux sujets s'occupant d'un parent malade	143 (89)
2003		Cuvette Région Ouest, RC	Chasse et consommation de PNH	Exposition durant une chasse, dissémination secondaire aux sujets s'occupant d'un parent malade	35 (83)
2004		Russie	Contamination de laboratoire	–	1 (100)
2007		Province Occidentale Kasai	Inconnue	Inconnue	264 (71)
1976		Maridi et Nzara, Soudan	Inconnue	Transmission nosocomiale	284 (53)
1979		Nzara, Soudan	Inconnue	Transmission nosocomiale	34 (65)
2000		Gulu, Ouganda	Inconnue	Transmission nosocomiale et communautaire	425 (53)
<i>EboV-CI</i>	2004	Yambio, Soudan	Inconnue	Inconnue	17 (41)
	1994	Forêt Taï, Côte d'Ivoire	Autopsie d'un chimpanzé	–	1 (0)
<i>EboV- nouveau sous-type ?</i>	2007	District Bundibugyo, Ouganda	Inconnue	Inconnue	149 (25)

Tableau 2 : liste des cas humains confirmés et des épidémies de fièvre hémorragique à filovirus. (a) cas index au Zimbabwe et décédé en Afrique du Sud, avec deux cas secondaires, dont une infirmière. (b) cas exporté en Afrique du sud avec contamination d'une infirmière

B. Eléments de diagnostic et de thérapeutiques

1. Diagnostic des infections à filovirus

Le diagnostic des infections à filovirus n'est pas particulièrement facile (26). En effet, à la phase aiguë de la maladie, les prélèvements doivent être manipulés avec une extrême précaution. Les échantillons suspects doivent

être envoyés à un laboratoire de sécurité maximale, après accord préalable, dans des conditions de transport strictes (triple emballage, étiquetage, autorisation de transport, déclaration de transport de matériels infectieux, etc.) selon la réglementation IATA (International Air Transport Association) pour les transports aériens, ou ADR (accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route) pour les transports routiers. Le diagnostic virologique fait appel à deux groupes de techniques mettant en évidence, soit le virus ou ses constituants, soit une réponse immunitaire spécifique des antigènes viraux.

a. Techniques de détection du virus ou de ses constituants

La méthode de référence est l'isolement en culture cellulaire, en général sur cellules Vero clone E-6 (26). L'effet cytopathique (7-10 jours) n'est pas toujours évident, et la confirmation se fait par immunofluorescence directe après grattage des cellules. Les tests ELISA sont utilisés pour la détection précoce de l'antigénémie. La technique la plus rapide est la RT-PCR soit classique en un ou deux temps, soit en temps réel (26). Elle présente l'avantage d'être réalisable sur la paillasse, une fois ajouté à l'échantillon le tampon de lyse pour l'extraction d'ARN. L'immunohistochimie est un outil très utile pour le diagnostic *postmortem* sur des tissus fixés au formol. De tels échantillons peuvent ensuite être traités à la glutaraldéhyde pour examen en microscopie électronique.

b. Techniques de détection des anticorps

A un stade plus tardif de l'infection, le diagnostic peut être réalisé en recherchant des anticorps IgM par technique ELISA capture, en sachant que ceux-ci n'apparaissent que rarement dans les formes mortelles. La détection des IgG par ELISA est très utile dans les enquêtes épidémiologiques où elle a remplacé les procédés d'immunofluorescence (26). Il n'existe pas actuellement de kits commerciaux de diagnostic sérologique et les antigènes utilisés sont dérivés de cultures de virus.

2. Aspects thérapeutiques des infections à filovirus

Il n'y a pas actuellement de traitement spécifique pour les fièvres hémorragiques EboV et MarV (26). Les seuls moyens disponibles restent la réhydratation, la lutte contre la douleur et les soins infirmiers. Des essais non randomisés de traitement par sérothérapie à l'aide de plasma humain ont été utilisés chez quelques patients lors de l'épidémie du Zaïre en 1995 mais leur efficacité n'a pas été démontrée. Par contre, des résultats encourageants ont été obtenus lors d'essais expérimentaux chez les PNH avec la protéine recombinante anticoagulante de nématode rNAPc2, puissant inhibiteur du facteur tissulaire et des phosphorodiamidate morpholino-oligomères (PMO) antisens dirigés contre les protéines VP24, VP35 et L du virus EboV (26). Enfin, une protection du cobaye contre une infection létale à virus EboV a également pu être réalisée par injection, post-exposition, de petits ARN interférents ciblant les ARNm du gène codant la polymérase du virus (26).

Approches vaccinales contre les infections à filovirus

A. Généralités

De nombreuses préparations vaccinales anti-filovirus ont été testées (tableau 3) et analysées en terme d'efficacité (capacité d'induire et de maintenir une immunité acquise et spécifique tant humorale que cellulaire si possible au niveau des sites potentiels de réplication), d'innocuité (effets indésirables limités sans induction de maladie) et de praticabilité (administration aisée, stable et de coût limité).

Les premières stratégies ont été basées sur le développement de vaccins inertes : vaccins à virus inactivés et vaccins sous-unitaires (26). Les vaccins à virus inactivés ont été produits à partir de souches de filovirus inactivées par des procédés physiques ou chimiques. Ce sont des vaccins stables et sûr d'emploi qui ont l'avantage de pouvoir être utilisés pendant la gestation et chez les immunodéprimés. Leurs inconvénients sont l'absence d'immunisation efficace au niveau des muqueuses, leur faible pouvoir immunogène (nécessité d'un adjuvant) et un coût relativement élevé. Les vaccins sous-unitaires sont fondés sur l'utilisation d'antigènes viraux obtenus par la technologie de l'ADN recombinant comportant le clonage d'un gène d'intérêt dans un plasmide et l'expression de ce gène dans un système eucaryote.

Récemment, de nouvelles stratégies vaccinales ont été testées. Elles reposent sur les technologies de l'ADN nu, des vecteurs viraux et des pseudoparticules virales VLP (26). Les vaccins à ADN sont constitués d'un ADN plasmidique contenant le gène de la glycoprotéine ou de la nucléoprotéine de filovirus exprimé à l'intérieur de la cellule sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort. Après injection, une réponse immunitaire est obtenue sans addition d'adjuvant. Les vaccins à virus recombinant sont fondés sur l'utilisation d'un vecteur codant une des protéines de filovirus. Le vecteur est un virus non pathogène possédant un génome dont une région peut être remplacée par le gène d'intérêt. Les vaccins VLP sont produits à partir de la formation de pseudoparticules similaires en taille et en morphologie à des virions et qui expriment des protéines structurales de filovirus.

Ces différentes stratégies vaccinales ont permis de mettre en évidence une protection de petits animaux de laboratoire avec une efficacité variable. Elles ont été réalisées sur souris, cobaye avec des souches adaptées à ces espèces mais aussi sur des singes le plus souvent des macaques du type cynomolgus.

B. Approches vaccinales classiques

1. Vaccins inactivés

Les premières tentatives de développement de vaccins sont basées sur des techniques classiques d'inactivation de virus. L'atténuation classique par passages sur culture cellulaire n'est pas envisageable (24). En effet, les virus EboV-Z et MarV adaptés au cobaye retrouvent leur virulence chez les PNH. En outre, le taux de réversion d'autres vaccins viraux atténués fait qu'il est improbable que des essais cliniques puissent être réalisés et qu'une autorisation de mise sur le marché soit accordée. Bien qu'il soit possible d'obtenir des clones infectieux atténués de virus MarV et EboV par des techniques de génétique recombinante, comme cela a déjà été réalisé pour l'encéphalite équine du Venezuela, il semble difficile de démontrer cette atténuation.

Un premier essai utilisant un virus MarV inactivé par formol et réalisé par l'équipe d'Ignatyev a permis d'obtenir la protection de cobayes vis-à-vis d'un challenge avec une dose relativement faible de virus (11). Une autre équipe a réalisé des tests sur six macaques avec du virus inactivés par irradiation γ ; seul trois PNH sur les six

ont survécu à un challenge léthal avec du virus MarV (12). De même, des essais avec du virus EboV-Z inactivé par formol et combiné avec de l'hydroxyde d'alun n'ont permis de protéger que des cobayes contre une injection SC de virus EboV. Des essais réalisés sur PNH n'ont pas été concluants (24). Geisbert *et al* ont expérimenté un virus EboV-Z neutralisé par irradiation γ , purifié sur gradient de sucrose et combiné à l'adjuvant RIBI ou à des liposomes sur des macaques cynomolgus ou des macaques rhésus. Aucune protection n'a pu être obtenue (7). Pour ces trois études, les réponses immunes n'étaient pas bonnes avec des taux faibles en IgG et des titres minimums ou nuls en Ac neutralisants. Cependant, dans ces trois études, il n'a été testé qu'un petit nombre d'animaux et aucun essai n'a été entrepris pour optimiser les doses, l'adjuvant ou les schémas vaccinaux.

2. Vaccins sous-unitaires

Des vaccins sous-unitaires ont également été expérimentés en exprimant la GP- EboV ou la GP-MarV dans un système d'expression baculovirus. Ces GPs recombinantes de filovirus présentent des motifs de glycosylation différents de ceux retrouvés dans les glycoprotéines de virus sauvages (8, 20). En 2001, l'équipe de Hevey a mis au point une GP de virus MarV tronquée de son domaine transmembranaire ($GP\Delta TM$) pour la tester sur des cobayes. Ils ont remarqué que cette protéine mutante couplée à l'adjuvant RIBI était capable de protéger la plupart des cobayes et lorsqu'elle était précédée par une vaccination ADN exprimant la GP-MarV, cette protection concernait l'ensemble des rongeurs. (10). Pour les cobayes vaccinés uniquement avec $GP\Delta TM$, les titres en Ac détectés par ELISA étaient comparables entre les survivants et les animaux décédés après infection et aucun Ac neutralisant n'était détecté *in vitro* avant un challenge. En 2003, Mellquist-Riemenschneider *et al* ont testé la $GP\Delta TM$ seule ou combinée avec un vaccin ADN sur des cobayes infectés par du virus EboV-Z. Ils n'ont pu constater qu'une protection partielle de ces animaux (20).

C. Approches vaccinales modernes

1. Vaccins ADN

Plusieurs vaccins ADN exprimant la GP-EboV ou la GP-MarV ont été évalués sur rongeurs. En 2001, Hevey *et al* ont réalisé sur cobayes un essai comparatif entre un vaccin ADN exprimant la Gp-MarV et d'autres stratégies vaccinales. L'immunogénicité s'est révélée plus faible avec ce vaccin ADN qui n'offrait qu'une protection incomplète (10). Par contre, ce vaccin ADN testé par l'équipe de Riemenschneider en 2003 sur des PNH s'est révélé efficace pour quatre macaques cynomolgus sur six après infection avec MarV (25). Pour le virus EboV, un vaccin ADN, exprimant la GP-EboV et expérimenté par la même équipe, a permis de protéger l'ensemble des souris infectées par EboV-Z mais s'est révélé inefficace sur cobayes vis-à-vis d'un challenge (20). Pourtant, d'autres vaccin ADN élaborés différemment et exprimant la GP-EboV ou la NP-EboV se sont montrés efficaces sur cobayes (41) et sur souris respectivement (31) mais aussi sur des PNH après un boost avec un vaccin recombinant adénovirus (28).

