



HAL
open science

**Développement d'un vecteur virus de la vaccine,
réplicatif et atténué, pour la vaccination antivariolique
et pour la vaccination contre la fièvre hémorragique à
virus Ebola**

Julie Dimier

► **To cite this version:**

Julie Dimier. Développement d'un vecteur virus de la vaccine, réplicatif et atténué, pour la vaccination antivariolique et pour la vaccination contre la fièvre hémorragique à virus Ebola. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV070 . tel-00870840

HAL Id: tel-00870840

<https://theses.hal.science/tel-00870840>

Submitted on 8 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Virologie, Microbiologie et Immunologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Julie DIMIER

Thèse dirigée par le Dr Jean-Marc CRANCE

préparée au sein de l'**Institut de Recherche Biomédicale des Armées - Unité de Virologie**
dans l'**École Doctorale Chimie Science du Vivant**

Développement d'un vecteur virus de la vaccine, réplcatif et atténué, pour la vaccination antivariolique et pour la vaccination contre la fièvre hémorragique à virus Ebola

Thèse soutenue publiquement le 30 octobre 2012,
devant le jury composé de :

M. Henri AGUT

Professeur à l'université Pierre et Marie Curie, Paris (Rapporteur)

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire, Toulouse (Rapporteur)

M. Robert DRILLIEN

Directeur de recherche à l'IGBMC, Illkirch (Invité)

Mme Anne-Laure FAVIER

Directeur de recherche à l'IRBA, Grenoble (Membre)

M. Daniel GARIN

Professeur au Val de Grâce, Paris (Invité)

M. Patrice MORAND

Professeur à l'université Joseph Fourier, Grenoble (Membre)

M. Viktor VOLCHKOV

Professeur à l'École Normale Supérieure, Lyon (Membre)

M. Jean-Marc CRANCE

Directeur de recherche à l'IRBA, Grenoble (Directeur de thèse)



REMERCIEMENTS

Que les membres de ce jury trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements

Monsieur le Docteur Jean-Marc Crance pour s'être engagé à mes côtés en tant que directeur de thèse. Je le remercie sincèrement de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet depuis mon master. Je le remercie chaleureusement pour ses nombreux conseils, sa disponibilité sans faille dès que je frappais à sa porte mais aussi pour sa rigueur et son investissement dans ce projet. J'aimerais qu'il trouve en ces quelques mots toute ma gratitude pour son aide inestimable dans les étapes de ce projet et la rédaction de ce manuscrit,

Monsieur le Docteur Robert Drillien pour sa participation indispensable à ce projet. Je le remercie chaleureusement pour son aide et sa disponibilité, pour ses conseils, ses encouragements et son optimisme. Merci pour avoir persévéré dans les clonages et pour tout le temps précieux qu'il m'a accordé,

Madame le Docteur Anne-Laure Favier pour ses précieux conseils, sa bonne humeur permanente et son soutien au cours de ces années,

Monsieur le Professeur Daniel Garin, aujourd'hui responsable de la recherche et de l'expertise à l'IRBA, pour m'avoir accueillie dans son unité il y a cinq ans et me faire l'honneur de participer à ce jury,

Monsieur le Professeur Patrice Morand qui m'a fait l'honneur il y a trois ans de faire partie de mon comité de suivi de thèse et qui aujourd'hui, accepte à nouveau de juger ce travail,

Monsieur le Professeur Viktor Volchkov, directeur du laboratoire des Filovirus au P4 Jean Mérieux, pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger mon travail,

Monsieur le Professeur Henri Agut qui suit avec intérêt les travaux du laboratoire depuis plusieurs années, pour avoir accepter une nouvelle fois la tâche de rapporteur et pour avoir donner de son temps précieux pour juger ce travail,

Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli qui a eu la gentillesse d'accepter, en un temps très court, de donner de son temps précieux pour juger ce travail en tant que rapporteur

Je remercie la Délégation Générale pour l'Armement qui a permis le financement de cette thèse et l'association ARAMI pour avoir financé ma participation aux congrès.

Que toutes les personnes qui ont eu la gentillesse de me soutenir dans la réalisation de ce travail, trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance

Le médecin général inspecteur Eric Multon et le pharmacien en chef Jacques Mathieu pour m'avoir accueillie au Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, au sein du département de Microbiologie.

Le pharmacien en chef Christophe Peyrefitte pour m'avoir accueillie au sein de l'unité de virologie et pour ses précieux conseils.

Je remercie toutes les personnes de l'unité de virologie, présentes et passées :

Danielle Gratier pour m'avoir tout appris... Je la remercie chaleureusement pour sa gentillesse, sa patience, sa pédagogie et ses précieux conseils d'organisation pour éviter de se perdre au milieu des tubes. Frédéric Iseni, mon premier directeur de stage au CRSSA, qui m'a laissé ma chance il y a cinq ans maintenant en me proposant un stage qui a changé ma vie. Corinne Ducournau, Aurélie Georges et Stéphane Richard pour m'avoir supportée pendant ces années, pour leurs conseils, leur expérience, leur humour - souvent à mes dépens - mais surtout pour avoir toujours répondu présents quand j'en avais besoin (pour le P3 notamment). Julien Perino et Solenne Vigne, pour m'avoir montré la voie. Audrey Rembert, pour sa gentillesse, son Esprit, son aide précieuse en cytométrie en flux, sa bonne humeur et son soutien dans les moments critiques.

Merci à Olivier pour ses conseils, à Marie-Ange pour son efficacité et sa bonne humeur, à Céline et à Claire pour leur gentillesse et nos nombreuses discussions, à Yannick Trescos, virologue d'adoption et compagnon de galère en cytométrie, pour son aide au microscope et pour les DC.

Je souhaite aussi remercier la BA et surtout David Bois pour sa gentillesse, pour ses connaissances et son aide lors des expérimentations animales et Yves Gauthier pour m'avoir laissé monopoliser la salle Exp1 de l'animalerie A2.

Mes derniers remerciements vont à ma famille sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je les remercie pour leur soutien malgré mes humeurs parfois massacantes, leurs encouragements et leur confiance.

Enfin je dédie cette thèse à un homme exceptionnel disparu trop vite

RESUME

Le virus Ebola, responsable d'une fièvre hémorragique virale létale et le virus de la variole, agent étiologique de la variole, sont des armes biologiques potentielles. Il n'existe pas de traitement ou de prophylaxie autorisés contre le virus Ebola, quelques candidats vaccins étant en cours de développement. Concernant la variole, des vaccins dits de première génération (virus de la vaccine) ont permis l'éradication de la maladie cependant ils sont à l'origine de complications post-vaccinales parfois sévères alors que des vaccins plus récents dits de troisième génération, non-réplicatifs, ont été développés pour leur innocuité mais restent faiblement immunogènes.

Nous avons récemment développé plusieurs vecteurs viraux de type virus de la vaccine (VACV) par délétion d'un certain nombre de facteurs de virulence. Nous avons évalué leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité en tant que candidats vaccins antivarioliques chez la souris puis utilisé l'un de ces vecteurs pour développer un candidat vaccin bivalent antivariolique et anti-virus Ebola.

Ces virus de la vaccine délétés sont réplicatifs mais fortement atténués. Ils induisent une réponse en anticorps neutralisants spécifiques anti-vaccine similaire à celle induite par le vaccin antivariolique de première génération et induisent des réponses immunitaires cellulaires CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques suffisantes pour protéger l'animal d'une épreuve létale de cowpoxvirus en intranasal, simulant une infection par le virus de la variole. Le virus délété le plus immunogène et le plus sûr, nommé MVL, a été utilisé pour construire un vecteur viral codant pour la glycoprotéine du virus Ebola (GP). Le gène entier de la GP ou une forme chimérique de la GP (fusion entre l'ectodomaine de la GP et le domaine transmembranaire de la glycoprotéine B5 du VACV) ont été clonés dans le génome du vecteur viral. Ces deux vecteurs produisent des virus ayant incorporé EGP dans leur enveloppe. Ces deux candidats vaccins recombinants induisent de fortes réponses humorales spécifiques anti-GP d'Ebola et anti-vaccine chez la souris immunocompétente.

En conclusion, nous avons développé plusieurs candidats vaccins antivarioliques aussi immunogènes et efficaces que le vaccin historique et avec une atténuation similaire aux vaccins de troisième génération. L'un de ces candidats (MVL) a été utilisé comme vecteur viral pour exprimer la glycoprotéine hétérologue, contre laquelle il induit une réponse immunitaire humorale forte.

ABSTRACT

Ebola virus, causing a lethal haemorrhagic fever and variola virus, the agent of smallpox are potential biological weapons. There is no treatment and no prophylaxis authorised against Ebola, although some vaccine viral vectors were developed over the last few years. Concerning smallpox, several types of vaccines exist against smallpox (based on vaccinia virus), the first generation vaccines that allowed disease eradication but were responsible for some post-vaccination complications and non-replicative 3rd generation vaccines, which are safe but not very immunogenic.

We have recently developed several vaccinia virus (VACV) mutants by deletion of selected virulence genes, and we have evaluated their safety, immunogenicity and efficacy as smallpox vaccines in mice and used one of them as a bivalent vaccine against Ebola and smallpox.

These viral vectors are highly attenuated and replication competent. They induce a neutralizing specific-VACV antibody response similar to that of the historical vaccine and induce VACV-specific CD8⁺ and CD4⁺ immune responses sufficient to protect immunocompetent mice challenged intranasally by cowpox virus, simulating variola virus infection. The safest and most immunogenic vaccinia virus mutant, named MVL, has been used to construct a vector encoding the Ebola glycoprotein (GP) for immunization against Ebola. The native GP gene or a chimeric GP gene (fusion between the GP ectodomain and the transmembrane domain of the VACV B5 glycoprotein) have been cloned into the viral vector genome. These two recombinant vaccine candidates induce specific humoral immune responses against Ebola GP and vaccinia virus in immunocompetent mice.

In conclusion, we have developed several vaccine candidates against smallpox that are as immunogenic and protective as the historical vaccine and as safe as 3rd generation vaccines. One of these candidates, MVL, has been used as a viral vector to express the heterologous glycoprotein, against which it induces a strong humoral immune response.

MOTS-CLES

Virus de la vaccine

Variole

Virus Ebola

Fièvre hémorragique à virus Ebola

Vaccins antivarioliques

MVL

Glycoprotéine

Réponse immunitaire

Innocuité

Immunogénicité

Efficacité vaccinale

KEYWORDS

Vaccinia virus

Smallpox

Ebola virus

Ebola hemorrhagic fever

Smallpox vaccines

MVL

Glycoprotein

Immune response

Innocuity

Immunogenicity

Vaccine efficacy

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Schémas représentatifs de l'évolution de l'infection par le virus de la variole (*verso P 39*)
- Figure 2 Evolution de l'exanthème chez un enfant atteint de la variole (*verso P 41*)
- Figure 3 Représentation de la première vaccination d'Edward Jenner (*verso P 45*)
- Figure 4 Infection par le monkeypoxvirus (*verso P 49*)
- Figure 5 Infection par le cowpoxvirus (*verso P 51*)
- Figure 6 Famille des *Poxviridae* (*verso P 53*)
- Figure 7 Photo d'un Orthopoxvirus en microscopie électronique (*verso P 55*)
- Figure 8 Représentation schématique des deux formes infectieuses virales : IMV et EEV (*verso P 55*)
- Figure 9 Cycle de réplication des orthopoxvirus dans la cellule hôte (*verso P 57*)
- Figure 10 Mécanismes d'entrée dans la cellule des formes EEV et IMV (*verso P 59*)
- Figure 11 Mécanismes de maturation et de sortie de la cellule des particules virales (*verso P 59*)
- Figure 12 Composantes des réponses immunitaires impliquées dans la protection contre les orthopoxvirus (*verso P 65*)
- Figure 13 Production et récupération du virus vaccinal (*verso P 69*)
- Figure 14 Vaccinostyle et aiguille bifurquée (*verso P 69*)
- Figure 15 Evolution de la prise vaccinale (*verso P 71*)
- Figure 16 Complications post-vaccinales (*verso P 73*)
- Figure 17 Schéma des délétions génomiques naturelles de la souche MVA (*verso P 81*)
- Figure 18 Distribution géographique des épidémies de filovirus (*verso P 95*)
- Figure 19 Photos de chauves-souris susceptibles d'être le réservoir naturel du virus Ebola (*verso P 95*)
- Figure 20 Famille des *Filoviridae* (*verso P 97*)
- Figure 21 Morphologie et organisation du virus Ebola (*verso P 99*)
- Figure 22 Modèle d'assemblage des particules virales d'Ebola (*verso P 99*)
- Figure 23 Schéma des modifications subit par la glycoprotéine du virus Ebola lors de l'étape d'entrée dans la cellule (*verso P 103*)

-
- Figure 24 Cycle de réplication du virus Ebola (*verso P 105*)
- Figure 25 Modèle de la pathogénèse de la fièvre hémorragique à virus Ebola (*verso P 111*)
- Figure 26 Mécanisme d'inhibition de la voie de signalisation de l'INF par les protéines VP35 et VP24 (*verso P 113*)
- Figure 27 Structure de la glycoprotéine d'Ebola (*verso P 121*)
- Figure 28 Stratégies vaccinales utilisées pour les différents candidats vaccins anti-Ebola en cours de développement (*verso P 127*)
- Figure 29 Représentation schématique des délétions ciblées du virus clonal VV-Lis 107 (*verso P 155*)
- Figure 30 Représentation schématique des constructions MVL-EGP et MVL-EGPB5 (*verso P 195*)
- Figure 31 Carte de restriction des plasmides utilisés pour la construction des virus recombinants (*verso P 197*)
- Figure 32 Les plages de lyse isolées sont pures et les virus ont inséré le gène hétérologue dans leur génome (*verso P 197*)
- Figure 33 Les virus recombinants expriment le gène d'EGP ou d'EGPB5 (*verso P 199*)
- Figure 34 Les glycoprotéines EGP et EGPB5 sont détectées sur les enveloppes d'EEV en western blot (*verso P 201*)
- Figure 35 Les particules EEV de MVL-EGP et de MVL-EGPB5 ont incorporé respectivement EGP et ou EGPB5 dans leur enveloppe (*verso P 201*)
- Figure 36 L'insertion des gènes d'EGP ou d'EGPB5 dans le génome de MVL n'altère pas l'innocuité du vecteur viral MVL (*verso P 205*)
- Figure 37 Les candidats vaccins MVL-EGP et MVL-EGPB5 induisent une réponse humorale spécifique anti-glycoprotéine du virus Ebola et anti-B5 (*verso P 207*)
- Figure 38 Les candidats vaccins MVL-EGP et MVL-EGPB5 induisent un titre élevé d'anticorps anti-glycoprotéine du virus Ebola et anti-B5 à la dose de 10^5 pfu (*verso P 209*)
- Figure 39 Prédiction de domaine coiled-coil dans les glycoprotéines B5, EGP et EGPB5 (*verso P 213*)

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 Liste des orthopoxvirus et caractéristiques épidémiologiques (*verso P 55*)
- Tableau 2 Liste et caractéristiques des vaccins antivarioliques (*verso P 67*)
- Tableau 3 Liste et caractéristiques des candidats vaccins antivarioliques (*verso P 75*)
- Tableau 4 Liste des épidémies de fièvres hémorragiques à virus Ebola (*verso P 93*)
- Tableau 5 Aspects cliniques de la fièvre hémorragique à virus Ebola (*verso P 111*)
- Tableau 6 Liste des épitopes des protéines du virus Ebola reconnus spécifiquement par les LT CD8+ cytotoxiques (*verso P 119*)

LISTE DES ABREVIATIONS

α-	anti-
Δ	Délétion
AcNVACV	Anticorps neutralisant anti-vaccin
AdHu5	Adénovirus humain de sérotype 5
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BEBOV	Virus Ebola espèce Bundibugyo
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degrés Celsius
CDC	Centers for disease control and prevention
CEV	Cell-associated enveloped virus
CIEBOV	Virus Ebola espèce Côte d'Ivoire (=Taï Forest)
CMF	Cytométrie en flux
CNR	Centre national de référence
CPXV	Cowpox virus
CTL	Lymphocyte cytotoxique
DC	Cellule dendritique
DICT	Dose infectieuse cytotoxique
EBOV	Virus Ebola
ECP	Effet cyto-pathogène
ELISA	Enzyme-Like ImmunoSorbent Assay
EEV	Extra-cellular enveloped virus
EGP	Glycoprotéine du virus Ebola
EGPB5	Ectodomaine d'EGP fusionné au domaine TM de B5
EMA	Agence européenne d'évaluation des médicaments
FDA	Food and Drug Administratio

g	Force gravitationnelle relative
GFP	Green fluorescence protein
GPT	Guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HPIV3	Virus parainfluenza humain de type 3
IEV	Intracellular enveloped virus
IgG	Immunoglobuline G
IMV	Intracellular mature virus
INF	Interferon
ITR	Inverted terminal repeats
IV	Immature virus
kDa	kilo Daltons
kpb	kilo paire de bases
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
M	Molaire
mAC	Anticorps monoclonal
maZEBOV	Mouse adapted ZEBOV
moi	Multiplicity of infection
MPXV	Monkeypox virus
MVA	Modified vaccinia Ankara
MVL	Modified vaccinia Lister
MVL-EGP	Modified vaccinia Lister exprimant le gène d'EGP
MVL-EGPB5	Modified vaccinia Lister exprimant le gène chimérique d'EGP
NP	Nucléoprotéine
NSB4	Niveau de sécurité biologique 4
NYCBH	New-York city board of health
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PFU	Plaque forming unit
PNH	Primate non humain

PRR	Pattern recognition receptor
RDC	République Démocratique du Congo
REBOV	Virus Ebola espèce Reston
SEBOV	Virus Ebola espèce Soudan
SVF	Sérum de veau foetal
TAFV	<i>Ebolavirus</i> espèce <i>Tai Forest ebolavirus</i> (= Côte d'Ivoire)
TNF	Tumor necrosis factor
UI	Unité internationale
VACV	Virus de la vaccine
VACV-COP	Virus de la vaccine souche <i>Copenhagen</i>
VACV-Lis	Virus de la vaccine souche <i>Lister</i>
VACV-Lis 107	Virus de la vaccine souche <i>Lister</i> clone 107
VACV-WR	Virus de la vaccine souche <i>Western-Reserve</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	Pseudo-particule virale
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
X	n fois concentré
ZEBOV	Virus Ebola espèce Zaïre

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	7
ABSTRACT	9
MOTS-CLES	11
KEYWORDS	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	19
INTRODUCTION GENERALE	33
LA VARIOLE, LES ORTHOPOXVIRUS ET LES VACCINS ANTIVARIOLIQUES	37
1. La variole et les orthopoxviroses	39
1.1. La variole.....	39
1.1.1. Historique.....	39
1.1.2. Clinique.....	41
1.1.3. Eradication de la variole	45
1.1.4. Réémergence potentielle de la variole.....	47
1.2. Infection par le virus du monkeypox	51
1.3. Infection par le virus du cowpox.....	53
1.4. Infection par le virus de la vaccine.....	55
2. Caractéristiques des orthopoxvirus	55
2.1. Structure des virions.....	57
2.2. Cycle de réplication.....	57
2.3. Transcription, réplication et morphogenèse des particules virales.....	59
3. Les réponses immunitaires induites par les orthopoxvirus	63
3.1. La réponse immunitaire humorale	63
3.2. La réponse immunitaire cellulaire	65
3.3. Les antigènes ciblés par les réponses immunitaires	65
4. Les vaccins antivarioliques	69
4.1. Les vaccins antivarioliques de 1 ^{ère} génération.....	69
4.1.1. Les différentes souches.....	69
4.1.2. Efficacité vaccinale.....	71
4.1.3. Les complications post-vaccinales :	73
4.2. Les vaccins antivarioliques de 2 ^{ème} génération :.....	77
4.2.1. Le vaccin monoclonal: « ACAM 2000»	77
4.2.2. Les vaccins polyclonaux :	79
4.3. Les vaccins antivarioliques de 3 ^{ème} génération	81

4.3.1. MVA : « IMVAMUNE»	81
4.3.2. MVA : « ACAM 3000 »	85
4.3.3. « LC16m8 »	87
LA FIEVRE HEMORRAGIQUE À VIRUS EBOLA ET LES CANDIDATS VACCINS	93
1. Historique et Epidémiologie	95
1.1. Historique	95
1.2. Epidémiologie.....	97
2. Caractéristiques des Filovirus.....	99
2.1. Classification.....	99
2.2. Structure des virus.....	101
2.3. Cycle de réplication.....	103
2.3.1. Récepteurs du virus Ebola.....	103
2.3.2. Réplication et transcription.....	105
2.3.3. Assemblage des virus et bourgeonnement	107
3. Infection par les filovirus.....	109
3.1. Transmission des filovirus.....	109
3.2. Clinique	111
3.3. Pathogenèse	113
4. Les réponses immunitaires contre le virus Ebola	113
4.1. La réponse immunitaire innée	113
4.1.1. La réponse interféron.....	115
4.1.2. La réponse cytokinique	115
4.2. La réponse immunitaire adaptative	117
4.2.1. La réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	117
4.2.2. La réponse immunitaire à médiation humorale	121
4.3. La glycoprotéine du virus Ebola, cible privilégiée du système immunitaire	123
5. Corrélats immuns de la protection contre l'infection par le virus Ebola	125
6. Les candidats vaccins contre le virus Ebola.....	127
6.1. Le vecteur virus de la stomatite vésiculeuse	129
6.2. Le vecteur adénovirus humain de sérotype 5	133
6.3. Le vecteur virus parainfluenza humain de type 3	137
6.4. Les pseudo-particules virales.....	139
PARTIE EXPERIMENTALE	149
Contexte des travaux de thèse.....	151
1. Développement et caractérisation d'un nouveau candidat vaccin antivariolique atténué.....	155
1.1. Introduction	155
1.2. Résultats expérimentaux.....	159

1.3. Discussion.....	171
2. Développement d'un vaccin bivalent antivariolique et anti-Ebola	177
2.1. Le vecteur virus de la vaccine contre les maladies émergentes et le cancer	177
2.2. Résultats expérimentaux.....	185
2.2.1. Construction des virus recombinants	185
2.2.2. Caractérisation des virus en culture cellulaire.....	189
2.2.2.1. Analyse par immunofluorescence	189
2.2.2.2. Analyse par immunohistochimie	191
2.2.2.3. Analyse par Western Blot	191
2.2.2.4. Analyse par microscopie électronique.....	193
2.2.3. Evaluation de l'innocuité des virus recombinants.....	193
2.2.4. Evaluation des réponses immunitaires humorales anti-vaccine et anti-glycoprotéine du virus Ebola.....	195
2.2.5. Evaluation des réponses immunitaires cellulaires anti-vaccine et anti-glycoprotéine du virus Ebola.....	197
2.2. Conclusion	199
2.3. Matériels et méthodes	203
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	215
ANNEXES	225
COMMUNICATIONS.....	243
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	248

INTRODUCTION GENERALE

Le travail de thèse concerne la caractérisation de nouveaux candidats vaccins antivarioliques construits à partir d'un virus de la vaccine, souche Lister, recombinant, atténué et répliatif et de deux candidats anti-Ebola construit à partir de l'un de ces vaccins antivarioliques.

La variole a été pendant des siècles, l'un des pires fléaux que l'humanité ait connu, jusqu'à son éradication en 1980. Une campagne mondiale de vaccination est à l'origine de l'éradication du virus. Les différentes souches connues ont alors été stockées dans les deux centres de référence : le « Centers for disease control and prevention » (CDC) à Atlanta (Etats-Unis) et le centre « Vector » à Koltsovo (Russie), par décision de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Le risque d'une réémergence de la variole, suite à la découverte d'un programme de militarisation de cet agent en ex-URSS et les attentats du 11 septembre 2001, font craindre l'utilisation de ce virus classé dans la catégorie A des pathogènes dangereux. En effet, suite à l'éradication de la maladie, la vaccination antivariolique fut arrêtée. Aujourd'hui seule une minorité de la population est encore immunisée contre ce virus. Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitements efficaces pour soigner cette maladie, seuls des vaccins occasionnant des complications post-vaccinales pourraient être utilisés. Le développement de nouveaux traitements prophylactiques et thérapeutiques devient donc nécessaire.

Une autre maladie peu connue mais tout aussi redoutable que la variole, est à craindre, la fièvre hémorragique à virus Ebola. Le virus Ebola sévit surtout en Afrique équatoriale, mais l'utilisation de cet agent comme arme biologique n'est pas à exclure. En effet, ce virus classé par le CDC comme un agent pathogène de classe A, pourrait potentiellement être utilisé à des fins terroristes. L'OMS a classé ce virus, à l'origine d'une fièvre hémorragique, dans le groupe 4 ce qui impose un laboratoire de niveau de sécurité biologique 4 (NSB4) pour le manipuler. La vitesse et la facilité avec lesquelles la maladie se transmet d'homme à homme, pourraient engendrer de terribles épidémies, avec un taux de mortalité assez élevé. L'absence totale de traitement et de vaccins efficaces, rend la recherche et le développement d'antiviraux et de vaccins indispensables et urgents.

La première partie de ce mémoire est une revue bibliographique divisée en deux chapitres.

Le premier résume les connaissances actuelles sur la famille des *Poxviridae* et plus particulièrement sur le virus de la variole, la maladie qu'il occasionne et les moyens de lutte. Ce chapitre traite des vaccins antivarioliques historiques ayant permis l'éradication de la maladie ainsi que des candidats vaccins de troisième génération développés pour remédier aux complications post-vaccinales.

Le deuxième chapitre, quant à lui, est consacré au virus Ebola de la famille des *Filoviridae*. Cet agent biologique est à l'origine d'une fièvre hémorragique à évolution rapide et mortelle jusque dans 90% des cas, qui sera décrite dans ce paragraphe. Une partie de ce chapitre aborde la biologie de ce virus, son cycle de réplication et sa structure particulière ainsi que les réponses immunitaires de l'hôte induites par l'infection. Enfin la dernière partie de ce chapitre est un rappel sur l'avancée de la recherche concernant les vaccins anti-Ebola.

Les résultats expérimentaux sont exposés dans la deuxième partie de cette thèse, sous la forme d'un article publié, et de résultats obtenus au cours de ces trois années.

La première partie correspond à l'article publié dans *Journal of Virology*, intitulé « Deletion of major nonessential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice ». L'article est reproduit dans sa forme publiée incluant ses propres références bibliographiques, accompagné d'une introduction et d'une conclusion pour mieux cerner le contexte entourant l'étude effectuée. La délétion de régions connues pour avoir été naturellement perdues par la souche virale MVA (vaccin de troisième génération fortement atténué) a permis de développer des formes atténuées de la souche vaccinale Lister, non pathogènes chez la souris Nude immunodéprimée et induisant des réponses immunitaires et une protection aussi efficaces que le vaccin de première génération chez la souris BALB/c.

Le développement et la caractérisation d'un candidat vaccin bivalent antivariolique et anti-Ebola sont décrits dans la deuxième partie.

Enfin, la conclusion, les perspectives de ce travail, les références bibliographiques et les présentations orales ou affichées en rapport avec le sujet de cette thèse, sont regroupées à la fin de ce manuscrit.

Chapitre I :

**LA VARIOLE, LES ORTHOPOXVIRUS ET LES
VACCINS ANTIVARIOLIQUES**

1. La variole et les orthopoxviroses

La variole est l'un des pires fléaux qu'ait connu l'humanité. Pendant plusieurs siècles, elle a été responsable de centaines de millions de morts dans le monde. La variole est causée par le virus de la variole, qui appartient au genre *Orthopoxvirus*. Il existe trois autres orthopoxvirus responsables de zoonoses plus ou moins sévères chez l'homme : le monkeypox virus (MPXV), le cowpox virus (CPXV) et le virus de la vaccine (VACV). Ces virus, contrairement au virus de la variole, ont des réservoirs animaux qui peuvent transmettre la maladie à l'homme.

1.1. La variole

La variole est à ce jour, la seule maladie infectieuse humaine qui a pu être éradiquée grâce à une campagne massive de vaccination menée par l'OMS sur tous les continents, entre 1959 et 1979. C'est lors de la 33^{ème} Assemblée Mondiale, le 8 mai 1980, que la variole fut déclarée officiellement éradiquée, une prédiction faite par Edward Jenner 200 ans plus tôt : « *the annihilation of smallpox, the most dreadful scourge of the human species, must be the final result of this practice (vaccination)* ».

1.1.1. Historique

La variole est une maladie ancienne qui remonte à l'antiquité. L'agent étiologique de la variole est le virus de la variole. Elle se transmet directement d'homme à homme par aérosol ou par l'intermédiaire d'objets contaminés et ne possède aucun réservoir animal, ce qui a permis son éradication.

L'origine de la variole est inconnue mais il s'agit d'une maladie ancienne, probablement due à un *Chordopoxvirinae* d'origine animale qui se serait adapté à l'homme. Il semblerait que le virus de la variole ait émergé avec les premières populations agricoles (Henderson & Moss, 1999). Les premières traces de variole ont été identifiées sur des momies Egyptiennes de la XVIII^{ème} dynastie (1850 à 1350 avant J.C.) et sur la momie du pharaon Ramses V (1157 avant J.C.). Des cas de variole ont ensuite été décrits en Inde (10^{ème} siècle avant JC) et en Chine (4^{ème} siècle avant J.C.).

A



B



Figure 1 : Schémas représentatifs de l'évolution de l'infection par le virus de la variole. A) Infection et réplication du virus dans différents organes chez le patient infecté. B) Evolution de l'infectiosité et de la mise en place de l'immunité antivariolique en fonction du nombre de jours post-infection. (Source : (Breman & Henderson, 2002))

Dès le XVI^{ème} siècle après J.C., la variole s'établit dans toute l'Europe, avec le déplacement et l'accroissement des populations, devenant une maladie endémique. A la fin du XVIII^{ème} siècle, on estimait la variole responsable de 400 000 morts chaque année en Europe. Avec la colonisation du nouveau monde par les Espagnols, les Français, les Anglais et les Portugais, la variole a aussi fait des ravages en Amérique, jusqu'à décimer des tribus amérindiennes et participer à l'effondrement de deux grandes civilisations : les Incas et les Aztèques (Henderson & Moss, 1999).

1.1.2. Clinique

Le virus de la variole infecte uniquement l'homme. Aucun cas de transmission naturelle chez le singe (ou autre animal) par l'homme n'a été répertorié (infection expérimentale uniquement). C'est cette particularité qui a permis de pouvoir éradiquer la maladie grâce à la vaccination.