2. Vaccins recombinants basés sur des vecteurs viraux

Grâce au développement formidable de la biologie moléculaire, il est devenu possible d'insérer et d'exprimer des gènes d'intérêt en utilisant différents systèmes. L'approche vecteurs viraux recombinants a particulièrement attiré l'attention pour la mise au point de vaccins (17). Un vecteur viral est une construction virale ou un virus

susceptible d'intégrer un fragment d'ADN étranger. Il peut se comporter, soit de façon autonome s'il possède les séquences nécessaires à sa propagation de cellule en cellule, soit de façon déficiente s'il est dépourvu d'une ou de toutes les séquences nécessaires à sa propagation. Dans le cas de vecteurs défectifs, les séquences indispensables peuvent être complétées en trans par co-infection avec un virus auxiliaire ou du fait de leur introduction dans une cellule que l'on aura préalablement modifiée génétiquement pour cet usage.

Bien que les virus vivants induisent une plus forte réponse immune et plus durable, leur utilisation comme vecteurs vaccinaux présente un certain nombre de risques. En effet, leur pouvoir pathogène résiduel et leur capacité de diffusion chez les sujets immunodéprimés sont des inconvénients majeurs. Les vecteurs viraux défectifs sont considérés comme plus sûrs mais ils nécessitent une complémentation pour assurer une bonne protection immunitaire et persistante. Enfin, il faut tenir compte du risque d'immunisation contre le vecteur pour une population qui a déjà été exposée au virus utilisé et qui peut conduire à terme à une inefficacité du protocole vaccinal ou à une réponse immunopathologique.

Des résultats prometteurs ont été obtenus avec quatre vecteurs viraux recombinants dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 5 : vecteur virus de l'encéphalite équine vénézuélienne, vecteur adénovirus, vecteur du virus de la stomatite vésiculaire et le vecteur virus parainfluenza (24, 42). Un vecteur vaccine exprimant la GP du virus EboV-Z a développé mais a vite été abandonné devant le succès des vecteurs précédemment cités et l'état d'immunité préexistante. Ce vecteur vaccine a montré, malgré tout, son efficacité sur des cobayes mais pas sur des macaques cynomolgus (26).

Vecteurs	Origine	Type génome	Taille gène inséré	Réplication	Commercialisation	Sûreté pour l'homme	Etat pré-immunitaire vecteur	Vaccins aérosolisables chez l'homme	Essais cliniques	Remarques
<i>Alphavirus</i>	VEEV	ARNss(+)	>8 kb	Non	Complexe pour une production de masse	Oui	Non	Non	Phase I	Origine non humaine
<i>Adénovirus</i>	Adénovirus humain 5	ADN db	5-8 kb	Non	Établies	Oui	Oui	Non	Phase IIb	Immunité préexistante Dose importante nécessaire
<i>Rhabdovirus</i>	Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)	ARNsb(-)	>7 kb	Oui	Établie en laboratoire	Non testé	Non	Non	Développement préclinique	Origine non humaine Limitations comme vaccin intranasal du fait d'une potentielle neurotoxicité
<i>Paramyxovirus</i>	Virus parainfluenza humain de type 3	ARNsb(-)	>7 kb	Oui	Complexe	Oui	Oui	Oui	Développement préclinique	Immunité préexistante

VEEV : virus de l'encéphalite équine du Venezuela ; ss : simple brin ; db : double brin

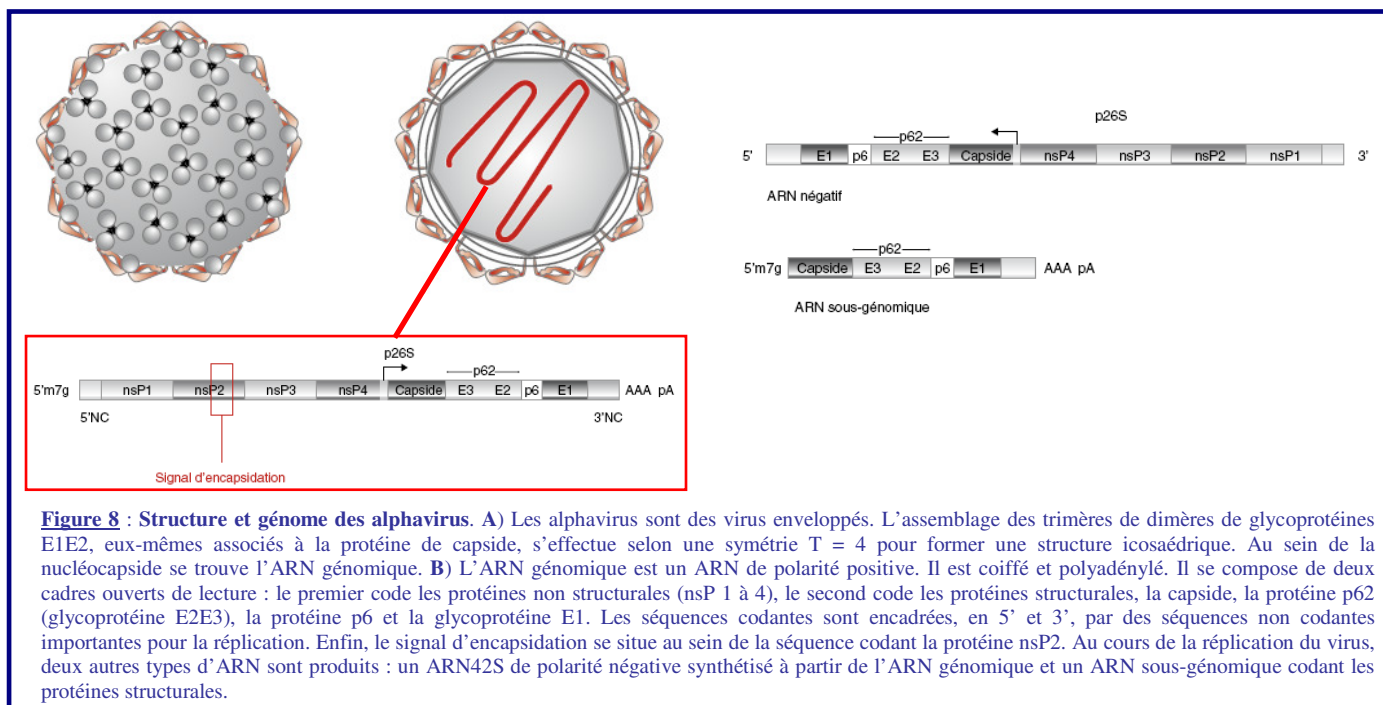
Tableau 5 : Vue d'ensemble des propriétés et applications possibles de vecteurs viraux utilisables pour une vaccination antiparasitaire (17)

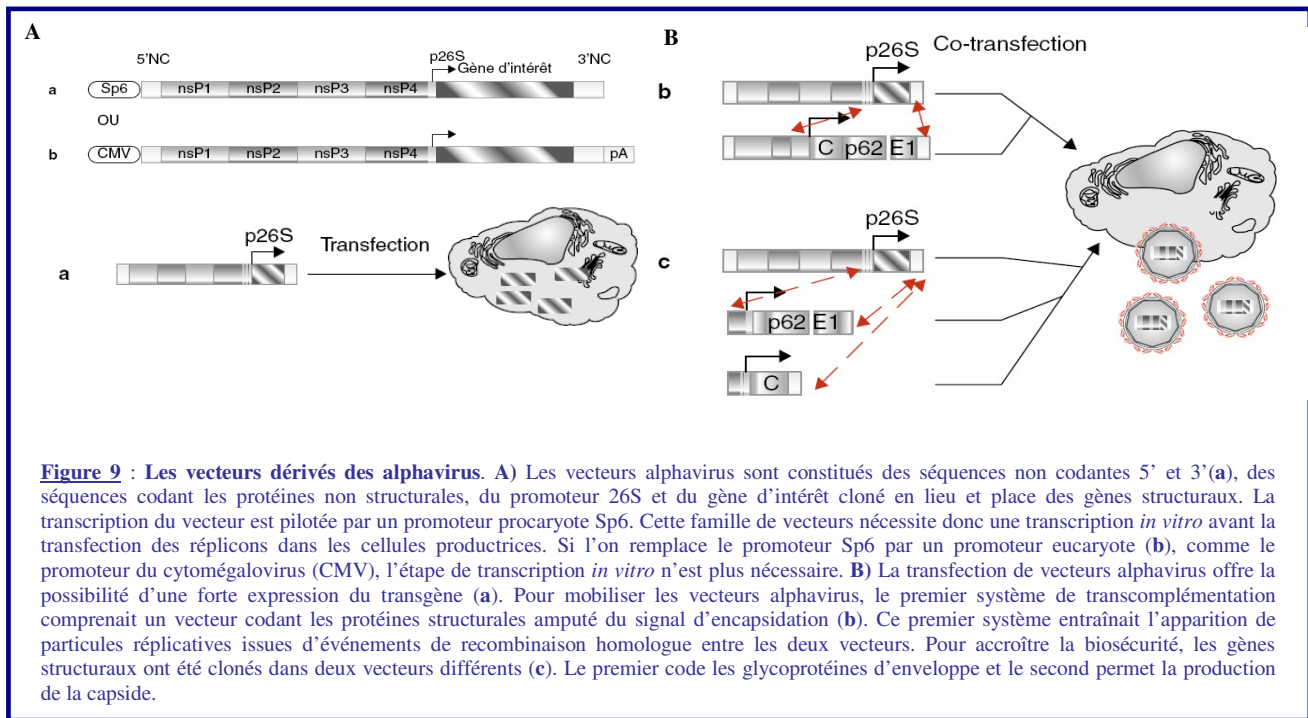
a. Pseudo-particules virales de réplicon VEEV

Les alphavirus sont des petits virus enveloppés ARN de polarité positive, qui appartiennent à la famille des *Togaviridae* (14). Le genre *Alphavirus* se compose de 24 virus répartis en 7 groupes différents qui incluent le virus de la forêt de Semliki (SFV), le virus Sindbis (SIN) et le virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV) pour lesquels des systèmes vecteurs ont été développés.

L'ARN génomique (42s) des alphavirus de 12 kb environ contient deux cadres ouverts de lecture : le premier code les protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) à activité réplicase ; le second code les protéines structurales : la protéine de capsid, la glycoprotéine p62 (E2E3), la protéine p6 et la glycoprotéine E1 (figure 8). Les protéines structurales sont produites à partir d'un ARN sous-génomique (ARN 26s) (14).

La meilleure compréhension de la structure des génomes des alphavirus et des mécanismes du cycle de réplication cytoplasmique a permis d'utiliser ces virus comme vecteurs de gènes étrangers. De tels vecteurs permettent d'exprimer tout gène dans une cellule réceptive aux alphavirus, de façon transitoire en raison de la cytotoxicité de l'infection (14). Le génome de ces vecteurs comprend : la séquence 5' non codante, la séquences codant les réplicases, le gène d'intérêt en aval du promoteur de l'ARN sous-génomique, à la place des gènes de structure et la séquence 3' non codante (figure 9). La transcription du vecteur est pilotée par un promoteur procaryote (transcription *in vitro* avant transfection dans des cellules productrice) ou par un promoteur eucaryote type CMV (cytomégalo virus où l'étape de transcription *in vitro* n'est plus nécessaire). Après transfection des ARN recombinants, l'autoréplication du vecteur et la production d'ARN 26s induisent une forte expression du transgène d'intérêt, d'autant que les synthèses cellulaires sont inhibées comme dans l'infection naturelle. Ces vecteurs sont dénommés réplicons. Pour mobiliser les vecteurs alphavirus, un système de transcomplémentation (co-infection avec un virus auxiliaire) codant les protéines de structure du virus correspondant permet de récupérer de l'ARN chimère dans des pseudo particules virales (VRP) qui pourront infecter directement d'autres cellules. Le premier système de transcomplémentation comprenait un vecteur codant les protéines structurales amputé du signal d'encapsidation. Ce premier système entraînait l'apparition de particules répliquatives issues d'événements de recombinaison homologue entre les deux vecteurs. Pour accroître la biosécurité, les gènes structuraux ont été clonés dans deux vecteurs différents (14). Le premier code les glycoprotéines d'enveloppe et le second permet la production de la capsid.