Le mécanisme principal de transmission a lieu par voie aérienne : des gouttelettes de salive contaminées sont expectorées par le malade (figure 1A). La contamination peut également avoir lieu par contact direct avec des surfaces souillées (litterie, vêtements) ou par aérosolisation des virus présents sur ces objets. Le nombre de contaminations secondaires est estimé entre 5 et 10 pour chaque individu infecté. Ce chiffre pouvant varier en fonction des conditions socio-économiques, de la densité de population, de la nature du terrain ainsi que de la saison.

La période d'incubation dure entre 10 et 14 jours, délai pendant lequel la personne ne présente aucun signe clinique et n'est pas contagieuse (Figure 1B). Le virus se réplique activement dans les cellules de la muqueuse respiratoire et les organes hématopoïétiques (foie, rate, moelle osseuse et nœuds lymphatiques). Puis une seconde virémie est observée, le virus cible les nœuds lymphatiques avant d'atteindre les organes internes par le système endothélial. Elle est caractéristique de la phase d'invasion de l'hôte par le virus et dure 3 à 4 jours.

Une fois terminée, la période d'incubation laisse place à une phase pré-éruptive, période symptomatique et contagieuse. Elle se caractérise par une altération brutale de l'état général du patient. Les signes cliniques sont proches de ceux de la grippe : maux de tête, fièvre, nausées, diarrhées, malaises, prostration, douleurs musculaires et parfois des convulsions.



Figure 2 : Evolution de l'exanthème chez un enfant atteint de la variole. Jours 2 à 4, éruption maculaire ; Jour 5, vésicules ; Jours 7 à 9, pustules ; Jours 10 à 14, dessiccation et décrustation ; Jour 20, cicatrices. (Source: CDC)

Ces symptômes disparaissent après 2 à 4 jours, survient alors chez le patient, une éruption cutanée progressive évoluant de façon centrifuge (à partir de la face). Il s'agit de la phase éruptive : elle débute par un énanthème, au niveau des muqueuses buccale et oropharyngée, suivi d'un exanthème (visage et tronc). C'est à ce moment que les individus sont les plus contagieux. L'exanthème se développe ensuite de façon centrifuge sur les membres supérieurs et inférieurs. Toutes les lésions suivent la même évolution après leur apparition. Elles apparaissent telle une éruption maculaire qui se transforme au 2^{ème} jour en papules et évoluent en vésicules jusqu'au 4^{ème} jour. Celles-ci se remplissent alors d'un liquide trouble leur conférant un aspect ombiliqué du 5^{ème} au 7^{ème} jour et deviennent des pustules. Enfin à partir du 14^{ème} jour, ces pustules sèchent et la croûte restante demeure jusqu'au trentième jour, laissant sur la peau des cicatrices indélébiles (figure 2). La contagiosité du patient diminue avec l'apparition des croûtes. La sévérité des symptômes généraux et la contagiosité des patients sont directement liées à l'étendue de l'éruption.

Le taux de mortalité varie en fonction de la forme clinique de variole. L'OMS a catégorisé 8 types de variole, principalement en fonction des cas observés en Inde : la variole *sine eruptione*, modifiée, ordinaire discrète, ordinaire semi-confluente, ordinaire confluente, maligne, hémorragique précoce, hémorragique tardive.

La variole mineure (*variola minor*) causée par un virus atténué, entraîne une forme peu sévère de la maladie (1% de mortalité) contrairement à la variole majeure (*variola major*) qui possède quatre formes cliniques :

- la variole ordinaire : elle représente 90% des cas. Les symptômes sont essentiellement la fièvre suivie d'une phase éruptive. Le taux de mortalité pour cette forme est proportionnel à l'importance de l'éruption et varie entre 10% (forme discrète) et 50 à 75% (forme confluente).

- La variole modifiée (5% des cas) : similaire à la variole ordinaire mais avec des symptômes moins prononcés (peu de lésions cutanées) et une mortalité inférieure à 10%. Elle est essentiellement observée chez des sujets avec une immunité partielle (notamment chez des sujets déjà vaccinés)

- La variole plate ou maligne (environ 5% des cas) : les lésions se développent lentement mais l'issue de cette forme est quasiment toujours fatale.
- La variole hémorragique (moins de 1% des cas) : elle entraîne des saignements de la peau et des muqueuses. Elle est toujours fatale.

Le taux de mortalité pour la variole a été estimé à 30 % en moyenne. Cette mortalité est due à deux types de complications : le premier type est lié directement ou indirectement à la dissémination du virus dans l'organisme alors que le second est dû à une surinfection bactérienne. De nombreux organes sont touchés : la peau, les yeux, les articulations et les os, le système respiratoire, le système gastro-intestinal, ainsi que le système nerveux central. En l'absence de traitement antibiotique efficace, les lésions cutanées peuvent être le foyer d'infections bactériennes secondaires. Chez les patients qui n'ont pas succombé à la maladie, les séquelles consécutives à la variole sont, par ordre de fréquence décroissante : les cicatrices, la cécité et des déformations des membres (Fenner *et al.*, 1988).

1.1.3. Eradication de la variole

La lutte contre la variole remonte à 1000 ans avant J.C. Une méthode de protection contre l'infection naturelle de la variole était utilisée en Inde : il s'agissait d'inoculer délibérément le virus de la variole soit par insufflation nasale de croûtes, soit par injections sous-cutanée de fluides prélevés dans les lésions de patients. Ce processus d'immunisation appelé « variolisation » induisait une maladie moins sévère que lors d'une infection naturelle. Cette pratique s'est ensuite répandue en Asie puis en Europe dès le XVIII^{ème} siècle, mais elle était à l'origine d'un taux de mortalité pouvant atteindre 1 à 2%. La recherche de moyens de lutte contre la variole s'est intensifiée à la suite des travaux de Jenner (1796). Ce dernier a pu démontrer que des fermières étaient protégées de la variole après avoir contracté la « variole de la vache » ou cowpox (maladie des pis de l'animal). Cette zoonose est responsable d'une infection chez l'homme accompagnée de lésions très similaires à celles induites par la variole, principalement au niveau des mains. Jenner préleva du liquide dans les pustules de la main d'une trayeuse contaminée et l'inocula à un jeune garçon. Celui-ci a ensuite été inoculé avec de la matière infectée contenant de la variole. L'enfant ne tomba pas



Figure 3 : Représentation de la première vaccination d'Edward Jenner. Sur ce tableau Jenner vaccine pour la première fois, le jeune James Phipps contre la variole après avoir prélevé un échantillon contaminé des lésions pustuleuses d'une servante infectée par le virus du cowpox (Sarah Nelmes). Tableau peint par Gaston Mélingue (1840-1914)

malade. Jenner par cette expérience, a mis au point le principe de la vaccination (figure 3). Cette pratique sera progressivement répandue dans toute l'Europe et la vaccination antivariolique sera utilisée dans le monde entier dès le XIX^{ème} siècle. A partir de 1960, la variole ne touche plus que l'Afrique et l'Asie. Grâce à un effort mondial dirigé par l'OMS, une campagne de vaccination est menée sur tous les continents. Le dernier cas naturel de variole est recensé en 1977 en Somalie.

Le 8 mai 1980, la variole est officiellement déclarée éradiquée par l'OMS. (Fenner, 1980). La primo-vaccination antivariolique obligatoire est alors arrêtée en France dès 1979 et les rappels sont arrêtés en 1984, les effets secondaires dus à la vaccination étant non négligeables. Depuis, la manipulation du virus de la variole est strictement interdite et tous les stocks de virus référencés dans le monde, sont détenus dans deux centres collaborateurs de l'OMS : le « Centers for Disease Control and Prevention » (CDC) à Atlanta aux Etats-Unis et le centre « Vector » de Koltsovo dans la région de Novosibirsk en Russie. (Crance *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1999). Dans les autres laboratoires, des modèles prototypes, mimant une infection par le virus de la variole, ont été développés en utilisant principalement les trois autres orthopoxvirus pathogènes pour l'homme : le VACV, le CPXV et le MPXV.

1.1.4. Réémergence potentielle de la variole

La variole est classée agent biologique infectieux de catégorie A par le CDC. Son utilisation en tant qu'arme biologique représente un risque d'autant plus important qu'une grande proportion de la population n'est plus immunisée et que les stocks mondiaux de vaccins ne sont pas suffisants.

La variole fut déjà utilisée en tant qu'arme biologique au XVIII^{ème} siècle par Sir Jeffrey Amherst dans la guerre qui opposait les anglais aux indiens d'Amérique (1754-1767). Des couvertures contaminées avec le virus de la variole ont été distribuées aux tribus indiennes ennemies non immunisées, qui furent sévèrement affaiblies par l'épidémie.

Puis la découverte d'un programme soviétique secret de militarisation de la variole à la fin des années 90 (Alibek, 1999) a intensifié cette crainte de possible mise à disposition de la souche virulente *India* à des pays « potentiellement proliférants » ou à des groupes terroristes (Crance *et al.*, 2002). L'ex-Union Soviétique aurait produit et stocké plus de 20 tonnes de virus de la variole de 1973 à 1990. Enfin, les évènements

tragiques de 2001 aux Etats-Unis : les attentats terroristes du World Trade Center et les lettres contaminées par des spores de *Bacillus anthracis*, ont renforcé l'inquiétude de certaines autorités politiques occidentales quant à la possibilité d'un acte terroriste utilisant un agent infectieux.

En 2003, le Pr Didier Raoult expliquait dans un rapport que le coût de production pour l'élimination de la moitié des habitants d'un km², à l'aide d'une arme biologique était estimé à 1\$ (Raoult, 2003), ce qui est bien en dessous des coûts relatifs à une arme conventionnelle ou nucléaire. Dans le cas de la variole, la période d'incubation, la forte contagiosité et les moyens prophylactiques, thérapeutiques et diagnostiques encore limités dans les hôpitaux rendraient rapidement la situation difficilement contrôlable dans des pays non préparés, comme le sont la majorité des pays du monde.

Un plan variole a été mis en place en France en 2003 afin de dicter aux professionnels de la santé la conduite à tenir en cas de suspicion ou en cas de variole avérée : « **plan national de réponse à une menace variole** » (MSJS, 2003). Il est décrit dans des fiches, la stratégie de réponse graduée qui serait utilisée en cas de réémergence de la variole, la constitution d'une équipe nationale d'intervention contre la variole, les symptômes de la maladie, le vaccin mis à disposition des autorités sanitaires, les contre-indications à la vaccination antivariolique, la prise en charge des malades atteints ou susceptibles d'être atteints par la maladie, la prise en charge des sujets contacts (personnes exposées au virus) et enfin l'organisation de la vaccination progressive.

Un réseau « biotox-piratox » a été mis en place en France depuis 2003, dans le but de préparer au mieux les hôpitaux nationaux à la survenue d'un cas de variole. Il a été réalisé des exercices nationaux permettant d'évaluer l'efficacité des laboratoires d'analyses des établissements volontaires. Un centre national de référence (CNR) des orthopoxvirus vient d'être désigné (l'Unité de virologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées) par l'Institut National de Veille Sanitaire, pour si nécessaire, valider et confirmer l'identification du virus de la variole (ou d'un autre orthopoxvirus) qui pourrait se trouver dans un échantillon biologique.

En parallèle, un effort est fourni pour développer de nouveaux moyens de lutte et de protection efficaces contre cette menace potentielle, et notamment des vaccins et des antiviraux. Ces nouveaux vaccins pourraient permettre la vaccination de sujets présentant des contre-indications à la vaccination antivariolique traditionnelle : sujets

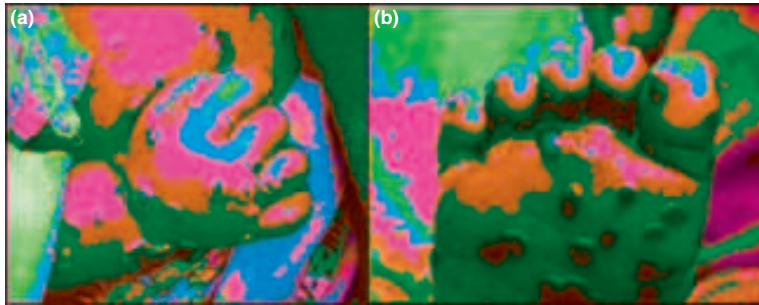


Figure 4 : Infection par le monkeypoxvirus. Photos de lésions sur la main (a) et le pied (b) de deux enfants infectés par le MPXV en République Démocratique du Congo (RDC). Crédit photo : S. R. Ibata, *International Conservation and Education Fund*

immunodéficients (VIH⁺, traitements immunosuppresseurs), sujets atteints de dermatite atopique, d'eczéma et sujets atteints d'une maladie infectieuse.

Ainsi la première maladie infectieuse complètement éradiquée grâce à la vaccination, est redevenue une menace potentielle pour l'humanité (Henderson *et al.*, 1999).

1.2. Infection par le virus du monkeypox

En 1958, deux épidémies, non fatales, d'une maladie qui ressemble à une infection à orthopoxvirus (lésions cutané-muqueuses caractéristiques), sont observées dans deux colonies de macaques à Copenhague. Les animaux ont développé des lésions cutanées une cinquantaine de jours après leur arrivée aux Pays-Bas et environ 25% des singes ont développé des signes cliniques d'infection (Von Magnus *et al.*, 1959). Le virus isolé était différent des autres orthopoxvirus connus et fut nommé monkeypox virus (MPXV). Dans les 10 ans qui suivirent cette découverte, neuf épidémies de monkeypox ont été observées dans des colonies de singes en captivité aux Etats-Unis, aux Pays-Bas et en France.

En 1970, des cas humains de monkeypox ont été observés en Afrique équatoriale, au Zaïre, actuellement République Démocratique du Congo (RDC) (Foster *et al.*, 1972). Depuis cette date, plus de 800 cas humains d'infection par le MPXV ont été déclarés, dont 47 aux Etats-Unis en 2003 et plus de 700 cas signalés en RDC durant ces 42 années (Reynolds & Damon, 2012; Smith, 2007).

Une étude sérologique a permis de mettre en évidence plusieurs espèces de petits rongeurs comme réservoirs naturels du virus en Afrique (écureuils du genre *Funisciurus* et *Heliosciurus*, rats géants du genre *Cricetomys*). Une infection par le MPXV se caractérise par des manifestations cliniques proches de celles de la variole. La période d'incubation dure 12 à 14 jours. Des symptômes pseudo-grippaux sont observés chez les patients 8 à 12 jours après l'exposition au virus (maux de tête, malaise, fièvre) suivi par l'apparition d'un exanthème. Les lésions, en 2 semaines, se développent de manière lente et synchrone, en papules qui se transforment en vésicules, puis en pustules et enfin en croûtes (Figure 4).

L'infection par le MPXV est considérée comme une zoonose émergente et l'importation d'espèces exotiques en provenance d'Afrique, pose un problème de santé publique. Heureusement, grâce à la protection croisée induite, observée lors de la vaccination antivariolique, contre les différents orthopoxviroses, les moyens



Figure 5 : Infection par le cowpoxvirus. Photos de lésions de patients infectés par le cowpoxvirus lors de l'épidémie de 2009, dans le nord de la France : patient 1 (A), patient 3 (B) et patient 4 (C, D). (Source : [\(Ninove et al., 2009\)](#))

prophylactiques (vaccins) connus pour la variole peuvent être administrés pour prévenir une infection par le MPXV.

1.3. Infection par le virus du cowpox

Le virus cowpox (CPXV) est responsable d'une maladie sporadique chez les bovidés. Les lésions ulcéreuses sur les pis de la vache peuvent être une source de transmission du virus de l'animal à l'homme. Au début des années 70, le CPXV est découvert chez d'autres animaux, domestiques et dans les zoos, infectés par les rongeurs péri-domestiques, réservoirs naturels du virus. Les infections par le CPXV chez l'homme sont souvent modérées et locales, vraisemblablement à la suite d'une griffure par un chat contaminé ou un rongeur domestique. Les lésions cutanées suivent la même évolution que les lésions vaccinales, mais sont en général plus étendues et plus profondes que celles observées avec le virus de la vaccine. Des adénopathies sont souvent observées et parfois des lésions secondaires peuvent apparaître. Des infections systémiques létales ont été décrites chez des sujets immunodéprimés, chez des patients atopiques (Smith, 2007) et récemment chez des sujets immunocompétents (Favier *et al.*, 2011; Glatz *et al.*, 2010; Hemmer *et al.*, 2010; Ninove *et al.*, 2009; Vogel *et al.*, 2011, 2012). Récemment, en France, une épidémie de cowpox a sévi dans le nord de la France. Des personnes possédant des rats de compagnie achetés en animalerie, ont été infectées par le CPXV. Les patients présentaient des ulcérations nécrosantes au niveau des mains et du cou (figure 5). Les animaux sont décédés quelques jours après l'achat (Ninove *et al.*, 2009). La dernière épidémie en date a sévi à Munich en Allemagne cette année (Vogel *et al.*, 2012), huit personnes ont été contaminées par leur rat de compagnie.

Les patients, dans la plupart des cas, sont soignés par simple antiseptie des plaies et protection des ulcérations par un pansement afin d'éviter les contaminations secondaires. Dans certains cas l'utilisation d'antiviraux (cidofovir, ST246) peut être prescrite (sujets immunodéprimés). La plupart des auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle le pourcentage croissant d'individus non vaccinés contre la variole dans la population, expliquerait l'augmentation du nombre de cas d'infection humaine par le CPXV. En effet les individus n'ayant pas été vaccinés contre la variole, ne bénéficient pas de la protection croisée qui devrait être induite par le vaccin antivariolique contre les différentes orthopoxviroses.

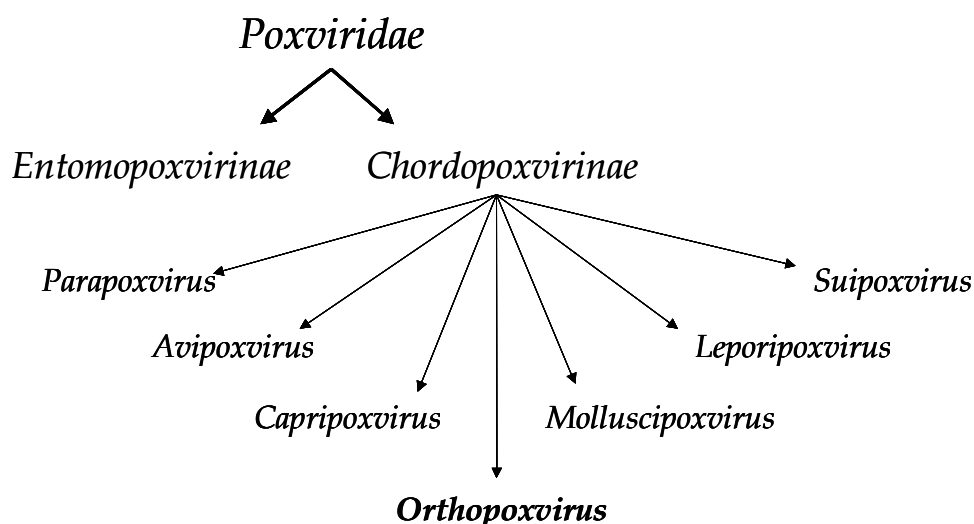


Figure 6 : Famille des *Poxviridae*

Espèce	Réservoir	Distribution géographique	Autres hôtes infectés
Virus de la variole (VARV)	Humains	Mondiale (éradiquée)	Aucun
Virus du monkeypox (MPXV)	Ecureuils	Afrique de l'ouest, Afrique centrale	Singes, humains
Virus du cowpox (CPXV)	Rongeurs	Europe, Asie	Chats, vaches, animaux de zoos, humains
Virus de la vaccine (VACV)	Inconnu	Mondiale	Humains, lapins, vaches, buffles
Virus du camelpox (CMLV)	Chameaux	Afrique, Asie	Aucun
Virus de l'ectromélie (ECTV)	Rongeurs	Europe	Aucun

Tableau 1: Liste des orthopoxvirus et caractéristiques épidémiologiques. Présentation des principaux orthopoxvirus utilisés dans les laboratoires experts avec leur réservoir, distribution et hôtes respectifs (Source : IRBA)

1.4. Infection par le virus de la vaccine

Le virus de la vaccine (VACV) a longtemps été confondu avec le virus du cowpox, mais il s'agit en réalité de deux espèces différentes. Cette confusion est due au fait que Jenner utilisait du virus prélevé sur la vache pour vacciner. Mais Downie, en 1939 (Downie, 1939), a démontré que le virus utilisé au XX^{ème} siècle pour la vaccination antivariolique n'était pas du CPXV mais un virus proche, le virus de la vaccine. Le virus de la variole, le virus de la vaccine et le virus du cowpox sont très proches immunologiquement, ce qui explique que la vaccination avec le VACV ou le CPXV soit efficace contre la variole.

Le virus de la vaccine a été utilisé pendant près de 200 ans comme vaccin antivariolique. Il n'induit en général qu'une éruption locale bénigne au site de la scarification. Ce virus a été utilisé lors de la campagne d'éradication mais il est cependant responsable de quelques rares complications post-vaccinales (voir chapitre 4.1.3. « Les complications post-vaccinales »).

Ce virus est utilisé comme modèle du virus de la variole pour comprendre le mécanisme d'infection et pour la recherche de contre-mesures médicales dans la plupart des laboratoires experts du monde. Il est aussi utilisé comme vecteur viral dans le domaine de la vaccinologie.

2. Caractéristiques des orthopoxvirus

L'agent étiologique de la variole est le virus de la variole. Il appartient à la famille des *Poxviridae* (figure 6). Le terme Pox vient de l'anglais « pocks » qui signifie pustules. La famille tient son nom des lésions pustuleuses caractéristiques de l'infection par le virus de la variole.

Les *Poxviridae* sont divisés en deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae* infectant l'homme et les animaux vertébrés (sauvages et domestiques) et les *Entomopoxvirinae* infectant différents insectes.

Les *Chordopoxvirinae* comprennent environ onze genres viraux différents : *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Cervidpox*, *Squirrelpox*, *Crocodilepox* et *Orthopoxvirus*.



Figure 7: Photo d'un orthopoxvirus en microscopie électronique.
(Source : CDC)

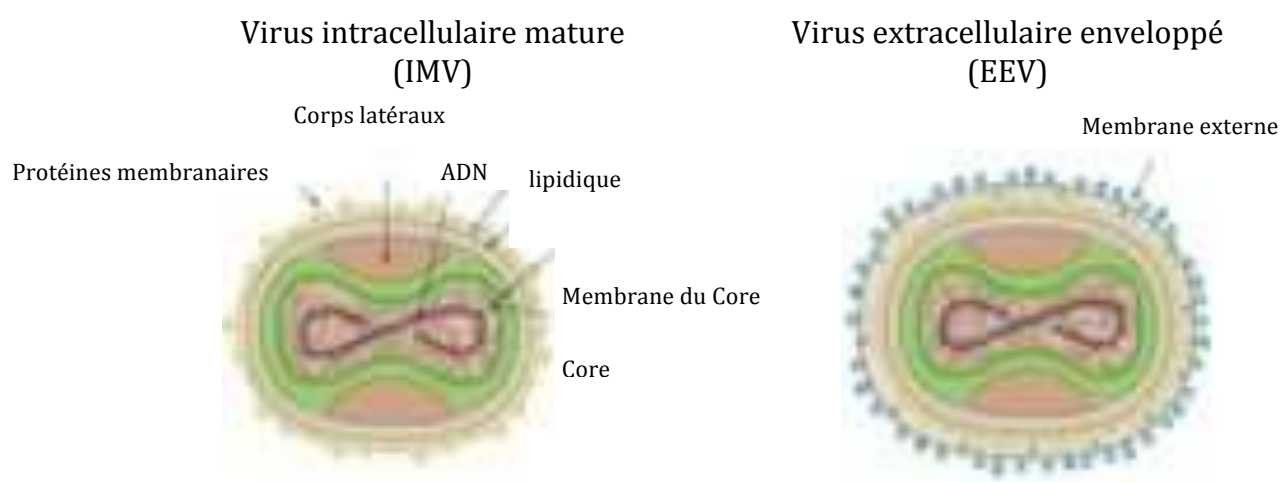


Figure 8 : Représentation schématique des deux formes infectieuses virales : IMV et EEV. Panneau de gauche, virus intracellulaire mature (IMV) ; Panneau de droite, virus extracellulaire enveloppé (EEV) (Source : www.poxvirus.org)

Le genre *Orthopoxvirus* est le plus important en virologie médicale car certains orthopoxvirus sont pathogènes chez l'homme (tableau 1) : le virus de la variole, le virus du monkeypox, le virus du cowpox, le virus de la vaccine. Le genre *Orthopoxvirus* comprend aussi le virus du camelpox, le virus du rabbitpox, le virus du horsepox et le virus de l'ectromélie.

2.1. Structure des virions

Le virus de la variole est un gros virus ayant une forme de brique d'environ 200 à 250 nm de large sur 250 à 350 nm de long (figure 7). La particule virale renferme un nucléoïde ou core, en forme d'haltère qui contient l'ADN viral et les nucléoprotéines. Le core est délimité par une membrane épaisse et entouré de deux corps latéraux. Le virion est enfermé dans une membrane externe lipoprotéique d'aspect discontinu, lui conférant une structure antigénique complexe. Selon la morphogenèse de la particule virale, elle peut être enveloppée par une seconde membrane externe d'origine cellulaire. Le génome de la variole est un long brin d'ADN bicaténaire, d'environ 200 kpb codant près de 200 protéines dont celles nécessaires à sa réplication. Le cycle de réplication des orthopoxvirus est entièrement cytoplasmique et requiert peu de fonctions cellulaires à part celles impliquées dans la synthèse protéique. Comme pour la plupart des virus à ADN, le génome des poxvirus présente à ses extrémités des séquences répétées (ITR) qui codent principalement pour des gènes de virulence variables, suivies d'une boucle terminale. La région centrale en revanche, est très conservée et code pour des gènes essentiels à la réplication et pour des gènes de structure.

2.2. Cycle de réplication

Le cycle de réplication a été intensivement étudié pour le virus de la vaccine, mais ces données peuvent être extrapolées aux autres orthopoxvirus.

Lors du cycle d'infection cellulaire quatre types différents de virus sont formés : virus mature intracellulaire (IMV), virus intracellulaire enveloppé (IEV), virus enveloppé associé à la cellule (CEV) et virus enveloppé extracellulaire (EEV ou EV). Ils se distinguent uniquement par le nombre de membranes qu'ils possèdent à leur surface (figure 8).

La première étape du cycle viral (Figure 9) correspond à l'attachement puis à l'entrée du virus dans la cellule. Au moins deux mécanismes distincts sont mis en œuvre

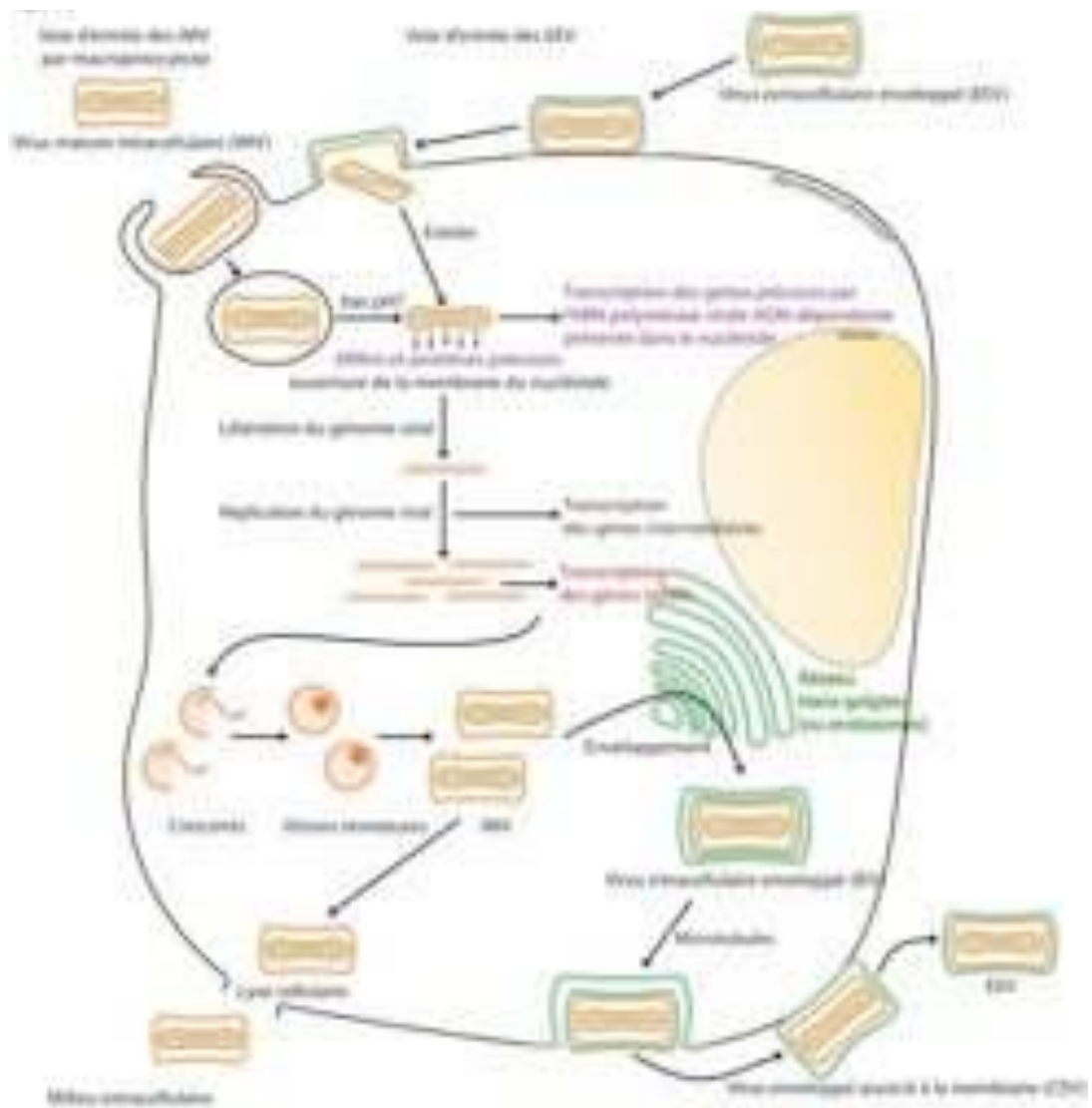


Figure 9 : Cycle de réplication des orthopoxvirus dans la cellule hôte.