Les alphavirus sont des vecteurs très intéressants parce qu'ils peuvent infecter un grand nombre de type cellulaire et exprimer transitoirement de grande quantité de protéines virales hétérologues. En outre, leur réplication exclusivement cytoplasmique exclut toute possibilité d'intégration dans l'ADN cellulaire. De plus, ces cellules contenant ces vecteurs peuvent mourir par apoptose et le relargage de corps apoptotiques permet d'accroître les réponses immunitaires par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigène. De plus, il n'existe pas d'immunité préexistante dans la population humaine (17).

La première approche qui a permis avec succès de protéger efficacement des PNH (défini avec une protection de plus de 80%) contre une infection à filovirus est celle des VRP dérivant du VEEV et exprimant des gènes du virus MarV (9). En effet, en 1998, l'équipe de Hevey a réussi à protéger 100% des macaques cynomolgus mais aussi des cobayes contre une inoculation SC de la souche Musoke du virus MarV en les vaccinant au préalable avec des VRP contenant la GP (souche Musoke). Pour les cobayes, il n'y avait pas de différence du niveau de protection induite par une, deux ou trois doses. Malgré la présence d'IgG détectées par ELISA, aucun Ac neutralisant n'a été mis en évidence, *in vitro*, dans des macaques avant challenge léthal. Les cobayes vaccinés avec des VRP de la souche Musoke étaient aussi protégés contre d'autres souches de MarV (Ravn) (10) mais cela ne concernait pas les macaques cynomolgus.

Pour le virus EboV, des VRP exprimant la GP ou la NP de EboV-Z ont été utilisées avec succès chez des souris et des cobayes protégés d'un challenge léthal (23). D'autres tests sur souris ont permis de mettre en évidence une réponse lymphocytaire T et de générer des Ac monoclonaux protecteurs (22, 40). Malgré de bons résultats sur souris, aucune étude sur PNH n'a montré l'efficacité de VRP exprimant des protéines virales de souches hétérologues de EboV-Z (7) ou MarV.

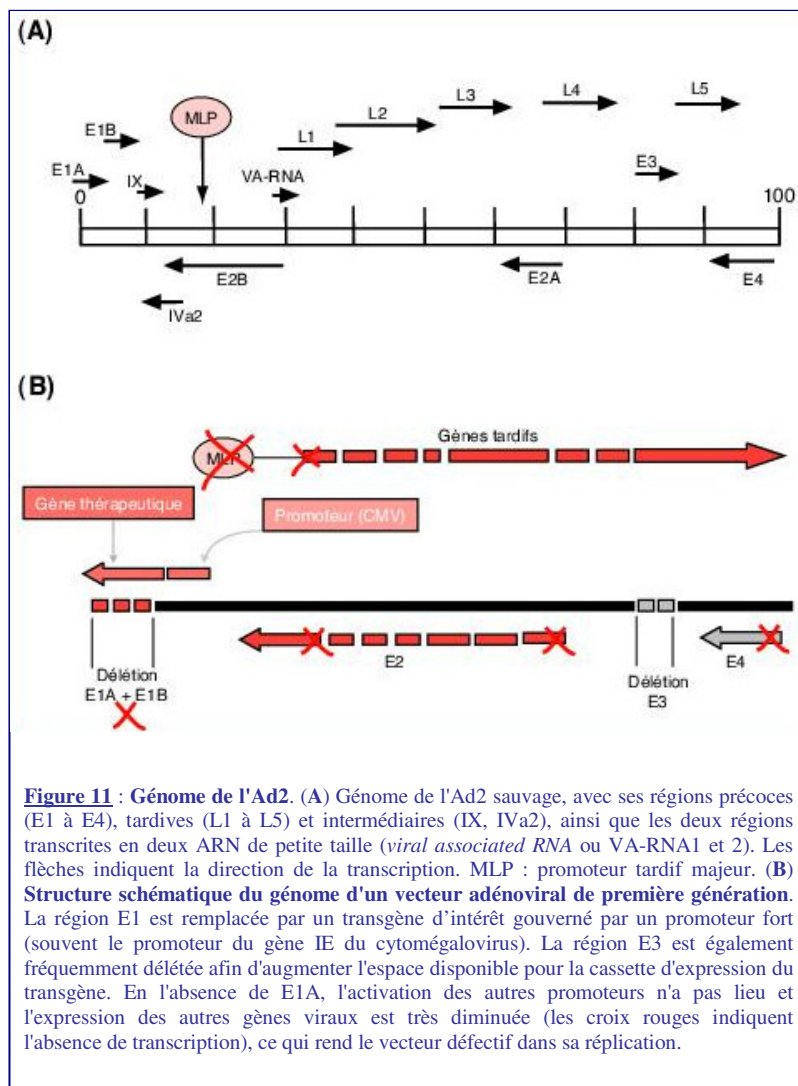
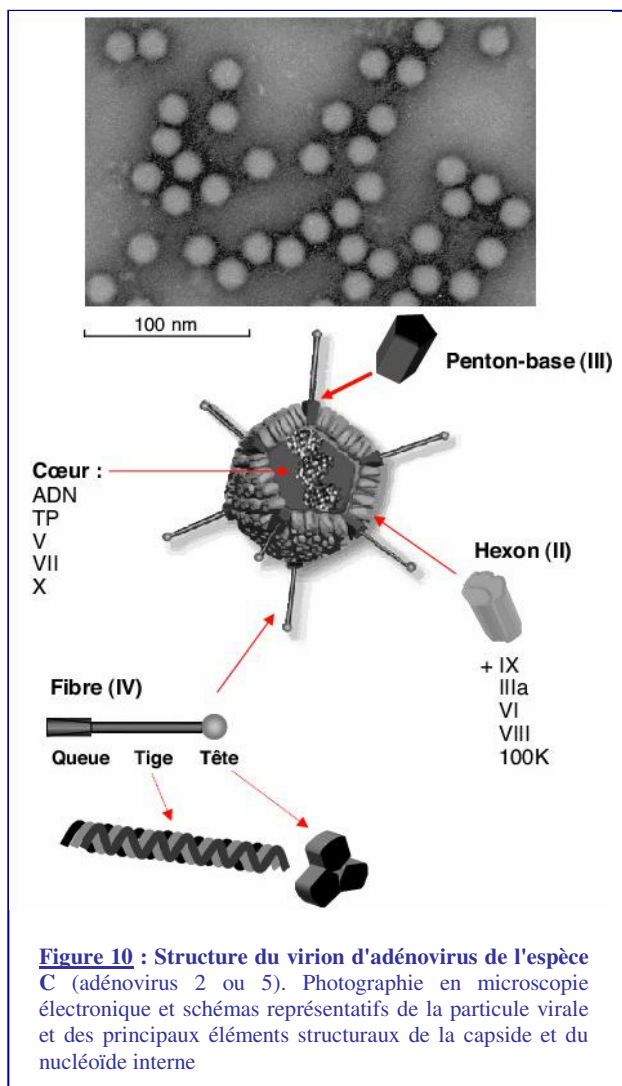
La mise sur le marché de vaccins VRP antifilovirus s'avère actuellement difficile. En effet, dans un premier temps, il paraît nécessaire de tester des combinaisons de VRP exprimant des GP provenant de souches différentes de EboV et de MarV en prenant en compte les nouvelles souches comme la souche Angola de MarV ou de nouveaux sous-types comme celui provenant d'Ouganda pour le virus EboV. En outre, il semble primordial d'optimiser les doses

et les schémas vaccinaux, en ayant à l'esprit la difficulté pour les sujets d'accepter plusieurs immunisations et la nécessité de produire suffisamment de VRP si des doses importantes sont requises. Enfin, le VEEV est considéré comme agent du risque biologique et une immunité préexistante pourrait réduire l'efficacité de ces vaccins VRP.

b. Vaccins recombinants basés sur des vecteurs adénovirus

Les adénovirus sont un groupe de virus qui appartiennent à la famille des *Adenoviridae* (2). Parmi les 51 sérotypes, les adénovirus 1, 2, 5 et 6 appartenant à l'espèce C sont les plus souvent rencontrés. Ces virus forment des particules icosaédriques de 70-100 nm de diamètre (figure 10). La capsidie protéique enserme le nucléoïde (cœur) contenant l'ADN viral. Deux éléments constitutifs majeurs, ou capsomères, composent l'essentiel de la capsidie virale : l'hexon qui forme les faces et le penton situé aux 12 sommets. Ces deux capsomères utilisent 3 des 12 polypeptides majeurs constitutifs de la particule virale. L'hexon est un trimère du polypeptide II ; le penton, enchassé entre 5 hexons contigus, est formé par l'assemblage non covalent d'un pentamère de polypeptide III, la base du penton, associé à la fibre. La fibre est une projection spiculaire émanant de la base du penton ; elle est constituée d'un trimère de polypeptide IV. Le cœur contient 4 protéines en contact étroit avec l'ADN viral. Les autres polypeptides constitutifs participent à cette structure en stabilisant les capsomères entre eux ou avec le cœur. Les génomes des adénovirus sont constitués d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire, circularisée au cours de la réplication par une protéine terminale et portant, à chacune de ses extrémités, une séquence répétée terminale inversée (ITR) de 43 à 369 nucléotides (figure 11A). La taille des génomes varie de 26 à 45 kb (elle est d'environ 36 kb pour les adénovirus 2 et 5 humains) et se subdivise en gènes précoces (E pour early), intermédiaires (codant les protéines IX et IVa2) et tardifs (L pour late), organisés en blocs de gènes fonctionnant en unités de transcription. Pendant la phase précoce, définie comme celle précédant la réplication de l'ADN viral, les ARN messagers (ARNm) sont transcrits à partir de six unités transcriptionnelles appelées E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4, chacune possédant son propre promoteur. Dès le début de la réplication de l'ADN viral, l'unité transcriptionnelle majeure est activée et aboutit à l'expression des protéines de structure du virus, à partir d'un promoteur unique appelé promoteur tardif majeur (ou MLP) (2).

Dans un but vaccinal et de thérapie génique, des vecteurs défectifs dans leur réplication ont été générés par excision de la région E1 (figure 11B). Des lignées de trans-complémentation (par ex. : la cellule HEK293, lignée de cellules de rein d'embryon humain) ayant intégré de façon stable les gènes E1A et E1B permettent de produire ces virus défectifs. Les adénovirus de type 5 et plus rarement de type 2, très peu pathogènes, ont été choisis pour la construction de ces vecteurs. Lorsqu'ils sont également amputés de la région E3, ils peuvent accueillir des inserts de taille pouvant aller jusqu'à 7,5 kb ; la capacité d'empaquetage et la tolérance de la capsidie virale ne permettant pas d'augmenter la taille de l'ADN encapsidé au-delà de 106 % du génome viral normal (2). Le transgène est placé sous le contrôle d'un promoteur viral ou humain. Ces vecteurs adénovirus de première génération présentent principalement trois inconvénients. La taille de l'insert est limitée à 7,5 kb (la réponse à cet inconvénient réside dans la génération de nouveaux vecteurs, dits de troisième génération, décrits ci-dessous). La génération possible de particules virales compétentes pour la réplication a pour résultat de contaminer les stocks viraux. Par ailleurs, le risque théorique de recombinaison avec un virus sauvage avec dissémination à l'hôte et à l'environnement n'est pas négligeable.