(Source : (Duraffour *et al.*, 2008))

pour permettre au virus d'entrer dans la cellule, selon qu'il s'agisse d'un EEV ou d'un IMV. L'IMV infecte la cellule par un mécanisme de fusion avec la membrane cellulaire après qu'un complexe de 8 protéines virales (A28, A21, L5, A16, H2, G3, G5 et A5) se soit fixé sur un récepteur encore inconnu, situé à la surface de la cellule (Smith, 2007). Récemment il a été décrit un nouveau mécanisme pour l'entrée des IMV dans le cytosol : le mécanisme de macropinocytose. Les IMV induisent la désorganisation de la membrane plasmique, qui va former des pseudopodes en internalisant les IMV dans la cellule (Mercer & Helenius, 2008). L'EEV, quant à lui, va s'attacher à la surface de la cellule et par l'action de glycosaminoglycane présent à la surface de la cellule, son enveloppe externe va se rompre au niveau du point d'ancrage, puis libérer l'IMV. L'enveloppe externe va rester autour de la particule virale qui sera ainsi protégée des anticorps. Des études génétiques ont montré que les protéines virales A34 et B5 (protéines glycosylées) sont nécessaires pour le mécanisme de rupture de la membrane externe de l'EEV. Enfin l'IMV libre va fusionner avec la membrane cellulaire (figure 10). Dans les deux cas, le « core » est relargué dans le cytosol de la cellule hôte (Carter *et al.*, 2003; Moss, 2006; Senkevich *et al.*, 2004; Senkevich *et al.*, 2005).

2.3. Transcription, réplication et morphogenèse des particules virales

Une fois dans le cytoplasme, le nucléoïde et les protéines qui lui sont associées, comme le complexe de transcription, sont transportés, via un réseau de microtubules, proche du noyau. Là, commence la deuxième étape du cycle (figure 9), la transcription. L'expression des gènes viraux suit une cascade temporelle. Les gènes codant pour les protéines précoces sont transcrits par l'ARN polymérase virale en premier. Ils codent pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral et pour des immunomodulateurs. Dès que les protéines précoces sont synthétisées, la membrane du nucléoïde s'ouvre et libère l'ADN viral. Lorsque la réplication commence, ce sont les gènes intermédiaires qui sont alors transcrits. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription tardifs et sont moins nombreux que les gènes précoces. Enfin, la transcription des gènes tardifs nécessite des protéines précoces et intermédiaires ainsi que la réplication du génome du virus. Ces gènes codent en général pour des protéines de structure qui vont permettre la formation de nouvelles particules virales, pour des facteurs de virulence qui vont aider le virus à échapper au système immunitaire et pour

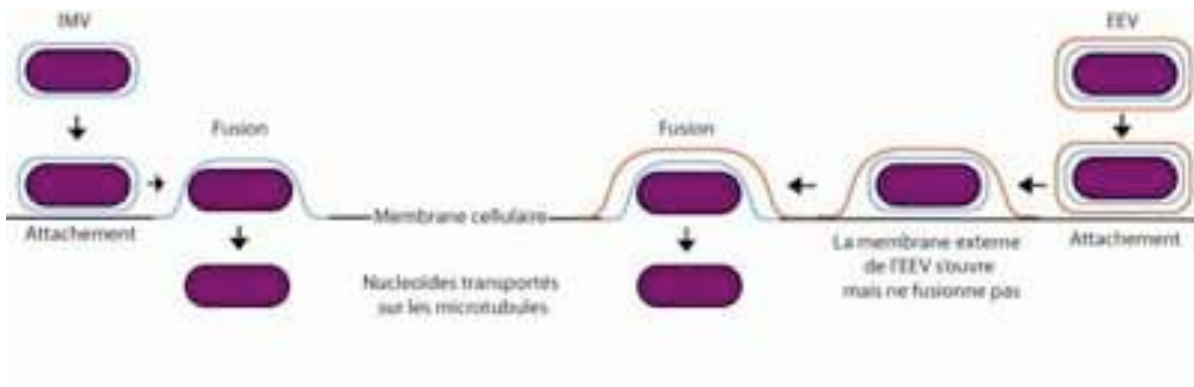


Figure 10 : Mécanismes d'entrée dans la cellule des formes EEV et IMV. L'IMV se lie à un/des récepteur(s) non identifié(s) de la surface de la cellule et fusionne avec la membrane plasmique pour permettre la libération du nucléoïde dans le cytoplasme. L'EEV se lie à la surface de la cellule et les glycosaminoglycanes permettent l'ouverture de la membrane externe de l'EEV par un processus non fusionnel. La particule IMV qui était à l'intérieur se lie à la surface de la cellule et entre dans la cellule comme les IMV. (Source : (Smith *et al.*, 2002)).

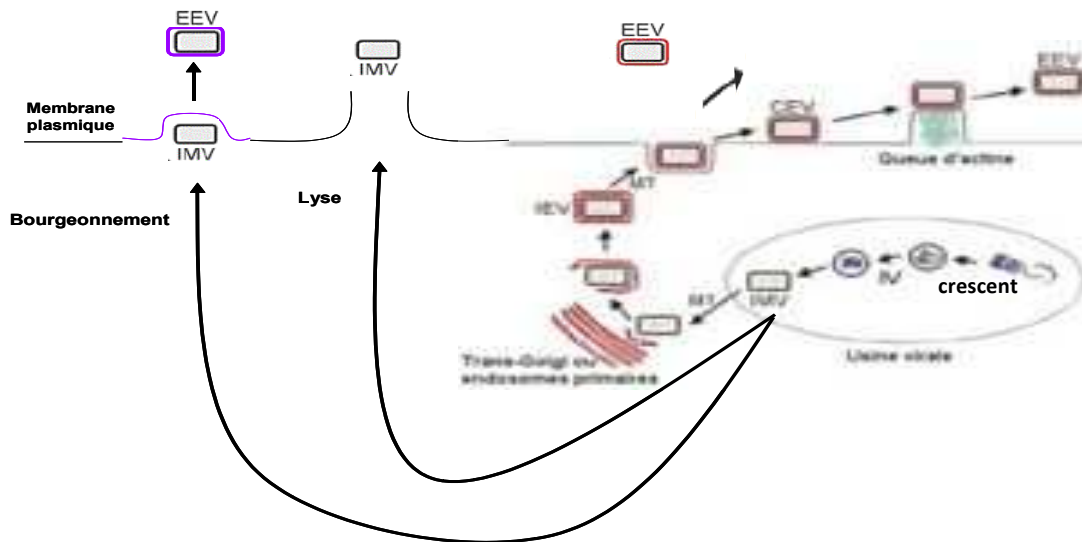


Figure 11 : Mécanismes de maturation et de sortie de la cellule des particules virales. IV, virus immature ; IMV, virus mature intracellulaire ; MT, microtubules ; IEV, virus enveloppé intracellulaire ; CEV, virus enveloppé associé à la cellule ; EEV, virus enveloppé extracellulaire. (Source : (Smith & Law, 2004))

des enzymes virales qui seront nécessaires à l'initiation de la transcription après infection d'une nouvelle cellule.

La réplication des virus a lieu dans des régions intracellulaires appelées « usines virales » situées dans le cytoplasme de la cellule infectée. Les premières structures virales sont appelées « crescents » (croissants en français). Elles s'associent à des protéines virales pour devenir des virus immatures (IV). La transformation des IV en IMV aura lieu après une étape de condensation du nucléoïde viral et de clivages protéolytiques de plusieurs protéines de la capsid (Moss *et al.*, 1973). Les IMV sont alors libérés de ces usines virales et sont transportés jusqu'à l'appareil de Golgi par les microtubules. La majorité des IMV est relâché par la cellule infectée seulement tardivement après lyse cellulaire tandis qu'une petite fraction des IMV pourrait rejoindre la membrane plasmique et sortir de la cellule encore intacte par bourgeonnement tout s'enveloppant de la membrane cellulaire. Ce phénomène de bourgeonnement à la membrane plasmique a cependant été assez rarement observé et seulement dans un nombre limité de types cellulaires. Le principal mode de sortie précoce du virus de la cellule est par le biais du virus enveloppé intracellulaire. En effet, une partie des IMV poursuit sa maturation intracellulaire de façon à être enroulée dans une membrane externe ou enveloppe dérivée du réseau *trans*-Golgi ou des endosomes (Smith *et al.*, 2002). Ces virions deviennent alors des IEV. Ces derniers vont migrer jusqu'à la membrane cellulaire et fusionner avec celle-ci. Le virion enveloppé se retrouve alors à la surface de la cellule. Si ce virion reste associé à la membrane cellulaire, il deviendra un CEV, en revanche, s'il se détache de la surface, il deviendra une forme EEV infectieuse (figure 11).

L'enveloppe de ces EEV contient différentes protéines glycosylées, absentes sur la membrane des IMV, telles que B5, A33, A34, A56, F13 et K2, qui pour la plupart sont importantes dans la formation ou la libération de l'EEV (Smith, 2007) ainsi que pour l'infection d'une nouvelle cellule (Smith *et al.*, 2002).

Chacune des formes virales infectieuses produites au cours du cycle viral joue un rôle particulier dans la dissémination du virus: les IMV, très résistants dans l'environnement, permettent la dissémination du virus d'hôte à hôte. Les CEV sont essentiellement impliqués dans la transmission de cellule à cellule. Enfin les EEV sont responsables de la dissémination du virus chez l'hôte, à distance du site d'infection (Smith *et al.*, 2002).

3. Les réponses immunitaires induites par les orthopoxvirus

L'évaluation des composantes de l'immunité impliquées dans la protection contre les orthopoxvirus a été réalisée chez différents modèles animaux immunocompétents et immunodéprimés (primates non humains, souris) lors d'infections expérimentales. L'utilisation de modèles animaux immunodéprimés pour l'étude de chaque composante du système immunitaire a permis de mettre en évidence le caractère important de chacune d'entre elles.

Chez l'homme, la connaissance des corrélats immuns de la protection vaccinale antivariolique est très limitée mais le rôle crucial de l'immunité humorale et cellulaire a été mis en évidence dans le cas de complications post-vaccinales mortelles chez des sujets immunodéficients (Lane, 1969).

3.1. La réponse immunitaire humorale

L'étude prospective de Mack (Mack *et al.*, 1972) a montré que le titre en anticorps neutralisants est important pour la survie et que les individus présentant un titre supérieur à 32 (*réci-proque de la dilution*) étaient protégés contre la variole.

Les souris déficientes en cellules B présentent une incapacité de clairance du virus lorsqu'elles sont infectées par le virus de l'ectromélie (virus létal pour la souris) malgré une activité de cellules T CD8⁺ détectable (Chaudhri *et al.*, 2006). De plus, Edghill-Smith a montré que, chez le macaque rhésus, la réponse humorale est essentielle pour la protection vaccinale (Edghill-Smith *et al.*, 2005). En effet, des singes déplétés en cellules B présentent une réponse humorale anti-vaccine plus faible après une infection létale avec du MPXV, ne permettant pas la clairance du virus et entraînant des lésions cutanées sévères jusqu'à la mort de certains animaux (Edghill-Smith *et al.*, 2005). En revanche, une injection d'anticorps spécifiques à ces animaux, avant une infection létale avec du MPXV, permet de réduire les symptômes de la maladie et induit une réponse protectrice chez tous les animaux, suggérant ainsi que la réponse humorale spécifique est donc suffisante pour la protection vaccinale chez le singe.

Enfin, une étude de Crotty a montré que le taux d'anticorps spécifiques du virus de la vaccine (immunoglobulines G et anticorps neutralisants) persistait des décennies chez l'homme, que les cellules B mémoires spécifiques de la vaccine étaient conservées et fonctionnelles plus de 50 ans et qu'elles étaient capables d'induire une réponse anticorps forte après une revaccination avec le vaccin Dryvax (Crotty *et al.*, 2003).

3.2. La réponse immunitaire cellulaire

Belyakov a montré que les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ peuvent prévenir la mortalité chez des animaux déplétés en cellules B et infectés avec le virus de la vaccine (Belyakov *et al.*, 2003). D'autre part, il a montré que la déplétion en cellules T CD8⁺ chez la souris ne résulte pas en une augmentation de la virémie et une altération de la protection, ce qui indique que les cellules TCD8⁺ ne sont pas essentielles dans la protection et la clairance du virus, alors qu'une double déplétion des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ entraîne une forte morbidité et une augmentation de la mortalité des animaux (Wyatt *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Dans le cas d'une infection par le virus de l'ectromélie, toutes les composantes de l'immunité sont nécessaires. En effet, une mortalité de 100% est observée chez les animaux déplétés en lymphocytes T CD8⁺ (Chaudhri *et al.*, 2006; Fang & Sigal, 2005; Karupiah *et al.*, 1996). Les souris déplétées en cellules T CD4⁺ survivent à l'infection mais présentent une clairance virale partielle (persistance du virus dans les organes) (Karupiah *et al.*, 1996). Chez le primate non humain la déplétion en cellules T ne semble pas avoir d'impact sur la clairance du virus et la protection (Edghill-Smith *et al.*, 2005), suggérant que seule la réponse humorale est indispensable et suffisante pour la protection vaccinale contre le monkeypoxvirus.

3.3. Les antigènes ciblés par les réponses immunitaires

Des études de protéomique ont permis de mettre en évidence le profil de la réponse immunitaire humorale en montrant qu'elle était dirigée contre des protéines spécifiques des orthopoxvirus, essentiellement des protéines de structure localisées à la surface du virus (Kennedy *et al.*, 2009).

L'utilisation simultanée de quatre protéines d'enveloppe du virus de la vaccine : **A27**, **L1** localisées sur la membrane des IMV et **B5**, **A33** localisées sur l'enveloppe des EEV pour la vaccination de modèles souris et primates non humains contre une infection létale avec, respectivement, le virus de la vaccine et le monkeypoxvirus, a induit la

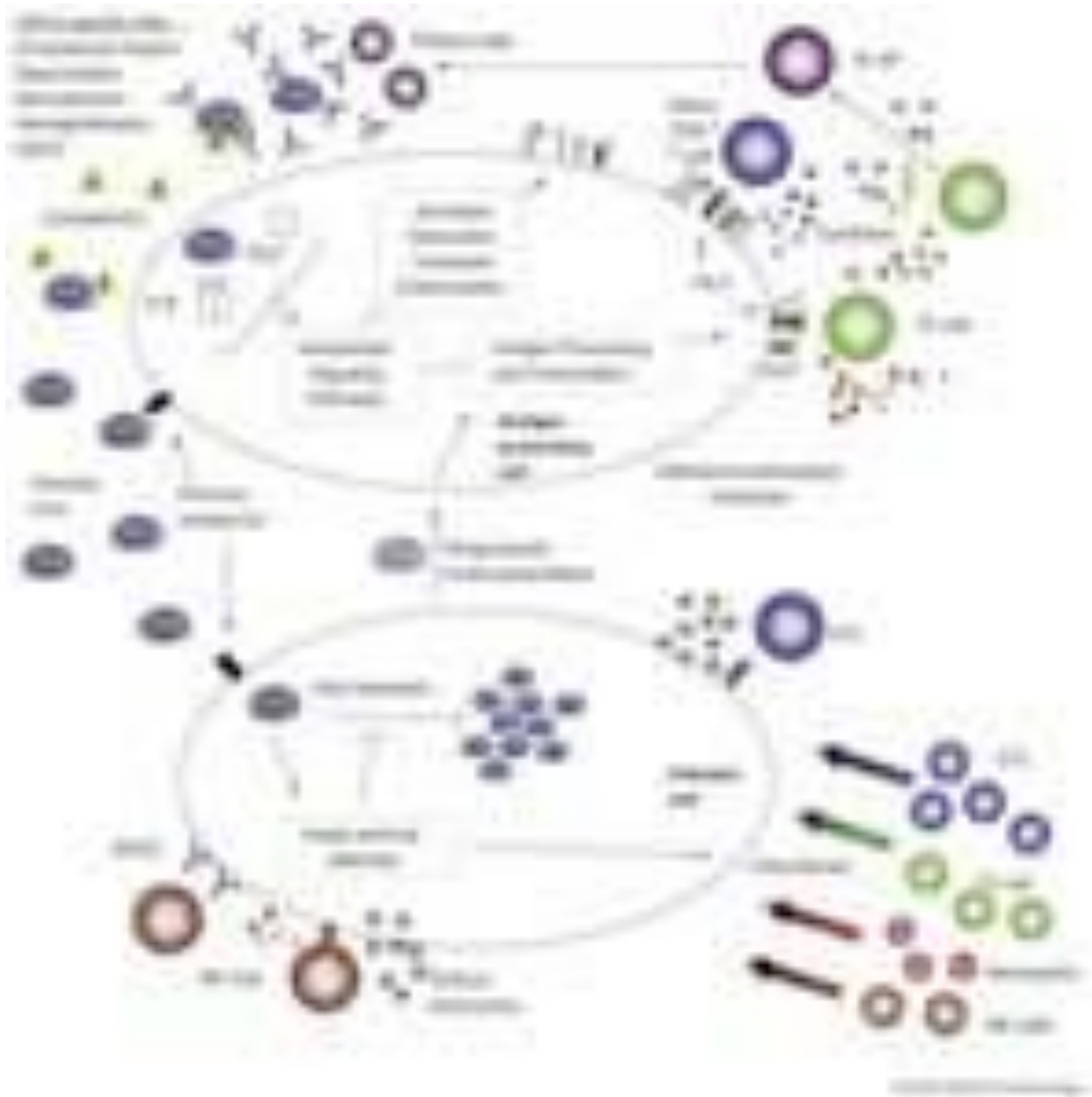


Figure 12 : Composantes des réponses immunitaires impliquées dans la protection contre les orthopoxvirus. La vaccination antivariolique active une cascade de voies immunitaires. Les réponses non spécifiques innées activées par des PRR servent à inhiber la réplication virale initiale et à activer les cellules présentatrices de l'antigène. Les cytokines inflammatoires et des chimiokines vont alors attirer les lymphocytes effecteurs dans les tissus infectés. Les LT helper vont sécréter des cytokines (IL-4, IL-5) et des signaux de co-stimulation (CD40L) nécessaires pour la maturation, la réplication et l'amplification clonale des cellules B, pour l'activation des CTL et l'expansion clonale. Les cellules B produisent des anticorps qui vont s'agglutiner, opsoniser et neutraliser les particules virales. Les cellules T CD8 activées vont lyser les cellules infectées. La sécrétion de cytokines (IFN γ , TNF α) par les lymphocytes T peut également avoir une activité antivirale directe. Quelques lymphocytes spécifiques du virus vont former une petite population de LT mémoires, à long terme, capable de répondre rapidement à une infection ultérieure avec un orthopoxvirus. (Source : [Kennedy et al., 2009](#))

synthèse d'anticorps protecteurs (Hooper *et al.*, 2003; Hooper *et al.*, 2004). Les travaux de Tang ont montré que ces protéines sont aussi des cibles de l'immunité cellulaire, en évaluant les réponses CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques contre chacune de ces protéines, chez des sujets humains vaccinés contre la variole depuis plus d'un mois (et jusqu'à plus de 20 ans) (Tang *et al.*, 2006). De plus, des épitopes spécifiques des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ont pu être mis en évidence sur la glycoprotéine B5 et la protéine A27 (Tang *et al.*, 2006) ainsi qu'une réponse cytotoxique spécifique de la vaccine, dirigée contre chacune des quatre protéines citées ci-dessus, chez 100% des donneurs.

D'autres protéines ont été étudiées pour leur capacité à induire une réponse immunitaire protectrice (H3, B8) mais l'utilisation de ces protéines n'a induit qu'une protection partielle chez la souris contre une infection létale avec le virus de l'ectromélie (Davies *et al.*, 2005a; Davies *et al.*, 2005b; Tschärke *et al.*, 2005).

En conclusion ces études ont montré que les réponses immunitaires spécifiques impliquées dans la protection contre une infection létale peuvent diverger selon le modèle animal. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences : la nature de la souche virale utilisée, la voie d'inoculation, le protocole expérimental d'infection.

Il semble que tous les acteurs de l'immunité soient impliqués pour assurer une protection complète contre les infections à orthopoxvirus : la réponse humorale spécifique et les réponses cellulaires CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques (figure 12).

Pour développer de nouveaux vaccins contre les orthopoxviroses, il est donc nécessaire de prendre en compte toutes les composantes de la réponse immunitaire. L'Agence Européenne d'Évaluation des Médicaments (EMA) a d'ailleurs publié en 2002 des recommandations pour le développement de nouveaux vaccins antivarioliques : étude de toxicité et de virulence, évaluation des réponses immunitaires, modèles animaux à utiliser, études précliniques et cliniques à réaliser (EMA, 2002). Les candidats vaccins antivarioliques en cours de développement doivent donc faire la preuve de leur capacité à induire les différentes réponses immunitaires spécifiques impliquées dans la protection : la réponse humorale (IgG ELISA et anticorps neutralisants) et les réponses cellulaires spécifiques CD4⁺ et CD8⁺ ; avec des taux au moins égaux à ceux mesurés avec le vaccin traditionnel de première génération.

Vaccin	Souche parentale	Produit sur	capacité à se répliquer	Avantages	Inconvénients	pays
EM63	NYCBH (New York City Board of Health)					URSS, Inde
Dryvax (Wyeth), Sanofi Pasteur (SPSV)	NYCBH (New York City Board of Health)	Lymphes de veau, lésions cutanées sur génisse ou mouton	OUI	A l'origine de l'éradication de la Variole	Ne respectent pas les bonnes pratiques de laboratoire = contamination de bactéries ou autres agents infectieux - Responsables de complications post-vaccinales	Amérique et Afrique de l'Ouest
Lister Elstree / RIVM	Lister Elstree	membrane chorioalantoïque d'œufs				23 pays dont la France
Temple of Heaven (Tian Tan)		-				Chine
Ikeda	Ikeda strain				trop pathogène (20 encéphalites /10 ⁶ primo-vaccinés/an)	Japon

Tableau 2 : Liste et caractéristiques des vaccins antivarioliques. Caractéristiques des vaccins antivarioliques de 1^{ère} génération utilisés pour l'éradication de la variole.

4. Les vaccins antivarioliques

4.1. Les vaccins antivarioliques de 1^{ère} génération

4.1.1. Les différentes souches

Ces vaccins sont dits traditionnels ou historiques. Ce sont des virus vivants et répliquatifs. La fabrication de ces vaccins reprend le principe de Jenner. Ils ont été entretenus et multipliés dans des conditions très diverses selon chaque pays. Pour des raisons historiques, ces vaccins étaient produits sur animaux jusqu'en 1980, par inoculation directe de souches vaccinales par scarification en larges bandes sur les flancs de veaux ou de génisses (figure 13) dans un premier temps, puis sur des chèvres, moutons, lapins... ce qui a conduit à une grande diversité de souches entraînant une virulence variable (Fenner *et al.*, 1988).

Le virus vaccinal était récupéré par grattage à la cuillère (figure 13). Le produit final était conservé sous forme liquide ou cryodesséché, pour plus de stabilité, à un titre de 10^8 pfu/ml (plaque forming unit ; en français : unité formant plages).

Une revue faite en 1968 par l'OMS illustre la diversité des souches employées pour la vaccination: 71 laboratoires de 49 pays utilisaient au moins 19 souches différentes dont 4 principales (Fenner *et al.*, 1988) :

- la souche *Lister* (VACV-Lis), isolée au Vaccine Institut de Cologne en 1870 chez un soldat prussien. Elle a été utilisée au Royaume-Uni dès 1892 puis développée à l'institut Lister en 1916. Cette souche est aussi appelée Elstree, du nom de la ville où se trouvait l'Institut. Elle a été utilisée par 23 pays dont la France
- la souche *New York City Board of Health* (NYCBH) a été utilisée en Amérique et en Afrique de l'Ouest
- la souche *Temple of Heaven* (Tian tan) a été utilisée en Chine
- la souche EM-63, dérivé de la souche NYCBH, a été largement utilisée en ex-URSS et en Inde.

D'autres souches telles que Copenhague (VACV-COP), Western Reserve (VACV-WR), Paris et Bern étaient plus rarement utilisées (tableau 2).



Figure 13 : Production et récupération du virus vaccinal.

Curetage sur le dos de génisse afin de récupérer la pulpe vaccinale (image de gauche) ; le virus vaccinal était récupéré par grattage des pustules à la cuillère (image de droite) (<http://membres.multimania.fr/microbio/virologie/monographies/Variole/vaRIOLE.HTML>)

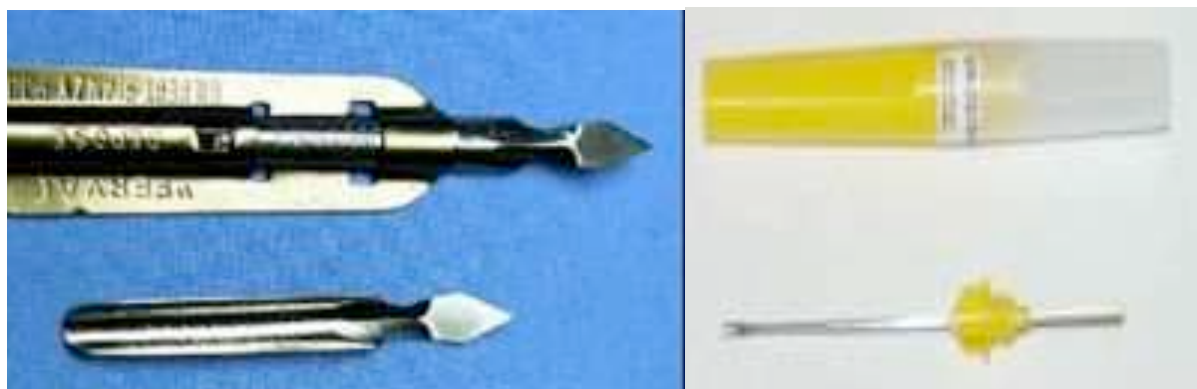


Figure 14 : Vaccinostyle et aiguille bifurquée. Photo d'un vaccinostyle, anciennement utilisé pour la vaccination à l'aide de 10 μ L de vaccin (image de gauche) et photo d'une aiguille bifurquée (image de droite) utilisée aujourd'hui pour la vaccination antivariolique : 1 μ L de vaccin suffit et plusieurs punctures sont réalisées sur la peau du sujet sur le haut du bras. (Source, IRBA)

En France, deux types de vaccins étaient fabriqués dans les années 1970, à partir de la récupération de pulpe vaccinale d'une culture de virus ou de lymphes d'animaux infectés: le vaccin **lyophilisé de l'Institut Pourquier** et le vaccin **liquide de Sanofi-Pasteur**. Actuellement, en France, il n'y a plus d'AMM pour ces vaccins antivarioliques mais une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) de cohorte peut être appliquée par décret ministériel autorisant l'utilisation du vaccin dans des conditions précises concernant le vaccinateur, le lieu et la date de vaccination, ainsi que le nom des personnes vaccinées. La France possédait en 2001 un stock de 5,5 millions de doses de vaccins Pourquier et 1,7 millions de doses du vaccin Sanofi-Pasteur (Garin *et al.*, 2004) administrables par vaccinostyle (figure 14). Une étude menée sur le primate non-humain (PNH) à l'IRBA, a montré qu'une inoculation intradermique par aiguille bifurquée (largement utilisée aux Etats-Unis pendant l'éradication) utilisant 10 fois moins de virus (1µl au lieu de 10µl) était aussi efficace que l'administration par vaccinostyle (Figure 14). Cette étude a permis de montrer que le nombre de doses de vaccins en stock était 10 fois plus élevé : soit 55 millions de doses du vaccin Pourquier et 17 millions de doses du vaccin Sanofi-Pasteur (stock suffisant pour vacciner l'ensemble de la population française) (MSJS, 2003).

Le coût de fabrication de ces vaccins était faible (environ 0,30 € la dose) mais ils ne sont pas stériles et la quantité de bactéries acceptée à l'époque (< 500 bactéries/ml) ne respecte plus les bonnes pratiques de fabrication (BPF) actuelles. Ces vaccins de 1^{ère} génération étaient responsables de complications post-vaccinales (1 cas sur 10 000) parfois mortelles (MSJS, 2003) mais ils restent encore actuellement les seuls vaccins à avoir montré leur efficacité contre la variole.

4.1.2. Efficacité vaccinale

La prise du vaccin antivariolique se caractérise par l'apparition d'une pustule « Jennerienne » typique au site d'inoculation environ une semaine après vaccination. La lésion ressemble très fortement à celle de la variole et évolue de manière similaire (figure 15). Souvent, elle peut être accompagnée d'une légère adénopathie associée à de la fatigue et de la fièvre. Douze à vingt jours après l'inoculation, une croûte brunâtre apparaît qui laisse place à une cicatrice blanche, déprimée et indélébile. L'absence d'apparition de cette réaction caractéristique peut indiquer : soit une immunité acquise,

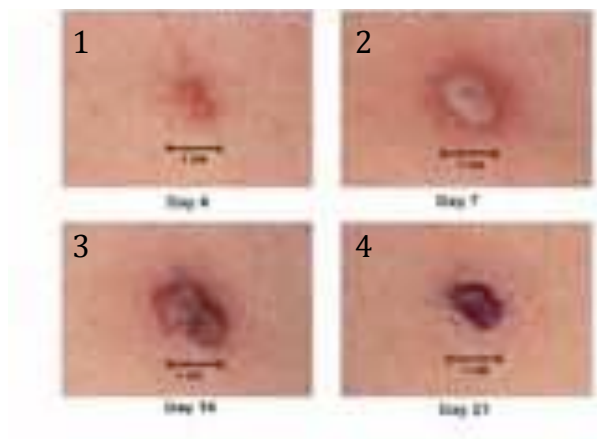


Figure 15 : Evolution de la prise vaccinale. Photos représentant l'évolution de la vésicule à la croûte, lors de la prise du vaccin antivariolique. 1) vésicule, 2) pustule, 3) pustule desséchée, 4) croûte (Source : CDC)

le plus souvent par vaccination, qui permet une inhibition de la réplication virale locale, soit un échec de la vaccination.

L'immunité est acquise 12 à 14 jours après la vaccination. Les anticorps neutralisants anti-vaccine (AcNVACV) induits par la vaccination antivariolique sont spécifiques du genre *Orthopoxvirus* et permettent une protection croisée avec les autres orthopoxvirus. Le seuil d'AcNVACV nécessaire à une protection efficace contre le virus de la variole reste inconnu. Mais une étude prospective laisse penser qu'un titre égal ou supérieur à 32 (inverse de la dilution) suffirait pour protéger contre la variole (Mack *et al.*, 1972).

Lors de la campagne d'éradication, 95 % des primo-vaccinés présentaient un titre en anticorps supérieur ou égal à 10 (Cherry *et al.*, 1977). Ce titre persisterait pendant dix ans chez les personnes ayant reçu un rappel et jusqu'à trente ans chez celles ayant reçu deux rappels.