Afin d'améliorer les performances et la sécurité des vecteurs de première génération, de nouvelles générations d'adénovirus recombinants ont été construites. Deux buts essentiels étaient recherchés : accroître la capacité d'accueil des vecteurs de première génération ou de gènes multiples et diminuer l'immunogénicité des vecteurs du fait d'un état d'immunité préexistante dans la population. Les adénovirus de deuxième génération possèdent donc une délétion simultanée de E1 et d'une autre région essentielle du génome : E2A et/ou E4. Leur production nécessite de nouvelles lignées de trans-complémentation pour la région manquante. Ces virus sont encore plus sûrs, en terme de sécurité biologique, que les vecteurs de première génération. En effet, alors que les vecteurs de première génération présentent le risque non négligeable de complémentation/recombinaison à la fois avec les séquences virales E1 insérées dans le génome de la cellule hôte HEK-293 mais aussi avec un adénovirus sauvage, les risques de récupération de particules compétentes pour la répllication sont bien moindres pour les vecteurs multi-délétés. En revanche, ces vecteurs sont plus difficiles à produire. De nouvelles lignées cellulaires trans-complémentaires ont été générées pour minimiser encore les risques de recombinaison, par exemple en produisant les vecteurs non plus sur lignée HEK-293, dont la région génomique gauche insérée (11-12 % du génome viral) dépasse le cadre strict de la région E1A + E1B, mais sur une lignée cellulaire exprimant uniquement les fonctions manquantes du vecteur adénoviral, telles les lignées PER-C6 ou 911.

Les vecteurs de troisième génération, dits vecteurs minimum, sont presque entièrement vidés des séquences codant les gènes viraux. Leur production nécessite d'infecter les cellules, d'une part, avec le plasmide contenant le « mini-génome » viral et la cassette d'expression du transgène et, d'autre part, avec un virus auxiliaire (helper) qui apporte en *trans* les protéines nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules virales. La présence d'une mutation dans la séquence d'encapsulation du virus helper est censée lui conférer un désavantage lors de l'assemblage des particules filles.

Les vecteurs adénovirus présentent un certain nombre d'avantages pour une utilisation chez l'homme (17). Ils peuvent être facilement produits et purifiés à des titres très élevés (jusqu'à 10^{12} pfu/ml). Bien que ciblant naturellement les épithéliums de surface, leur tropisme est très large. En outre, ils peuvent être administrés par des voies très variées (intranasale, orale, intratrachéale, intrapéritonéale, SC ou IM) et ainsi induire une réponse immunitaire systémique mais aussi au niveau des muqueuses. De plus, ils ne comportent pas de risque de mutagenèse insertionnelle car leur ADN est très stable et comme ils persistent sous forme d'épisomes, ils ne s'intègrent pas dans l'ADN hôte. Enfin, il n'y a pas besoin, en général, de coadministrer des adjuvants pour obtenir une bonne réponse immune.

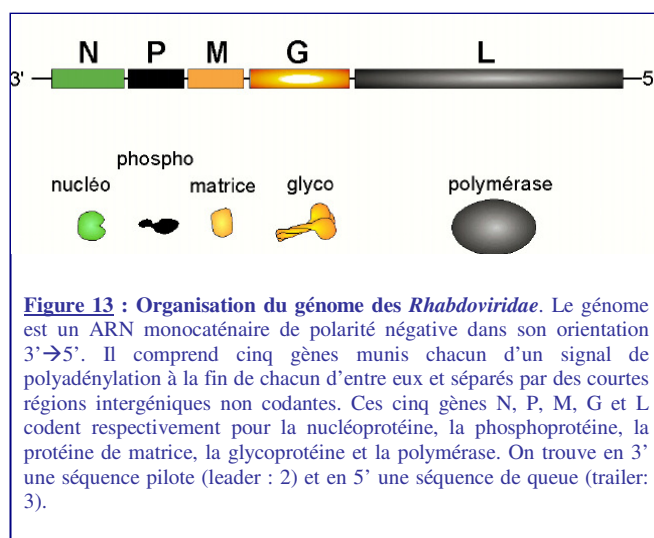
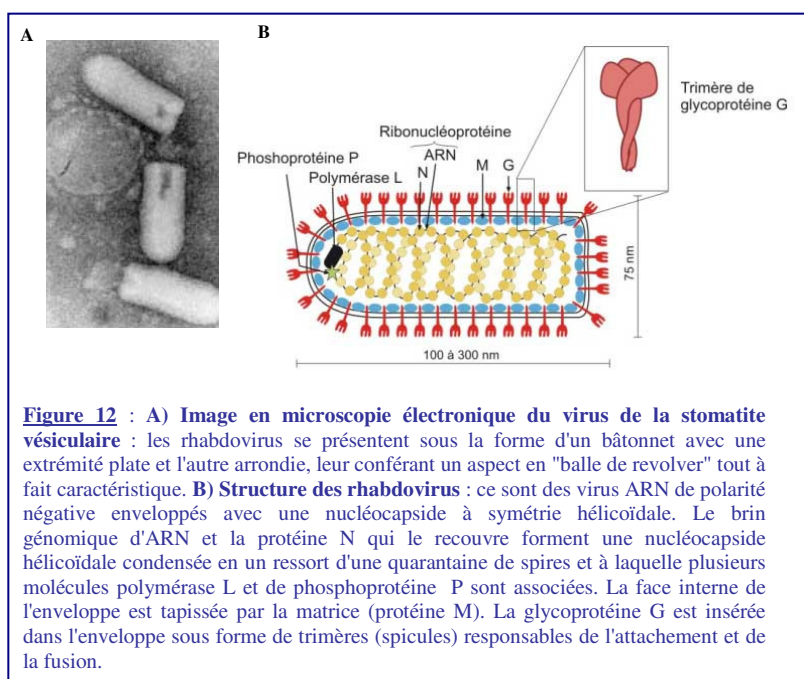
La première stratégie vaccinale destinée à protéger efficacement des PNH contre une infection EboV a été réalisée à partir d'un vaccin ADN et d'un vaccin adénovirus recombinant (28). En effet, une primovaccination suivie d'un boost avec une préparation vaccinale adénovirus type 5 exprimant la GP d'EboV-Z a permis d'induire une complète protection des PNH vis-à-vis d'un challenge léthal. Des études ultérieures ont montré d'une part, qu'une simple immunisation avec un vaccin adénovirus exprimant la GP et NP de EboV-Z ou la GP seule de EboV-Z était suffisante pour protéger efficacement des PNH et d'autre part, que la dose minimale conférant une protection était de 10^{10} pfu d'adénovirus recombinants (27). L'analyse des réponses immunitaires indique la présence d'Ac et de lymphocytes T en grande quantité dans ces PNH. Une seconde génération de vecteur adénovirus type 5 appelé CAdVax (Complex Ad-based Vaccine) a été produit en 2006 par l'équipe de Wang. Ce vecteur est délété des gènes E1 et E3 ainsi que d'une grande partie du gène E4 et exprime les GP de EboV-S et de EboV-Z (34). Ces vaccins bivalents ont permis de protéger des souris contre une infection létale au virus EboV-Z (avec une dose équivalente à 30000 fois la dose létale 50) et d'induire une forte réponse en Ac et cellulaire. Ce même vecteur CAdVax exprimant une GP dérivant des souches Musoke et Ci67 du MarV a été testé avec succès sur des cobayes (immunisation avec une dose 5×10^7 pfu) soumis à un challenge léthal avec les souches Musoke, Ci67 et Ravn du virus MarV (33).

Enfin, en 2007, Swenson *et al* ont élaboré un vaccin CAdVax exprimant la GP de cinq souches différentes de filovirus (EboV-Z, EboV-S, MarV-Ci67, MarV-Ravn et MarV-Musoke) et la NP de deux souches (EboV-Z et MarV-Musoke). Ce vaccin a assuré une complète protection de PNH (macaques cynomolgus) contre une infection avec quatre souches de filovirus (EboV-Z, EboV-S, MarV-Ci67 et MarV-Musoke) administrées chacune avec une dose correspondant à 1000 fois la dose létale (29). Cet essai montre, pour la première fois, la faisabilité d'une vaccination panfilovirus qui serait très intéressante si une épidémie naturelle de fièvre hémorragique ou une attaque biologique se déclenchait.

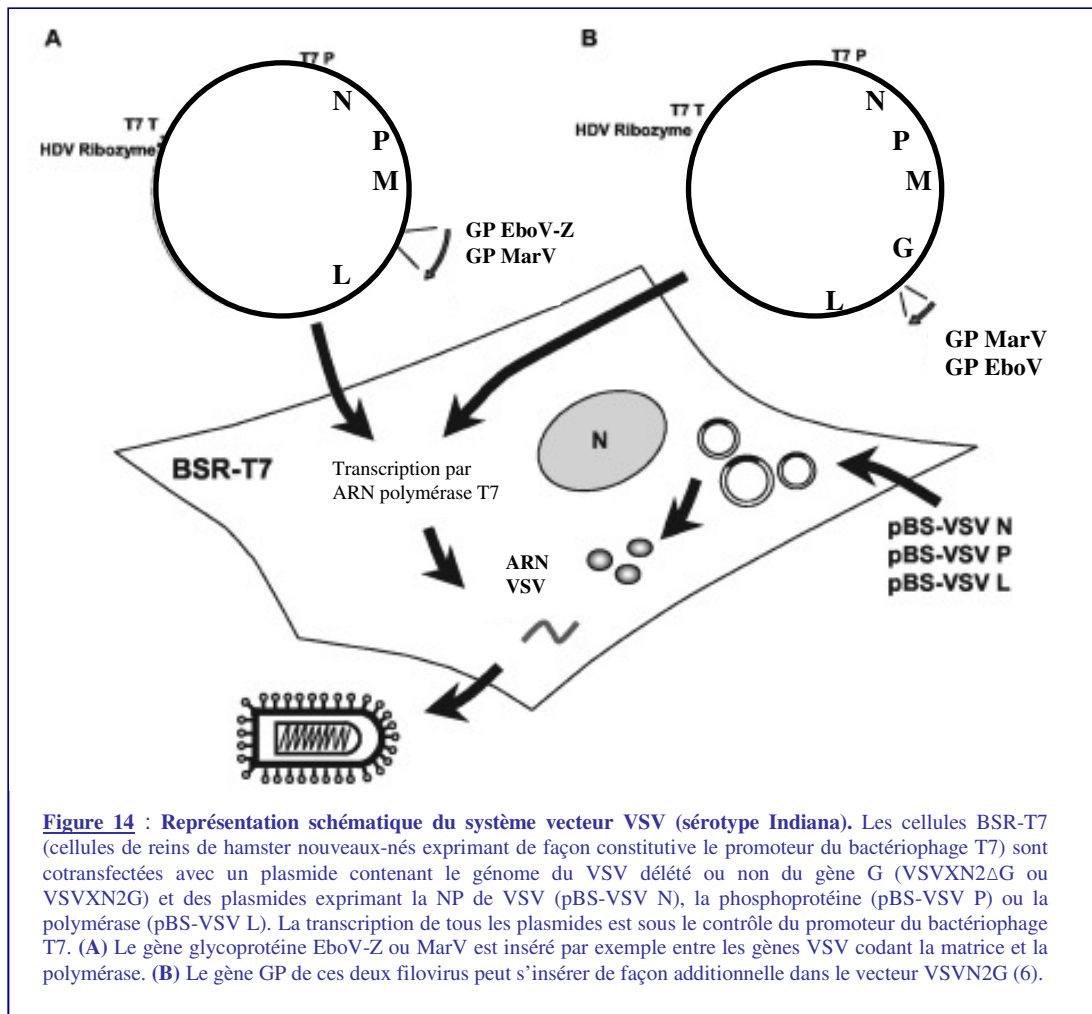
c. Vaccins recombinants basés sur des vecteurs de virus de la stomatite vésiculaire