Les AcNVACV peuvent être encore présents dans le sérum jusqu'à soixante-quinze ans après vaccination, alors que la réponse cellulaire antivirale T-spécifique déclinerait lentement avec une demi-vie de huit à quinze ans (Hammarlund *et al.*, 2003). La meilleure preuve de l'efficacité de ces vaccins antivarioliques de première génération reste le résultat de la campagne mondiale de vaccination menée par l'OMS avec la disparition de cette maladie.

4.1.3. Les complications post-vaccinales :

Des complications post-vaccinales (Figure 16) ont été rapportées dans un certain nombre de cas. Elles sont peu nombreuses, souvent incapacitantes, parfois mortelles. Les principales référencées sont citées ci-après (MSJS, 2003):

- Les inoculations secondaires sont les complications les plus fréquentes (1 cas sur 2000). Elles consistent en la transmission du virus du site de vaccination à une autre partie du corps (principalement visage, bras, périnée) ou à une tierce personne. Une transmission oculaire peut avoir lieu par simple contact et entraîner la cécité.



Figure 16 : Complications post-vaccinales. Illustration de certains types de complications post-vaccinales (source : CDC).

La vaccine généralisée entraîne l'apparition d'éruptions non pustuleuses dont l'évolution est souvent favorable. La fréquence est de 1 cas pour 5000 lors de la primo-vaccination et 1 cas sur 100 000 lors de rappels à 10 et 20 ans.

- L'*eczema vaccinatum* était principalement observé chez des patients présentant de l'eczéma ou une dermatite atopique. Il se traduit par une répllication active du virus de façon locale ou disséminée, donnant lieu à des lésions ombiliquées. La fréquence estimée de cette complication est de 1 cas pour 25000 dans le cadre d'une primo-vaccination et de 1 cas pour 250 000 dans le cadre d'un rappel, avec une mortalité de 30%.

- Le *vaccinia necrosum* était encore moins fréquent : 1 à 2 cas pour 1 million (principalement chez des personnes immunodéficientes). Il se caractérise par une répllication du virus dans les tissus sous-jacents de l'épiderme donnant lieu à la présence de plaies sur une grande partie du corps, qui deviennent ulcéreuses. Cette complication était fatale dans 100% des cas.

- L'encéphalite post-vaccinale est une complication rare (12 cas pour 1 million chez les primo-vaccinés contre 2 cas pour 1 million chez les revaccinés). Des séquelles neurologiques sont observées chez environ 25% des cas, et la mortalité survient dans 15 à 25% des cas.

- Une transmission placentaire est également possible donnant lieu à une vaccine congénitale (complication extrêmement rare) et à l'avortement du fœtus ou au décès du nouveau-né après l'accouchement.

Plus récemment, d'autres complications ont également été décrites aux Etats-Unis parmi des populations civiles et militaires vaccinées : myocardites, péricardites, angines de poitrine, crises cardiaques et thrombocytopénies (CDC, 2009a, 2010).

Type	Vaccin	Souche parentale	Description	Souche produit sur	capacité à se répliquer chez l'homme	Avantages	Inconvénients
2 ^{ème} génération	ACAM 1000	NYCBH (New York City Board of Health) - DRYVAX	vaccin historique, purifié sur plaque	cellules MRC5	OUI	vaccin à l'origine de l'éradication, normes de qualité de production améliorées réplicatifs et faciles à produire	responsable de complications post-vaccinales
	ACAM 2000			cellules Vero			
	CCSV (cell-cultured smallpox vaccine)			adapté pour se répliquer sur MRC5			
	Elstree (BN)	Lister Elstree	vaccin historique, normes de qualité de fabrication améliorées	fibroblastes primaires d'embryon de poulet			
3 ^{ème} génération	MVA TBC-MVA, IMVAMUME, ACAM 3000	dérivé de la souche CVA dermovaccinia	souche obtenue après plus de 570 passages successifs sur cellules d'embryon de poulet - perte d'~15% du génome parental (gènes de virulence et d'évasion du système immunitaire)	CEF fibroblaste primaire embryon de poulet	NON	bonne innocuité et peu immunogène moins de gènes immunomodulateurs peut être inoculé aux personnes contre-indiquées	peu immunogènes efficacité non testée non réplicatif coût de production plus élevé
	LC16M8	Lister	délétion du gène B5R - réduit la libération de la forme EEV	série de passages sur cellules de rein de lapin à température faible	OUI	Bonne innocuité après 1er et 2ème génération	efficacité non testée
	NYVAC	Copenhagen	clone délété de 18 gènes immunomodulateurs	culture de cellules primaires	NON	bonne innocuité même pour les personnes immunodéprimées	
	dVV-L	Lister	délétion du gène de l'Uracil DNA glycolase		NON	bonne innocuité (en théorie) peut être produit en culture cellulaire complémentaire	efficacité non testée - non réplicatif

Tableau 3 : Liste et caractéristiques des candidats vaccins antivarioliques. Caractéristiques des candidats vaccins antivarioliques de 2^{ème} et 3^{ème} génération en cours de développement

4.2. Les vaccins antivarioliques de 2^{ème} génération :

Pour respecter les bonnes pratiques de laboratoire, des vaccins dits de 2^{ème} génération (tableau 3) utilisant les souches de virus à l'origine de l'éradication ont été produits sur cellules (cellules primaires d'embryon de poulet : cellules CEF ; cellules de rein de singe vert : cellules Vero ou cellules fibroblastiques humaines : cellules MRC5) assurant une stérilité du produit. Ces vaccins ont été élaborés à partir de deux souches essentiellement, Lister et NYCBH, qui sont des souches équivalentes (rapport OMS «*best practices in vaccine production for smallpox and other potential pathogens*») et peu « réactogènes ». Un groupe d'experts a été mis en place par l'Agence Européenne pour l'évaluation des Médicaments (EMA) avec pour mission de donner des recommandations sur les moyens de production, le type d'études précliniques (sur animaux) et cliniques à mettre en œuvre par les différents laboratoires développant ces vaccins, en vue d'obtenir une AMM.

Deux types de vaccins ont été développés et ont fait l'objet d'études précliniques et cliniques : un vaccin monoclonal, après sélection d'un clone viral atténué et un vaccin polyclonal, respectant la diversité antigénique de la population virale initiale.

4.2.1. Le vaccin monoclonal: « ACAM 2000 »

Ce vaccin a été élaboré par les laboratoires Acambis-Baxter à partir de la souche NYCBH (vaccin Dryvax utilisé aux Etats-Unis). Il est produit sur cellules MRC5. Un clone viral (ACAM 1000) atténué a été sélectionné parmi une population polyclonale, ce qui entraîne une perte de la diversité antigénique, mais ce clone induit une immunogénicité similaire au vaccin NYCBH chez un modèle murin (Monath *et al.*, 2004).

Après des essais cliniques concluants et pour des raisons de production industrielle, les laboratoires Acambis-Baxter ont développé le vaccin : « ACAM 2000 », qui n'est autre que le même clone mais produit sur cellule Vero (Monath *et al.*, 2004).

Ce vaccin induit une plus faible neurovirulence chez le modèle murin et le modèle primate non humain (PNH) par rapport au vaccin Dryvax. Des cas de myopéricardites ont été rapportés avec : « ACAM 2000 », dans les mêmes proportions que le vaccin Dryvax, lors d'essais cliniques de phase II en avril 2004 (Artenstein *et al.*, 2005). Ce candidat a tout de même été approuvé par la FDA en 2008. Une étude clinique de phase I a montré que : « ACAM 2000 » est aussi immunogène (titre en anticorps neutralisants)

que le candidat vaccin : « ACAM 1000 » et le vaccin Dryvax (Frey *et al.*, 2009). La prise vaccinale est bonne chez 100% des sujets (même taille de pustules qu'avec : « ACAM 1000 » et Dryvax) et : « ACAM 2000 » semble moins réactogène que le vaccin Dryvax (érythème post-vaccinal moins étendu).

4.2.2. Les vaccins polyclonaux :

- souche Lister : « VVL » de Sanofi-Pasteur

Ce vaccin est produit sur cellules primaires d'embryon de poulet. Il a été évalué, dans notre laboratoire, chez le modèle murin et aucune différence significative par rapport au vaccin historique, en termes d'innocuité, d'immunogénicité et d'efficacité n'a été observée. A l'instar du vaccin de 1^{ère} génération, les souris immunisées avec cette souche sont complètement protégées (en termes de mortalité et de morbidité) contre une épreuve létale de cowpoxvirus et ce vaccin induit des réponses immunitaires cellulaires et humorales spécifiques qui sont équivalentes à celles induites par le vaccin historique (Ferrier-Rembert *et al.*, 2007).

Des essais cliniques de phase II ont été réalisés chez l'homme. Une étude a été menée par Sanofi-Pasteur en France, l'objectif étant de titrer les AcNVACV au cours du temps après vaccination. Cette analyse a été effectuée par l'unité de virologie de l'IRBA de 2004 à 2009.

- souche NYCBH : « CCSV » (Connaught)

Ce vaccin produit sur cellules MRC5 dérive du vaccin Dryvax. Contrairement au vaccin ACAM 2000, ce vaccin est polyclonal. Lors d'essais chez la souris, ce vaccin n'induit pas de complications post-vaccinales. Les mêmes résultats ont été recensés lors d'études d'innocuité chez l'homme, sur 350 volontaires (Greenberg *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2011). En ce qui concerne l'immunogénicité, ce vaccin de deuxième génération induit les mêmes réponses immunitaires cellulaires et humorales que Dryvax (Kennedy *et al.*, 2011). Enfin, ce vaccin protège complètement le primate non humain contre une infection avec du monkeypox virus aérosolisé (Jahrling *et al.*, 2000).

En conclusion, ces vaccins de deuxième génération induisent des réponses immunitaires protectrices similaires aux souches parentales vaccinales de 1^{ère} génération. Ils devraient avoir la même efficacité vaccinale que les vaccins historiques

chez l'homme, mais ils n'ont jamais été testés dans ce contexte puisque la variole a été éradiquée. Ces candidats vaccins respectent les bonnes pratiques de fabrication actuelles et chaque étape du processus de fabrication peut être contrôlée, ce qui élimine le risque d'infections bactériennes.

Cependant ces vaccins de deuxième génération, parce qu'ils sont réplicatifs, semblent engendrer les mêmes effets secondaires que les vaccins traditionnels et avec une même fréquence.

Les vaccins monoclonaux devraient entraîner, *a priori*, moins de complications post-vaccinales que les vaccins polyclonaux, mais risquent de ne pas être aussi efficaces que les vaccins de 1^{ère} génération en raison de la perte de diversité clonale par le choix d'un seul clone peu virulent.

4.3. Les vaccins antivarioliques de 3^{ème} génération

Ces vaccins sont aussi des virus de la vaccine vivants produits en culture cellulaire. Cependant, ils sont fortement atténués par la perte de plusieurs gènes et de leur capacité à se multiplier efficacement dans certaines cellules eucaryotes et notamment dans les cellules d'origine humaine (tableau 3). Ainsi, ils pourraient être administrés aux personnes présentant des contre-indications à la vaccination antivariolique avec les vaccins de 1^{ère} génération.

Pour la plupart de ces vaccins dits de troisième génération, il s'agit de virus non réplicatifs ou avec une capacité de réplication fortement réduite, génétiquement modifiés par délétions naturelles ou provoquées d'un ou plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence. Ces vaccins sont beaucoup moins immunogènes que les vaccins de 1^{ère} et 2^{ème} génération. Ils doivent être administrés à des doses 100 à 1000 fois supérieures à celles des vaccins traditionnels pour induire des réponses immunitaires protectrices aussi efficaces (Ferrier-Rembert *et al.*, 2008). Il existe plusieurs candidats en développement, le plus connu et le plus utilisé en tant que vecteur viral étant la souche Modified Vaccinia Ankara (MVA).

4.3.1. MVA : « IMVAMUNE »

Cette souche a été obtenue par le Pr Anton Mayr, à partir du virus Chorioallantois Vaccinia Ankara (CVA), souche utilisée en Turquie lors du programme d'éradication. Elle

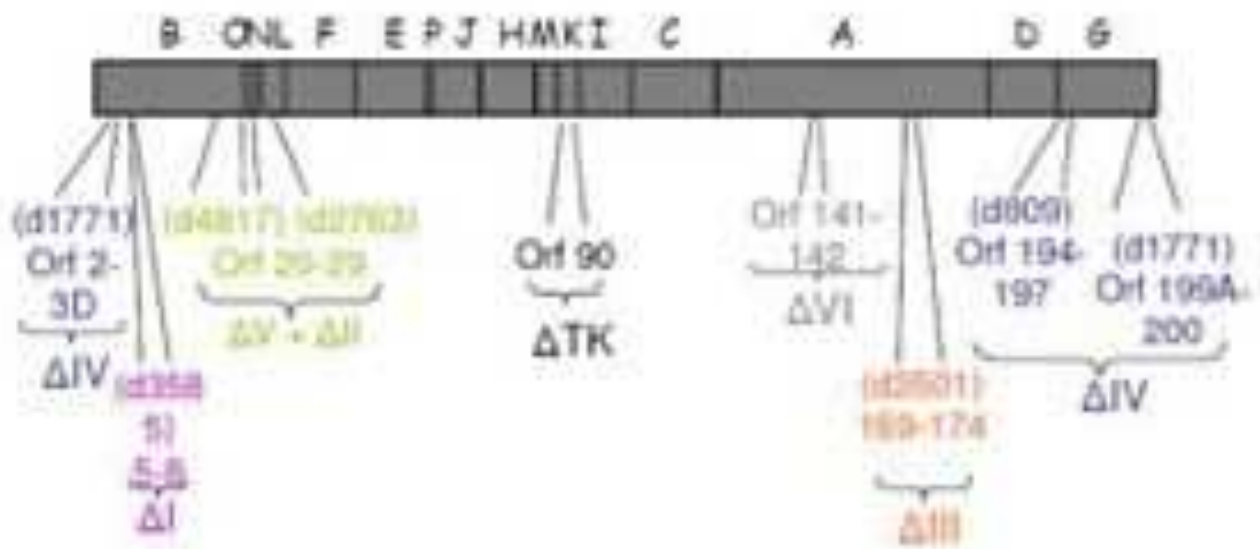


Figure 17 : Schéma des délétions génomiques naturelles de la souche MVA. Carte des délétions induites dans le génome de MVA par plus de 500 passages en cellules d'embryon de poulet (carte réalisée avec l'enzyme de restriction HindIII). Les gènes affectés par les mutations sont décrits dans l'article (Dimier *et al.*, 2011) (p 81)

a été atténuée après plus de 500 passages sur cellules d'embryon de poulet. L'étude génomique de cette souche a permis l'identification de gènes mutés dans le génome viral (Mayr *et al.*, 1978). Au total, une vingtaine de gènes ont été délétés lors de ces passages successifs, d'autres ont été tronqués ou modifiés par des mutations ponctuelles, ce qui correspond à une perte d'environ 30kpb d'information génétique soit à peu près 15% du génome de la souche parentale, réparties principalement sur six larges délétions (Del I à VI sur la figure 17).