Le VSV est un virus appartenant au genre Rhabdovirus de la famille des *Rhabdoviridae* (18) et qui infecte naturellement les animaux domestiques (sérotypes Indiana ou New Jersey) et rarement les humains, généralement

de façon asymptotique. Les Rhabdovirus se présentent sous la forme d'un bâtonnet (80 nm de diamètre, longueur variable de 120 à 180 nm) avec une extrémité plate et l'autre arrondie, leur conférant un aspect en "balle de revolver" tout à fait caractéristique. Il existe des formes filamenteuses allant jusqu'à 300 nm. Ce sont des virus enveloppés avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (figure 12). Leur génome de 12 kb comprend une région *leader* à l'extrémité 3' et une région *trailer* à l'extrémité 5'. L'ARN monocaténaire, de polarité négative est associé à une ARN polymérase ARN dépendante (protéine L). Il est constitué de cinq gènes, dont les séquences se terminent par un signal de polyadénylation, et codant chacun une protéine structurale qui sont, dans l'ordre, N, P, M, G et L (figure 13). La nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase sont associées à l'ARN viral, formant la nucléocapside. La protéine de matrice M et la glycoprotéine G, en association avec les lipides de la cellule hôte, constituent l'enveloppe. La glycoprotéine G est insérée par trimères dans la membrane lipidique, formant les spicules.



L'avènement des techniques de génétique inverse a permis la synthèse *de novo* de virus VSV à partir d'ADN complémentaires clonés (18). Plusieurs stratégies sont possibles. Un gène d'intérêt peut être inséré dans un plasmide contenant le génome du VSV délété ou non du gène codant pour la glycoprotéine. Ce plasmide VSV et des plasmides exprimant la NP, la phosphoprotéine P ou la polymérase L de VSV sont cotransfectés dans des cellules de reins de hamster nouveaux-nés exprimant de façon constitutive le promoteur du bactériophage T7 (cellules BSR-T7). La transcription de tous les plasmides est sous le contrôle de ce promoteur T7. Cela aboutit à la production de particules virales VSV recombinantes (VSVr) exprimant le gène d'intérêt (figure 14) (6). Ces vecteurs VSVr sont produits à de hauts titres et sont génétiquement stables. Leur réplication a lieu strictement dans le cytoplasme des cellules infectées et les acides nucléiques viraux (génome et antigénome) ne se recombinent pas avec l'ADN chromosomique. Des études sur souris ayant montré qu'une inoculation intranasale de ce VSVr pouvait induire des encéphalites, une nouvelle génération de vecteurs a été développée par remaniement de leur génome. Des VSVr délété de leur glycoprotéine ont été produits sur des lignées cellulaires leur apportant par complémentation la glycoprotéine en *trans*. Cependant, le développement de ces lignées cellulaires pourrait représenter un frein dans la production industrielle des VSVr (17).



Dans une étude, Jones *et al.* ont choisi d'utiliser le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) comme vecteur vaccinal contre les infection à filovirus car, l'infection à VSV étant rare chez l'homme, le risque d'immunité dirigée contre le vecteur est faible (13). De plus, il pourrait éventuellement être administré par voie orale. Dans cet essai, la glycoprotéine d'enveloppe du VSV a été remplacée par celle de EboV-Z (VSVΔG/GPEboV-Z) ou de MarV (VSVΔG/GPMarV), ce qui permet d'une part d'éviter la production d'anticorps dirigés contre le VSV et, d'autre part, de diriger la machinerie virale vers les cellules cibles des filovirus qui sont les cellules du système réticulo-endothélial. Douze macaques cynomolgus ont reçu par voie IM une dose unique de 10^7 pfu de VSVr, 6 ont été vaccinés par VSVΔG/GPEboV-Z et 6 par VSVΔG/GPMarV. Aucun animal n'a présenté de signe clinique d'infection. Des échantillons sanguins et divers écouvillonnages ont été analysés. Le VSVr a été détecté au niveau plasmatique à J2 post-vaccination chez 10 singes et dans un seul prélèvement périphérique, au niveau nasal, à J6. Les virémies observées s'expliquent probablement par une répllication localisée du VSVr ; néanmoins aucun argument ne permet de dire que la transmission du VSVr est possible. À J28, les singes ont été infectés à la dose de 10^3 pfu par EboV-Z ou par Marv. Les singes immunisés par VSVΔG/GPEboV-Z ont survécu à l'infection par EboV-Z, de même ceux immunisés par VSVΔG/GPMarV ont survécu à l'infection par MarV. Les résultats montrent également l'absence de protection croisée entre les deux membres de la famille des *Filoviridae*. Les auteurs ont étudié la réponse immunitaire pour tenter de comprendre les mécanismes de protection contre les

filovirus (13). Leurs résultats suggèrent que le contrôle de l'infection par EboV est assuré à la fois par la réponse humorale et la réponse cellulaire. En revanche, la protection contre MarV semble corrélée à la seule induction de la réponse humorale car les lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques de la glycoprotéine de MarV n'ont pas été détectés. Par ailleurs, les quatre singes immunisés contre le sous-type Zaïre ont été infectés par le sous-type Soudan, trois sont décédés et un a survécu. Toutefois, la survie de ce dernier n'est pas forcément liée à la vaccination, l'infection du macaque par EboV-Z n'étant pas toujours létale. Au contraire, tous les singes immunisés contre MarV souche Musoke et infectés par MarV souche Popp ont survécu. L'innocuité de ces vaccins vivants atténués doit être maintenant plus précisément évaluée avant de réaliser des essais chez l'homme.

d. Vaccins recombinants basés sur des vecteurs de paramyxovirus

Les paramyxovirus sont des virus enveloppés, possédant un génome constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité négative appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* (15). Le mode d'organisation et d'expression de leur génome se rapproche de celui de la famille des *Rhabdoviridae*. La réplication se déroule entièrement dans le cytoplasme. Le génome de 15-19 kb comporte 6 à 10 gènes organisés en tandem. Au coeur du virus, le génome ARN est organisé sous la forme d'une nucléocapside hélicoïdale avec la protéine de la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P) et la polymérase (L pour large). La protéine de la matrice (M) permet l'assemblage et le bourgeonnement. L'enveloppe lipidique comporte deux glycoprotéines de surface (F et HN/H/G) qui participent aux mécanismes d'entrée et de sortie du virion de la cellule. L'organisation du virion et de son génome est décrite dans la figure 15. En plus des gènes codant les protéines structurales, les paramyxovirus possèdent également des gènes codant des protéines « accessoires », les cadres de lecture étant souvent retrouvés au niveau du gène P

Comme pour les rhabdovirus, un système de génétique inverse a été élaboré pour les paramyxovirus (figure 16). Des cellules sont cotransfectées par des plasmides d'expression codant N, P et L ainsi qu'un plasmide codant pour la totalité de l'antigénome dans lequel il est possible d'insérer un gène d'intérêt. Afin d'obtenir des extrémités correctes de l'antigénome, la séquence du ribozyme (Rbz) du virus de l'hépatite delta (HDV) est fusionnée à la séquence. L'ensemble de ces plasmides est sous le contrôle du promoteur T7. Ces mêmes cellules sont infectées par un virus recombinant exprimant la polymérase T7 ou cotransfectées par un plasmide d'expression de la polymérase T7 ou bien encore transfectées dans des cellules qui expriment de manière constitutive T7. Après transfection, les néovirions générés sont amplifiés et purifiés.

Les paramyxovirus présentent un certain nombre de caractéristiques intéressantes permettant leur utilisation comme vecteur (5). La relative souplesse d'utilisation du génome permet de faire exprimer un ou plusieurs gènes étrangers par un virus naturellement ou artificiellement atténué par génétique inverse. Des virus chimères peuvent ainsi être constitués, un virus exprimant les glycoprotéines d'un autre virus par exemple. En outre, en raison d'un cycle de réplication entièrement cytoplasmique, il n'y a pas d'intégration dans le génome de la cellule hôte et les phénomènes de recombinaison sont rares.

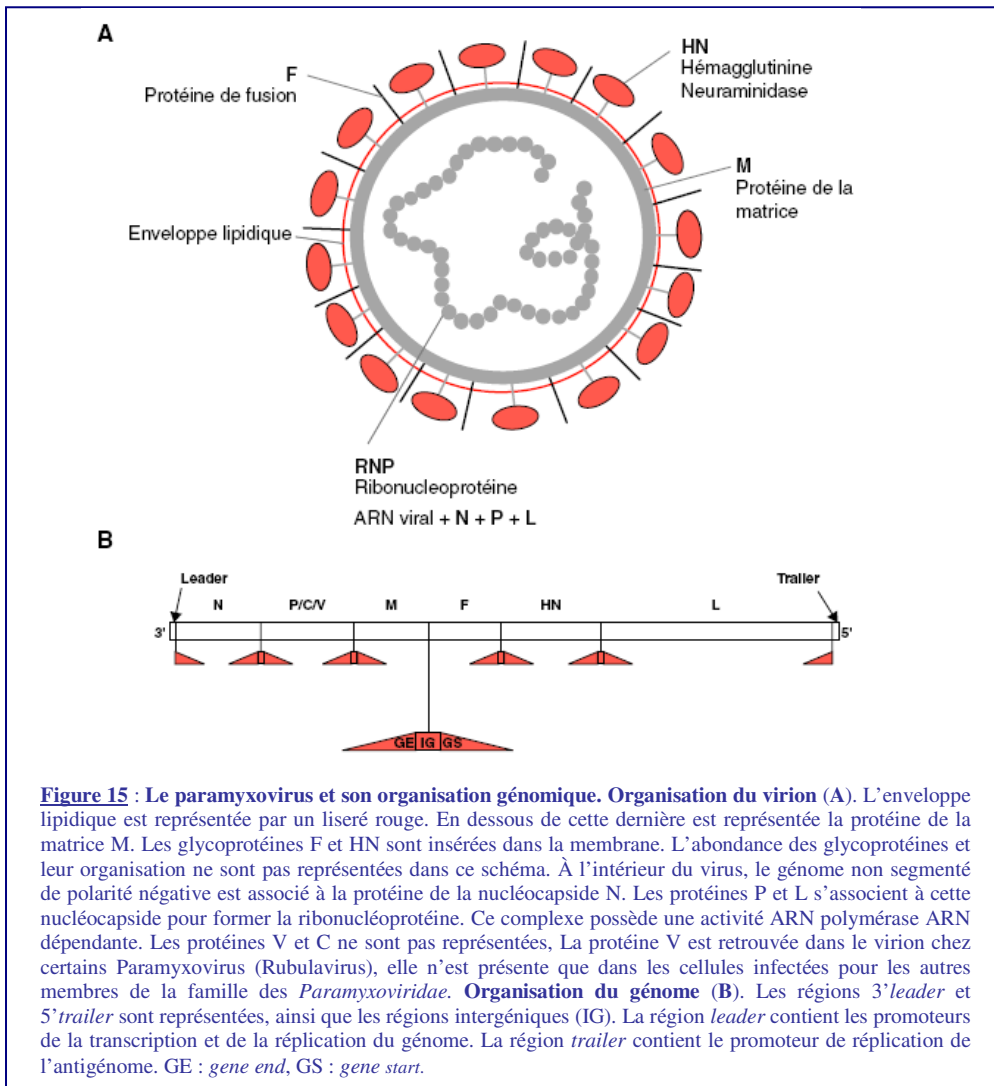


Figure 15 : Le paramyxovirus et son organisation génomique. Organisation du virion (A). L'enveloppe lipidique est représentée par un liseré rouge. En dessous de cette dernière est représentée la protéine de la matrice M. Les glycoprotéines F et HN sont insérées dans la membrane. L'abondance des glycoprotéines et leur organisation ne sont pas représentées dans ce schéma. À l'intérieur du virus, le génome non segmenté de polarité négative est associé à la protéine de la nucléocapside N. Les protéines P et L s'associent à cette nucléocapside pour former la ribonucléoprotéine. Ce complexe possède une activité ARN polymérase ARN dépendante. Les protéines V et C ne sont pas représentées. La protéine V est retrouvée dans le virion chez certains Paramyxovirus (Rubulavirus), elle n'est présente que dans les cellules infectées pour les autres membres de la famille des *Paramyxoviridae*. **Organisation du génome (B).** Les régions 3' leader et 5' trailer sont représentées, ainsi que les régions intergéniques (IG). La région leader contient les promoteurs de la transcription et de la réplication du génome. La région trailer contient le promoteur de réplication de l'antigénome. GE : gene end, GS : gene start.

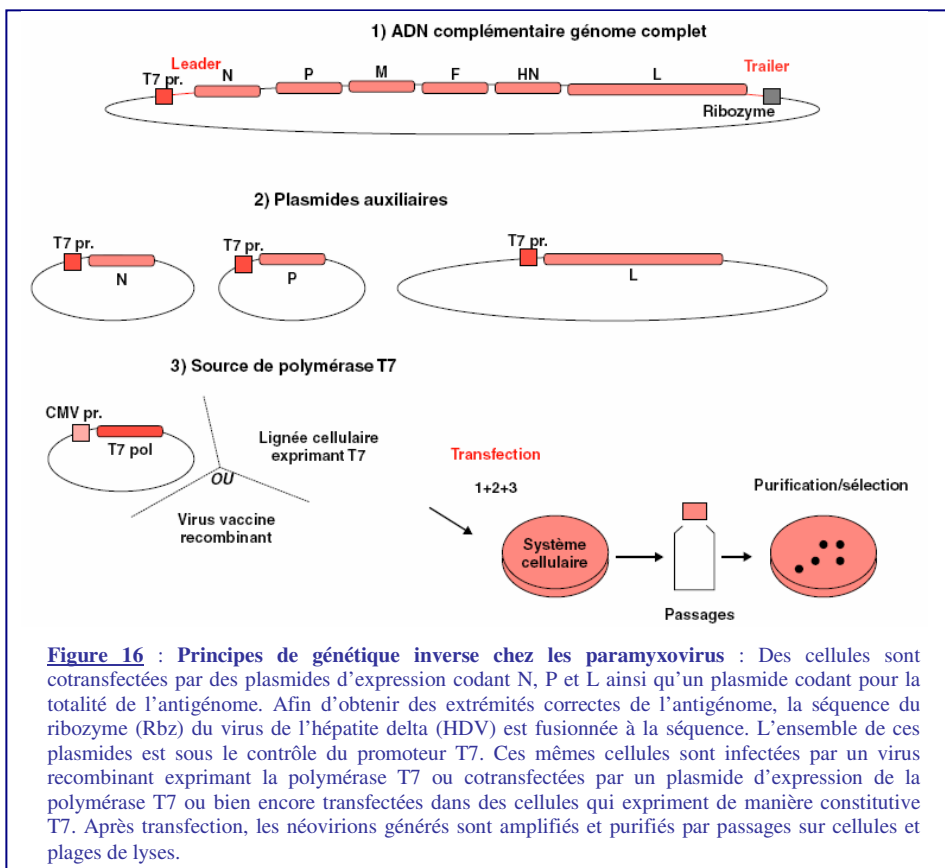


Figure 16 : Principes de génétique inverse chez les paramyxovirus : Des cellules sont cotransfectées par des plasmides d'expression codant N, P et L ainsi qu'un plasmide codant pour la totalité de l'antigénome. Afin d'obtenir des extrémités correctes de l'antigénome, la séquence du ribozyme (Rbz) du virus de l'hépatite delta (HDV) est fusionnée à la séquence. L'ensemble de ces plasmides est sous le contrôle du promoteur T7. Ces mêmes cellules sont infectées par un virus recombinant exprimant la polymérase T7 ou cotransfectées par un plasmide d'expression de la polymérase T7 ou bien encore transfectées dans des cellules qui expriment de manière constitutive T7. Après transfection, les néovirions générés sont amplifiés et purifiés par passages sur cellules et plagues de lyses.

En 2006, Bukreyev *et al* ont réalisé la construction d'un paramyxovirus recombinant, le virus parainfluenza type 3 (HPIV3) dont le génome a été modifié pour insérer le gène codant la GP du virus EboV et/ou le gène exprimant la NP EboV (5). Ils ont montré qu'une immunisation par voie intranasale avec ce HPIV3 recombinant (dose de $10^{5.3}$ pfu) permettait une protection de cobayes soumis à un challenge léthal (10^3 pfu de virus EboV par voie IP). D'autres tests, réalisés par l'équipe de Bukreyev, sur des PNH ont permis de mettre en évidence une survie de 88% de singes rhésus préalablement vaccinés par ce même HPIV3 recombinant puis infectés par le virus EboV par voie IP. Les auteurs constataient que la totalité des PNH survivait avec une seconde immunisation (4). Bien que le HPIV3 soit un virus dont la réplication se déroule dans les cellules du tractus respiratoires, le HPIV3 recombinant a un tropisme cellulaire bien plus large en raison des GP du EboV exprimées à la surface du vecteur (5). Du fait d'un état d'immunité préexistante vis-à-vis de ce HPIV3, l'efficacité d'une telle vaccination avec ce vecteur recombinant dans des essais cliniques pourrait être réduite. Pourtant cette vaccination HPIV3 recombinant par voie intranasale s'avère plus qu'intéressante pour une protection contre une infection à filovirus par aérosols. Les résultats obtenus doivent être confirmés dans des modèles d'infection de PNH.

D. Approche vaccinale pseudoparticules VLP contre les infections à filovirus

1. Caractéristiques des VLP

Les VLP ou pseudoparticules virales sont des particules de taille et de morphologie similaires à des virions issues de l'assemblage de protéines structurales virales dans des cellules hôtes. Ces VLPs présentent des caractéristiques uniques et intéressantes pour le développement vaccinal (42):

- En effet, leur nature non infectieuse et l'absence de matériel génomique les rendent sûres pour une application large et répétée.
- Elles peuvent être administrées à plusieurs reprises à des sujets vaccinés pour accroître le niveau de réponse immune.
- En outre, ces particules exposent, dans leur conformation native, des glycoprotéines virales importantes pour l'obtention d'une forte réponse immunitaire en anticorps neutralisants.
- De plus, ce sont des cibles d'intérêt pour les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques.
- Enfin, il est possible d'incorporer dans les VLPs des molécules cibles et/ou immunostimulatrices très variées ; cette grande faculté d'adaptation permet d'améliorer les réponses immunitaires.

Jusqu'ici, les seuls vaccins viraux utilisant une protéine recombinante et qui ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Agency) sont basés sur les VLPs comme le vaccin papillomavirus HPV. Les VLPs présentent, ainsi, un grand intérêt pour le développement de vaccins contre les infections à filovirus et des résultats très prometteurs ont été obtenus.

2. Assemblage des VLPs de filovirus

L'expression de la protéine de matrice VP40 dans des cellules de mammifères 293T (cellules embryonnaires de rein humain contenant l'antigène grand T du virus SV40) est suffisante à l'assemblage efficace et à la libération par bourgeonnement des VLPs. La VP40 possède des domaines d'interaction avec des facteurs cellulaires qui facilitent

la formation et la libération de particules filamenteuses alors que l'expression de la GP seule conduit à la production de vésicules sphériques pléiomorphes dans lesquelles sont enchâssées des spicules de GP. La GP semble interagir avec la VP40 puisque leur coexpression permet d'augmenter de manière significative le relargage de la VP40 sous forme de VLPs (1, 21). Des études récentes ont montré que le domaine transmembranaire de la GP du virus MarV s'avère primordial pour l'incorporation de cette glycoprotéine au sein des VLPs. D'autre part, d'autres protéines comme la NP, la VP24 et VP35 du virus EboV semblent améliorer la production de VLPs contenant la VP40 (26).

Une meilleure connaissance du processus d'assemblage des VLPs permettrait de fournir des informations précieuses pour optimiser l'immunogénicité et la production de candidats vaccins VLPs filovirus.

3. VLPs filovirus dérivant de cellules de mammifères

a. Production et caractérisations

Les VLPs-EboV et MarV peuvent être produites à partir de cultures de cellules de mammifères comme les 293T en les transfectant, au préalable, avec des vecteurs plasmidiques ADN dans lesquels sont clonés les gènes codant la VP40 et la GP. Des études sur souris ont permis de mettre en évidence la production de cytokines proinflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF α) par des cellules dendritiques en présence de VLPs EboV exprimant la VP40 et la GP alors qu'aucune activité similaire n'était pas retrouvée avec du virus EboV inactivé. D'autres travaux ont montré que des VLPs-EboV et VLPs-MarV dérivant de cellules de mammifère étaient capables de stimuler fortement la maturation des CD humaines et la production de cytokines proinflammatoires. En outre, ces CD traitées par ces mêmes VLPs peuvent induire la production de cellules T (3). Par contre, aucun marqueur de maturation n'était détecté en traitant des CD par des filovirus inactivés et aucune prolifération de cellules T n'était d'ailleurs constatée. De plus, l'équipe de Wahl-Jenson a montré l'activation de macrophages par des VLPs de filovirus et non par des virions inactivés (32). Cette caractéristique des VLPs filovirus à fortement activer les cellules présentatrices d'antigène pourrait jouer un rôle important dans l'obtention d'une bonne réponse immune protectrice vis-à-vis d'une infection à filovirus (stimulation des réponses humorales et cellulaires T). D'autre part, une simple dose de VLPs filovirus semble suffire pour accroître le nombre de cellules T CD4, de cellules T CD8 et de cellules B CD19, trois jours après immunisation (35). Enfin, d'autres protéines incorporées dans les VLPs, comme la NP, la VP24 ou la VP35 pourraient être impliquées dans la modulation de l'immunité contre une infection filovirus.

b. Immunisation contre les infections à filovirus

Plusieurs études ont démontré la capacité des VLPs filovirus à protéger de manière efficace des rongeurs et des PNH soumis à un challenge léthal. Ce sont les seuls vaccins basés sur des vecteurs non viraux qui ont été utilisés avec succès contre une infection à filovirus.

En 2003, Warfield *et al* ont montré pour la première fois que des VLPs EboV produites dans des cellules de mammifères protégeaient efficacement des souris d'une infection létale par un virus EboV adapté aux souris. Les auteurs ont constaté, bien que des niveaux similaires de réponses en Ac neutralisants étaient obtenus à la suite d'immunisations par des VLPs ou par des virus inactivés, que seules les souris vaccinées par les VLPs EboV étaient protégées contre un challenge léthal. L'immunité humorale ne semble donc pas suffire à assurer une bonne protection contre cette infection à filovirus. En effet, des études ultérieures ont permis de constater qu'un transfert

passif de sérum et de lymphocytes provenant de souris immunisées par des VLPs était nécessaire pour protéger des souris non immunisées vis-à-vis d'un challenge à virus EboV (36).

D'autre part, pour compléter leurs travaux, l'équipe de Warfield a réalisé des études sur cobayes. Ils ont montré avec succès que des cobayes préalablement immunisés par des VLPs EboV ou des VLPs MarV survivaient à un challenge léthal à filovirus (adaptés à ces rongeurs) et développaient une excellente réponse en Ac et en cellules T (30, 38). Par ailleurs, ces deux VLPs filovirus combinés à l'adjuvant Ribi se sont révélés très immunogènes en protégeant de manière efficace des cobayes après une seule immunisation ; cet essai démontre le potentiel de ces VLPs à assurer une protection rapide vis-à-vis d'une infection à filovirus (30). Enfin, des cobayes immunisés par une combinaison de ces deux VLPs ont développé des taux en Ac comparables à ceux induits après immunisation avec un seul de ces VLPs et ont été protégé efficacement contre un challenge léthal avec ces deux filovirus. Ces études montrent par conséquent que le développement vaccin VLPs combinés panfilovirus semble possible.

L'étape finale de cette stratégie VLPs filovirus a consisté à étudier ces pseudoparticules dans le modèle PNH. Ainsi, en 2007, Warfield *et al* ont montré pour la première fois que des PNH immunisés avec des VLPs EboV combiné à un adjuvant permettaient de les protéger vis-à-vis d'une infection létale à EboV (39) Dans cette étude, ils ont immunisé des macaques cynomolgus avec trois doses à 250 µg de VLPs (dérivant de cellules de mammifères) ayant incorporé dans leur structure les protéines virales VP40, GP et NP et combinées avec l'adjuvant Ribi. Les cinq PNH ont survécu à une infection létale à EboV-Z (1000 pfu) sans déclarer de signe clinique ni de virémie après challenge. L'étude des réponses immunitaires a permis de mettre en évidence des taux importants en Ac spécifiques anti-EboV et des réponses cellulaires T. Bien que la protection des PNH soit réalisée après trois immunisations, les auteurs ont constaté que les niveaux de réponse en Ac après deux immunisations étaient similaires à ceux induits après trois injections de VLPs. Tous ces essais semblent démontrer la bonne immunogénicité des VLPs EboV chez les PNH : stimulation des réponses humorales et cellulaires et protection efficace contre une infection à EboV.

4. VLPs filovirus dérivant de cellules d'insectes

a. Production et caractérisations

Les études réalisées sur les VLPs dérivant de cellules de mammifères ont permis d'initier les stratégies vaccinales VLPs contre les infections à filovirus. Cependant, ces VLPs présentent des inconvénients. Tout d'abord, le rendement de production de VLPs après transfection de cellules de mammifère avec des plasmides d'expression n'est pas très élevé et il semble difficile de produire en masse ces VLPs (42). D'autre part, ces VLPs peuvent incorporer des protéines cellulaires humaines exprimées à leur surface lors de leur processus de formation et la présence de ces protéines cellulaires peut induire une auto-immunité.

Pour surmonter ces difficultés, l'équipe de Yang a étudié la possibilité de produire des VLPs EboV dans des cellules d'insectes (42). En utilisant un système d'expression baculovirus, les auteurs ont montré que la protéine virale VP40 était essentielle et suffisante à la formation de particules filamenteuses, comme cela avait été observé avec des cellules de mammifères. D'autre part, la coexpression de protéines virales EboV telles la VP40 et la GP dans des cellules d'insectes Sf9 permet un assemblage et un bourgeonnement efficace des pseudoparticules VLPs. En outre, les taux de production de ces VLPs filovirus purifiés semblent 5 à 10 fois supérieurs à ceux obtenus avec des cellules de mammifères 293T, ce qui avait été aussi observé par l'équipe de Warfield avec des cellules

d'insectes High5 (37, 43). Au cours de ces deux études, les auteurs ont noté que les GP produites dans ces deux lignées cellulaires d'insectes avaient des poids moléculaires inférieurs à ceux des GP produites dans des cellules 293T ; cette observation s'explique probablement par des différences de glycosylation. Ye *et al* ont constaté que les VLPs EboV produits dans des cellules d'insectes induisent la sécrétion de cytokines par des CD humaines à des niveaux équivalents à ceux réalisés avec des VLPs produits sur cellules 293T. Par conséquent, il semble que les différences de glycosylation n'ont pas d'incidence sur l'activité biologique des VLPs qui induisent la maturation des CD et la production de cytokines (37, 43).

b. Immunisation contre les infections à filovirus

En 2006, l'équipe de Ye a immunisé des souris avec des VLPs EboV produits sur cellules d'insectes ; ils ont observé de fortes réponses immunes en Ac qui permettent la neutralisation de l'infection filovirale assurée par la GP incorporée dans ces VLPs (43). Cette observation met en évidence que les épitopes neutralisants des GPs de VLPs produits dans les cellules d'insectes sont préservés, malgré les différences de glycosylation retrouvées avec les cellules de mammifères. Plus récemment, Warfield *et al* ont montré qu'une immunisation avec deux doses de VLPs EboVs dérivant de cellules d'insectes et combinées avec l'adjuvant QS-21 conférait une protection à des souris soumises à un challenge léthal EboV, dont l'efficacité était équivalente voir meilleure par rapport aux VLPs dérivant de cellules de mammifères (37). De plus, dans une étude très récente, l'équipe de Yang a constaté que des VLPs EboV produits dans des cellules d'insectes sans adjuvant assuraient une bonne protection de souris, préalablement vaccinées, contre un challenge léthal EboV (42). Néanmoins, ces excellents résultats obtenus sur modèle murin nécessitent d'être confirmés sur des PNH. Cette approche VLPs dérivant de cellules d'insectes semble très prometteuse pour la mise au point de stratégies vaccinales efficaces contre les infections à filovirus, en raison des bons rendements de production de ces VLPs et des facilités de production en masse tout en respectant les bonnes procédures de fabrication

5. VLPs et réponse immunitaire innée

En 2004, Warfield *et al* ont réalisé des études sur souris et ont montré que des VLPs EboV pouvaient potentiellement activer des cellules NK (42). Les auteurs ont administré à des souris une dose de VLPs EboV un à trois jours avant un challenge léthal. Ils ont constaté d'une part, que des souris préalablement vaccinées étaient protégées et d'autre part, que cette protection faisait intervenir les cellules NK puisque des souris déficientes en cellules NK ne survivaient pas à un challenge. De plus, le transfert passif de cellules NK traitées avec des VLPs EboV à des souris déficientes permettait de les protéger aussi contre une infection létale à EboV. En outre, la présence de GP dans les VLPs EboV ne semblait pas nécessaire à la stimulation des cellules NK, contrairement à ce qui était observé pour l'activation des CD. Par ailleurs, les auteurs ont remarqué que les cellules NK traitées par des VLPs EboV incorporant la NP étaient capables d'induire la sécrétion d'IFN γ . En 2007, l'équipe de Fuller a montré que les cellules NK activées par des VLPs EboV induisaient une lyse des CD infectées par EboV ou MarV. Les auteurs ont constaté que l'activation des cellules NK par ces VLPs EboV entraînait une surexpression de récepteurs spécifiques NKp30 à la surface de ces cellules NK à l'origine de l'activité cytolytique (42). Cette capacité des VLPs à stimuler les cellules NK et à protéger les souris d'une infection à filovirus semble intéressante pour une application thérapeutique de ces VLPs. Une meilleure compréhension des mécanismes d'activation des

cellules NK par les VLPs permettrait de mettre au point des contre-mesures efficaces en pré ou post-exposition vis-à-vis d'une infection à filovirus.

E. Perspectives des approches vaccinales contre les infections à filovirus

Les épidémies de fièvre hémorragique à filovirus sont difficiles à contrôler d'autant qu'elles touchent une large région de l'Afrique centrale et qu'elles apparaissent de façon imprévisible en terme de temps et de localisation. De plus, quatre sous-types de filovirus sont particulièrement virulents pour l'homme et une protection vaccinale contre l'ensemble de ces sous-types est nécessaire. Nous avons vu que quatre préparations vaccinales permettaient de protéger efficacement des PNH vis-à-vis d'une infection à EboV et/ou MarV, chacune d'entre elles présentant des avantages et des inconvénients: trois sont basées sur des vecteurs viraux (adénovirus type 5, VSV sérotype Indiana et HPIV3) et un repose sur un vecteur non viral VLP. Des campagnes de vaccination massive des populations concernées, destinée à prévenir de futures épidémies, ne semblent pas envisageables en raison des coûts importants et des problèmes logistiques que cela pourrait engendrer. Cependant, il serait possible de développer des stratégies vaccinales adaptées et destinées d'une part, à maîtriser la propagation d'une épidémie et d'autre part, à protéger les populations les plus à risques.

Une fois l'épidémie reconnue et l'agent viral identifié, les populations à risque des régions touchées pourraient être vaccinées. Il est important que cette vaccination puisse induire rapidement une immunité protectrice avec une bonne efficacité en post-exposition. Deux stratégies vaccinales ont permis de protéger des souris immunisées juste avant un challenge et immédiatement après : VSV recombinant et les VLPs. De plus, il a été constaté que des VSV recombinant exprimant la GP EboV ou MarV et administrés 30 minutes après infection étaient capables d'assurer une protection contre un challenge léthal respectivement à virus EboV et à MarV (42). Puisque l'immunité post-exposition induite par le VSV recombinant est assurée par l'expression de la GP, alors qu'elle se fait par l'intermédiaire de la NP pour les VLPs (stimulation des cellules NK), il paraît intéressant de combiner ces deux vaccins pour mettre en évidence un éventuel effet synergique (42).

La seconde stratégie de contrôle d'une épidémie à filovirus consiste à protéger les personnels déployés dans ces régions endémiques (personnels de santé, d'associations humanitaires ou militaires). Cette stratégie consiste à provoquer un état immunitaire durable vis-à-vis des quatre sous-types de filovirus. Les vecteurs adénovirus et VLPs semblent les plus appropriés. Les VLPs présentent tout de même l'avantage d'être non infectieux et de pouvoir être administrés à plusieurs reprises dans le but de renforcer le niveau des réponses immunes (42).

Des études supplémentaires sur les VLPs semblent primordiales pour plusieurs raisons :

- Tout d'abord, mieux définir l'immunogénicité et les corrélats de protection.
- Evaluer le potentiel des VLPs filovirus dérivant de cellules d'insectes sur les modèles cobaye et PNH avant la mise en route d'essais cliniques chez l'homme:
- Optimiser les procédés de production.
- Estimer la contribution d'autres protéines virales sur l'immunogénicité de ces pseudoparticules.
- Améliorer les formules vaccinales en sélectionnant un adjuvant et en déterminant un schéma optimal de vaccination en terme de doses et de voie d'administration afin d'induire une réponse immune rapide, protectrice et durable.
- Mieux comprendre les mécanismes d'activation des CD et des cellules NK par les VLPs filovirus

- Enfin, évaluer le potentiel de VLPs panfilovirus d'une part, à assurer une protection vis-à-vis de plusieurs infections à filovirus avec différents sous-types et d'autre part, à stimuler les réponses immunitaires innées.

Conclusion

Découverts il y a bientôt 40 ans, les filovirus EboV et MarV sont régulièrement responsables d'épidémies de fièvre hémorragique en Afrique centrale avec un pronostic qui reste toujours très sombre. Malgré les nombreuses études effectuées, le réservoir n'est pas encore clairement identifié et les mécanismes expliquant leur grande virulence ne sont pas distinctement élucidés mais ils semblent liés à une réponse immune défectueuse ou inadaptée. Sur le terrain, le diagnostic est avant tout différentiel reposant sur des critères cliniques, cependant peu spécifiques. Le recours à des techniques d'isolement de biologie moléculaire et sérologiques est donc nécessaire pour établir le diagnostic sur les premiers cas, mais ces examens doivent être effectués dans des laboratoires de haute sécurité en raison de la contagiosité et de la virulence du virus.

Avec le risque d'utiliser les filovirus comme arme biologique et la recrudescence des épidémies ces dix dernières années, de multiples recherches ont été réalisées pour élaborer des stratégies de lutte. Cependant, on ne dispose toujours d'aucun traitement spécifique chez l'homme. Par contre, des progrès très significatifs ont été obtenus dans le développement de vaccins antifilovirus. Actuellement, quatre approches vaccinales, vecteurs recombinants adénovirus, VSV, HPIV3 et les VLPs, ont conféré une protection efficace de PNH, qui est le modèle animal le plus important pour évaluer un vaccin antifilovirus. Un vaccin adénovirus a assuré une complète protection des PNH contre une infection avec quatre souches de filovirus. En outre, les VLPs filovirus dérivant de cellules de mammifères se sont révélées très intéressantes pour le développement vaccinal en raison d'une part, d'une activation des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules NK et d'autre part, en induisant de bonnes réponses en Ac et en cellules T chez des PNH qui permettent leur survie après un challenge léthal à EboV. Les VLPs filovirus produites à partir de cellules d'insectes présentent l'avantage de pouvoir être produites en grande quantité, et d'être aussi efficaces que les VLPs dérivant de cellules de mammifères sur des modèles de rongeurs. Cependant, cette stratégie vaccinale VLPs résultant de cellules d'insectes doit auparavant être testée sur des PNH avant la mise en route d'essais cliniques chez l'homme. De plus, des études supplémentaires sur les VLPs semblent indispensables pour comprendre au mieux les mécanismes d'activation des cellules de l'immunité, évaluer leur immunogénicité et les corrélats de protection, et optimiser les schémas vaccinaux.

Le contrôle des épidémies à filovirus nécessite la maîtrise de la dissémination de l'infection et la protection des populations à risque plutôt qu'une vaccination préventive de masse coûteuse et difficilement réalisable en terme de logistique. La stratégie vaccinale antifilovirus consiste à assurer une rapide immunité, efficace en post-exposition et durable vis-à-vis des sous-types viraux les plus pathogènes.

La lutte contre les infections à filovirus demande, outre l'élaboration de stratégies vaccinales efficaces, la mise en place d'un système d'alerte permettant un diagnostic rapide et l'application stricte de mesures prophylactiques : comme l'isolement des sujets infectés et la prise en charge par des personnels entraînés et protégés.

Cependant, comme l'a suggéré Karl JOHNSON : « *Le virus Ebola est imprévisible. Personne ne sait ce qu'il a fait par le passé, et on ignore encore plus ce qu'il fera dans le futur.* »

Bibliographie

1. **Bavari, S., C. M. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, A. B. Will, T. W. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn, and M. J. Aman.** 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* **195**:593-602.
2. **Berk, A. J.** 2007. Adenoviridae : The Viruses and their Replication, p. 2355-2394. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields Virology*, 5ème ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
3. **Bosio, C. M., B. D. Moore, K. L. Warfield, G. Ruthel, M. Mohamadzadeh, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2004. Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* **326**:280-7.
4. **Bukreyev, A., P. E. Rollin, M. K. Tate, L. Yang, S. R. Zaki, W. J. Shieh, B. R. Murphy, P. L. Collins, and A. Sanchez.** 2007. Successful Topical Respiratory Tract Immunization of Primates against Ebola Virus. *J Virol*.
5. **Bukreyev, A., L. Yang, S. R. Zaki, W. J. Shieh, P. E. Rollin, B. R. Murphy, P. L. Collins, and A. Sanchez.** 2006. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol* **80**:2267-79.
6. **Garbutt, M., R. Liebscher, V. Wahl-Jensen, S. Jones, P. Moller, R. Wagner, V. Volchkov, H. D. Klenk, H. Feldmann, and U. Stroher.** 2004. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* **78**:5458-65.
7. **Geisbert, T. W., P. Pushko, K. Anderson, J. Smith, K. J. Davis, and P. B. Jahrling.** 2002. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **8**:503-7.
8. **Hevey, M., D. Negley, J. Geisbert, P. Jahrling, and A. Schmaljohn.** 1997. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. *Virology* **239**:206-16.
9. **Hevey, M., D. Negley, P. Pushko, J. Smith, and A. Schmaljohn.** 1998. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* **251**:28-37.
10. **Hevey, M., D. Negley, L. VanderZanden, R. F. Tammariello, J. Geisbert, C. Schmaljohn, J. F. Smith, P. B. Jahrling, and A. L. Schmaljohn.** 2001. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine* **20**:586-93.
11. **Ignat'ev, G. M., M. A. Strel'tsova, A. P. Agafonov, N. A. Zhukova, E. A. Kashentseva, and M. S. Vorob'eva.** 1994. [The immunity indices of animals immunized with the inactivated Marburg virus after infection with homologous virus]. *Vopr Virusol* **39**:13-7.
12. **Ignatyev, G. M., A. P. Agafonov, M. A. Strel'tsova, and E. A. Kashentseva.** 1996. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J Biotechnol* **44**:111-8.
13. **Jones, S. M., H. Feldmann, U. Stroher, J. B. Geisbert, L. Fernando, A. Grolla, H. D. Klenk, N. J. Sullivan, V. E. Volchkov, E. A. Fritz, K. M. Daddario, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert.** 2005. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* **11**:786-90.
14. **Kuhn, R. J.** 2007. Togaviridae : The Viruses and their Replication, p. 1001-1022. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields Virology*, 5ème ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins.
15. **Lamb, R. A., and D. P. Griffith.** 2007. Paramyxoviridae : The Viruses and their Replication, p. 1449-1496. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields Virology*, 5ème ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins.
16. **Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Delicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel.** 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**:575-6.
17. **Liniger, M., A. Zuniga, and H. Y. Naim.** 2007. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines* **6**:255-66.
18. **Lyles, D. S., and C. E. Rupprecht.** 2007. Rhabdoviridae, p. 1363-1408. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields Virology*, 5ème ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins.
19. **Mahanty, S., and M. Bray.** 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis* **4**:487-98.
20. **Mellquist-Riemenschneider, J. L., A. R. Garrison, J. B. Geisbert, K. U. Saikh, K. D. Heidebrink, P. B. Jahrling, R. G. Ulrich, and C. S. Schmaljohn.** 2003. Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs. *Virus Res* **92**:187-93.
21. **Noda, T., H. Sagara, E. Suzuki, A. Takada, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2002. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* **76**:4855-65.
22. **Olinger, G. G., M. A. Bailey, J. M. Dye, R. Bakken, A. Kuehne, J. Kondig, J. Wilson, R. J. Hogan, and M. K. Hart.** 2005. Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. *J Virol* **79**:14189-96.
23. **Pushko, P., M. Bray, G. V. Ludwig, M. Parker, A. Schmaljohn, A. Sanchez, P. B. Jahrling, and J. F. Smith.** 2000. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine* **19**:142-53.
24. **Reed, D. S., and M. Mohamadzadeh.** 2007. Status and challenges of filovirus vaccines. *Vaccine* **25**:1923-34.
25. **Riemenschneider, J., A. Garrison, J. Geisbert, P. Jahrling, M. Hevey, D. Negley, A. Schmaljohn, J. Lee, M. K. Hart, L. Vanderzanden, D. Custer, M. Bray, A. Ruff, B. Ivins, A. Bassett, C. Rossi, and C. Schmaljohn.** 2003. Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* **21**:4071-80.

26. **Sanchez, A., T. W. Geisbert, and H. Feldmann.** 2007. Filoviridae : Marburg and Ebola viruses, p. 1409-1448. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields Virology*, 5ème ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
27. **Sullivan, N. J., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, L. Xu, Z. Y. Yang, M. Roederer, R. A. Koup, P. B. Jahrling, and G. J. Nabel.** 2003. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* **424**:681-4.
28. **Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**:605-9.
29. **Swenson, D. L., D. Wang, M. Luo, K. L. Warfield, J. Woraratanadharm, D. H. Holman, J. Y. Dong, and W. D. Pratt.** 2008. Complete protection of nonhuman primates against multi-strain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol.*
30. **Swenson, D. L., K. L. Warfield, D. L. Negley, A. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2005. Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* **23**:3033-42.
31. **Vanderzanden, L., M. Bray, D. Fuller, T. Roberts, D. Custer, K. Spik, P. Jahrling, J. Huggins, A. Schmaljohn, and C. Schmaljohn.** 1998. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **246**:134-44.
32. **Wahl-Jensen, V., S. K. Kurz, P. R. Hazelton, H. J. Schnittler, U. Stroher, D. R. Burton, and H. Feldmann.** 2005. Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. *J Virol* **79**:2413-9.
33. **Wang, D., M. Hevey, L. Y. Juompan, C. M. Trubey, N. U. Raja, S. B. Deitz, J. Woraratanadharm, M. Luo, H. Yu, B. M. Swain, K. M. Moore, and J. Y. Dong.** 2006. Complex adenovirus-vectored vaccine protects guinea pigs from three strains of Marburg virus challenges. *Virology* **353**:324-32.
34. **Wang, D., N. U. Raja, C. M. Trubey, L. Y. Juompan, M. Luo, J. Woraratanadharm, S. B. Deitz, H. Yu, B. M. Swain, K. M. Moore, W. D. Pratt, M. K. Hart, and J. Y. Dong.** 2006. Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J Virol* **80**:2738-46.
35. **Warfield, K. L., C. M. Bosio, B. C. Welcher, E. M. Deal, M. Mohamadzadeh, A. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2003. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15889-94.
36. **Warfield, K. L., G. Olinger, E. M. Deal, D. L. Swenson, M. Bailey, D. L. Negley, M. K. Hart, and S. Bavari.** 2005. Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **175**:1184-91.
37. **Warfield, K. L., N. A. Posten, D. L. Swenson, G. G. Olinger, D. Esposito, W. K. Gillette, R. F. Hopkins, J. Costantino, R. G. Panchal, J. L. Hartley, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2007. Filovirus-like particles produced in insect cells: immunogenicity and protection in rodents. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S421-9.
38. **Warfield, K. L., D. L. Swenson, D. L. Negley, A. L. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2004. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine* **22**:3495-502.
39. **Warfield, K. L., D. L. Swenson, G. G. Olinger, W. V. Kalina, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2007. Ebola Virus-Like Particle-Based Vaccine Protects Nonhuman Primates against Lethal Ebola Virus Challenge. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**:S430-7.
40. **Wilson, J. A., M. Hevey, R. Bakken, S. Guest, M. Bray, A. L. Schmaljohn, and M. K. Hart.** 2000. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* **287**:1664-6.
41. **Xu, L., A. Sanchez, Z. Yang, S. R. Zaki, E. G. Nabel, S. T. Nichol, and G. J. Nabel.** 1998. Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* **4**:37-42.
42. **Yang, C., L. Ye, and R. W. Compans.** 2008. Protection against filovirus infection: virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines* **7**:333-44.
43. **Ye, L., J. Lin, Y. Sun, S. Bennouna, M. Lo, Q. Wu, Z. Bu, B. Pulendran, R. W. Compans, and C. Yang.** 2006. Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology* **351**:260-70.