Ce virus n'est, en théorie, plus capable de se répliquer en cellules de mammifères et surtout en cellules humaines (Antoine *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 1998; Drexler *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1991). Cependant une étude portant sur l'homogénéité du vaccin MVA a montré que certaines souches telles que MVA-572 et MVA-121 étaient capables de se répliquer sur quatre types cellulaires humains différents : les cellules HaCat (kératinocytes humains), HEK 293 (cellules embryonnaires de rein humain), 143B (cellules d'ostéosarcome humain) et HeLa (cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus) ainsi que chez des souris immunodéficientes. En réalité, seul un nombre restreint de types cellulaires ont été testés et il se pourrait que certains clones parmi la population hétérogène de la majorité des souches de MVA actuelles, puissent se répliquer. Toutefois, ces clones virulents représentent une minorité des variants et aucun d'entre eux n'a été isolé lors des essais précliniques ou cliniques (Verheust *et al.*, 2012). En effet, ce vaccin a été administré à environ 120 000 personnes en Allemagne de 1968 à 1980 et aucun effet secondaire n'a été observé chez ces sujets. Des essais cliniques de phase I et II chez l'homme ont été réalisés avec succès chez des sujets sains (Frey *et al.*, 2009; Vollmar *et al.*, 2006; von Krempelhuber *et al.*, 2010). Un essai clinique de phase III est prévu prochainement (NIH).

Plusieurs études menées chez la souris, vaccinée avec MVA et soumise à une épreuve létale avec le virus de l'ectromélie, ont montré que les cytokines, les macrophages, les cellules Natural Killer, les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ (LT-CD8⁺ et LT-CD4⁺) ainsi que les anticorps jouent un rôle important dans la protection de l'animal et la clairance du virus.

Dans un modèle murin, la souche MVA est capable d'induire une réponse immunitaire protectrice contre un challenge létal avec le cowpoxvirus, mais les doses

administrées pour obtenir un tel résultat sont plus importantes que la dose inoculée de vaccin de 1^{ère} génération : 10^7 pfu en intramusculaire minimum pour MVA contre 10^5 pfu pour le vaccin historique (Ferrier-Rembert *et al.*, 2008). Plusieurs inoculations de MVA peuvent induire une réponse immunitaire égale et même parfois supérieure à celle induite par le vaccin Dryvax alors inoculé par scarification (Wyatt *et al.*, 2004) et une protection à long terme, similaire à celle induite par le vaccin historique, peut être observée chez la souris si MVA est inoculé en rappel (Ferrier-Rembert *et al.*, 2008).

Des études similaires menées chez le primate non humain ont montré qu'indépendamment du protocole de vaccination, les singes présentaient une réponse en anticorps dirigés contre des antigènes viraux (B5 et A33 : EEV et L1 : IMV), un titre d'anticorps neutralisant et une quantité de LT-CD8⁺, similaires (Earl *et al.*, 2004). De plus, les animaux étaient protégés contre l'infection avec le monkeypoxvirus. Une seconde injection de MVA augmente le titre d'anticorps, comme cela a déjà été démontré chez la souris. Enfin, la protection induite par MVA semble plus rapide que celle induite par Dryvax, mais cela est probablement dû au fait que la dose vaccinale inoculée avec MVA est plus importante (facteur 1000).

Les études cliniques publiées avec « IMVAMUNE » montrent que malgré des doses utilisées très élevées et un rappel, les réponses immunitaires pourraient ne pas être assez importantes pour assurer une protection suffisante contre la variole. Ainsi une dose de 10^8 DICT₅₀ (en sous cutanée) ne permet une séroconversion en AcNVACV que dans 71% des cas (von Krempelhuber *et al.*, 2010) alors que ce taux atteint plus de 90% avec le vaccin traditionnel (Frey *et al.*, 2009). Les réponses immunitaires cellulaires spécifiques sont encore moins fréquentes. En effet seulement 15% des sujets sont répondeurs en ce qui concerne la réponse CD4⁺ spécifique et 52% ont une réponse CD8⁺ spécifique. Deux doses d'« IMVAMUNE » à 28 jours d'intervalle, injectées en sous cutané, ne conduisent qu'à une séroconversion de 80% des sujets vaccinés (Vollmar *et al.*, 2006).

4.3.2. MVA : « ACAM 3000 »

Le vaccin « ACAM 3000 » est également constitué de la souche MVA. Il a été développé par la société Acambis. Une étude clinique sur l'innocuité et l'immunogénicité

de ce candidat vaccin a montré que le virus était bien toléré par l'organisme quelle que soit la voie d'inoculation et qu'il induit une protection partielle contre le vaccin historique Dryvax, se traduisant par une diminution de la taille de la pustule de scarification, dite « Jennerienne » (Seaman *et al.*, 2010).

Lors d'une autre étude sur les différentes voies d'administration du vaccin, une réaction locale au site de vaccination a pu être observée, après une injection sous-cutanée, accompagnée parfois d'un érythème, qui disparaissait en 4 à 7 jours. Aucun effet secondaire grave lié à la vaccination n'a été observé. Une réponse humorale (anticorps neutralisants dirigés contre la souche Western Reserve du virus de la vaccine) a été détectée chez 81% des sujets après 2 vaccinations et semble aussi être dose-dépendante. Une réponse cellulaire a aussi pu être détectée mais sans corrélation avec la voie d'administration et la dose (Wilck *et al.*, 2010) comme c'est le cas pour le candidat vaccin « IMVAMUNE».

4.3.3. « LC16m8 »

« LC16m8 » est une souche atténuée produite à basse température sur cellules de rein de lapin (Kenner *et al.*, 2006), isolée après plus de 45 passages (Hashizume *et al.*, 1987).

Elle a été développée au Japon à partir de la souche Lister (Kidokoro *et al.*, 2005; Morikawa *et al.*, 2005; Sugimoto & Yamanouchi, 1994) et choisie pour la faible taille des plages de lyse qu'elle induit en culture cellulaire. Cette souche a conservé tous les cadres de lecture du virus de la vaccine sauf pour le gène B5R, une glycoprotéine nécessaire à la production de particules virales enveloppées et par conséquent, nécessaire à la dissémination du virus chez l'hôte infecté.

Ce candidat vaccin a été testé sur 100 000 enfants entre 1973 et 1975 (Yamaguchi, 1975) puis sur près de 2000 adultes, sans qu'aucun effet secondaire ne soit rapporté. Ce virus est moins pathogène que la souche parentale car il s'agit d'une souche non neuroinvasive, avec une neurovirulence très réduite par rapport à la souche parentale Lister et NYCBH (Hashizume *et al.*, 1987).

Ce virus induit une réponse humorale et une protection comparables à Dryvax chez l'animal (Empig *et al.*, 2006; Meseda *et al.*, 2009), d'après des études faites sur le modèle murin et le lapin. Des essais cliniques de phases I et II ont été réalisés (Kenner *et al.*, 2006) et les premiers résultats publiés semblent indiquer que le candidat vaccin,

comme le vaccin Dryvax, induit une réponse humorale spécifique croisée (anticorps neutralisants) contre différents orthopoxvirus (virus de la vaccine, monkeypox virus et virus de la variole majeur). Cependant au bout de 30 jours post-vaccination, la réponse humorale induite par le vaccin Dryvax semble plus importante que celle induite par le candidat LC16m8, contre la souche de vaccine NYCBH. Le candidat vaccin induirait une prolifération lymphocytaire plus importante que Dryvax, alors que le taux d'IFN γ secrété par les cellules T, mesuré par ELISPOT est plus élevé avec Dryvax (Kennedy *et al.*, 2011; Kennedy *et al.*, 2012).

La taille des lésions dites « jennériennes » suite à la prise du vaccin historique est réduite lorsque les sujets ont été pré-immunisés avec LC16m8, ce qui signifierait que le candidat vaccin de 3^{ème} génération pourrait réduire les effets secondaires du vaccin répliatif de 1^{ère} génération (Gordon *et al.*, 2011). Enfin, même si la souche LC16m8 est bien tolérée par l'organisme en raison de son incapacité à se propager au-delà du site d'inoculation, une forte dose de virus vaccinal est nécessaire par rapport au vaccin traditionnel.

En conclusion, le candidat LC16m8 est un bon candidat pour compléter la gamme des vaccins de 3^{ème} génération ; aucun effet secondaire n'a été observé lors des essais cliniques. Il protège l'animal contre des épreuves létales, mais les réponses immunitaires qu'il induit chez l'homme ne semblent pas aussi fortes que celles induites par Dryvax (réponse anticorps, IFN) et il n'a jamais fait ses preuves d'efficacité contre la variole.

Les vaccins de 3^{ème} génération semblent donc plus sûrs et n'indui raient pas d'effets secondaires comme ceux observés avec les vaccins de 1^{ère} et 2^{ème} génération. Cependant ils sont beaucoup moins immunogènes que ces derniers et des doses beaucoup plus élevées de virus (au moins 100 fois) sont nécessaires pour obtenir des réponses immunitaires équivalentes et une protection similaire vis à vis d'une épreuve létale. A l'heure actuelle, aucun de ces vaccins n'a obtenu d'AMM. Des études précliniques supplémentaires, chez le primate non humain, infecté avec du monkeypox virus ou avec du virus de la variole (trop peu de résultats expérimentaux à l'heure actuelle) et des études cliniques sont encore nécessaires pour déterminer leur efficacité

protectrice et les conditions d'utilisation : la dose minimale à inoculer, le nombre de rappels, la durée de la réponse immunitaire spécifique.

L'avantage de ces candidats est leur innocuité, permettant de les inoculer à des populations présentant des contre-indications jusqu'alors à la vaccination antivariolique ou de les utiliser en primo-vaccination dans le but de diminuer les effets secondaires d'une seconde vaccination avec une souche vaccinale historique. Cependant, leur efficacité vaccinale chez l'homme restera toutefois théorique puisqu'ils n'ont jamais été testés contre la variole.

En conclusion, les vaccins de première génération sont efficaces puisqu'ils ont permis l'éradication de la maladie mais ils engendrent des complications post-vaccinales trop sévères pour être inoculés à une population présentant des contre-indications à la vaccination antivariolique (VIH séropositif, traitements immunosuppresseurs, maladies auto-immunitaires). Des vaccins de 3^{ème} génération sont en développement pour pallier ces complications post-vaccinales ; ils ont une innocuité leur permettant d'être administrés à ces populations considérées à risque. Cependant ces candidats vaccins sont peu immunogènes comparé aux vaccins de première génération et leur efficacité vaccinale n'a jamais été testée contre la variole.

Chapitre II :

**LA FIEVRE HEMORRAGIQUE À VIRUS EBOLA
ET LES CANDIDATS VACCINS**

Année(s)	Lieu	Espèce	Cas, nombre de morts, Taux de mortalité (%)
1976	Zaïre (actuel RDC)	ZEBOV	318 cas, 280 morts, 88%
1976	Soudan	SEBOV	284, 151, 53%
1976	Angleterre	SEBOV	1 cas (a survécu); infection accidentelle de laboratoire
1977	Zaïre	ZEBOV	1 cas (décédé)
1979	Soudan	SEBOV	34, 22, 65%
1989	Etats-Unis	REBOV	Cas uniquement chez des macaques ; pas de cas humain
1990	Etats-Unis	REBOV	Cas uniquement chez des macaques, 4 cas humains asymptomatiques identifiés par sérologie
1989-1990	Philippines	REBOV	Cas uniquement chez des macaques ; 3 cas humains asymptomatiques identifiés par sérologie
1992	Italie	REBOV	Cas uniquement chez des macaques, pas de cas humain
1994	Gabon	ZEBOV	52, 31, 60%
1994	Côte d'Ivoire	CIEBOV	Epidémie chez les chimpanzés sauvages; 1 cas humain (a survécu)
1995	RDC	ZEBOV	315, 250, 81%
1996	Gabon	ZEBOV	37, 21, 57%
1996-1997	Gabon	ZEBOV	60, 45, 74%
1996	Afrique du sud	ZEBOV	2, 1, 50%
1996	Etats-Unis	REBOV	Cas uniquement chez des macaques, pas de cas humain
1996	Philippines	REBOV	Cas uniquement chez des macaques ; 1 cas humain asymptomatique identifié par sérologie
2000-2001	Ouganda	SEBOV	425, 224, 53%
2001-2002	Gabon	ZEBOV	65, 53, 82%
2001-2002	RDC	ZEBOV	57, 43, 75%
2002-2003	RDC	ZEBOV	143, 129, 89%
2003	RDC	ZEBOV	35, 29, 83%
2004	Sud du Soudan	SEBOV	17, 7, 41%
2007	RDC	ZEBOV	264, 187, 71%
2007-2008	Ouganda	BEBOV	131, 42, 32%
2008	Philippines	REBOV	Des cochons ont été infectés; 6 cas asymptomatiques humain identifiés par sérologie
2008-2009	RDC	ZEBOV	32, 15, 47%
2011	Ouganda	SEBOV	1 (décédé)
2012-	Ouganda	SEBOV	60, 16, 27% (au 17 août)
	RDC	BEBOV	24, 11, 46% (au 28 août)

Tableau 4 : Liste des épidémies de fièvres hémorragiques à virus Ebola. ZEBOV : Ebolavirus Zaïre, SEBOV : Ebolavirus Soudan, REBOV : Ebolavirus Reston, CIEBOV : Ebolavirus Côte d'Ivoire (ou Taï Forest) et BEBOV : Ebolavirus Bundibugyo.

1. Historique et Epidémiologie

1.1. Historique

En 1976, deux épidémies causées par le virus Ebola apparaissent simultanément au Soudan et au Zaïre, actuelle République Démocratique du Congo (RDC), en Afrique équatoriale. En RDC, dans le village Yambuku, proche de la rivière Ebola, 318 personnes de l'hôpital missionnaire de la ville seront infectées et 280 personnes décèderont (patients et personnels médicaux). Cette épidémie reste à ce jour la plus meurtrière (taux de létalité de 88%). Des ouvriers d'une usine de coton située à Nzara, au Soudan, souffrent de fièvres hémorragiques. C'est après leur hospitalisation que le pic de l'épidémie est atteint, l'environnement hospitalier favorisant la propagation du virus, touchant ainsi 284 personnes dont 151 décèderont.

Les deux épidémies ont été causées par deux espèces de filovirus différentes : le virus Ebola Zaïre (ZEBOV) et le virus Ebola Soudan (SEBOV). Des épidémies récurrentes causées par le SEBOV et le ZEBOV ont été recensées par l'OMS, en Afrique équatoriale en 1977 et en 1979, faisant 35 morts au total. Il faudra ensuite attendre le milieu des années 1990, pour observer d'autres épidémies mortelles causées par le ZEBOV et le SEBOV. Depuis 1976, 1774 personnes décèderont des suites d'une infection par le ZEBOV ou le SEBOV. Des pertes importantes sont également à déplorer parmi la population des singes africains. Les épidémies sont recensées dans le tableau 4.

En 1989, des singes macaques (*Macaca fascicularis*) importés des Philippines et stabulés en quarantaine dans une animalerie de la ville de Reston aux Etats-Unis sont infectés par un virus Ebola. Très vite la maladie se propage aux autres singes en quarantaine dans l'animalerie. Le virus ne semble pas pathogène pour l'homme, quatre cas asymptomatiques ayant été constatés après analyse sérologique parmi les personnels de l'animalerie aux Etats-Unis et trois cas aux Philippines. Il s'agit d'une nouvelle espèce de virus Ebola : Ebola Reston (REBOV). D'autres épidémies causées par le REBOV ont été rapportées en Europe, aux Etats-Unis et aux Philippines (tableau 4). Plus récemment, en 2008, une épizootie a touché des porcs fermiers aux Philippines (Barrette *et al.*, 2009). Soixante-dix pour cent de l'élevage porcin testé est positif pour la présence d'anticorps anti-REBOV avec différentes techniques (ELISA, test de neutralisation) (Sayama *et al.*, 2012).



Figure 18 : Distribution géographique des épidémies de filovirus

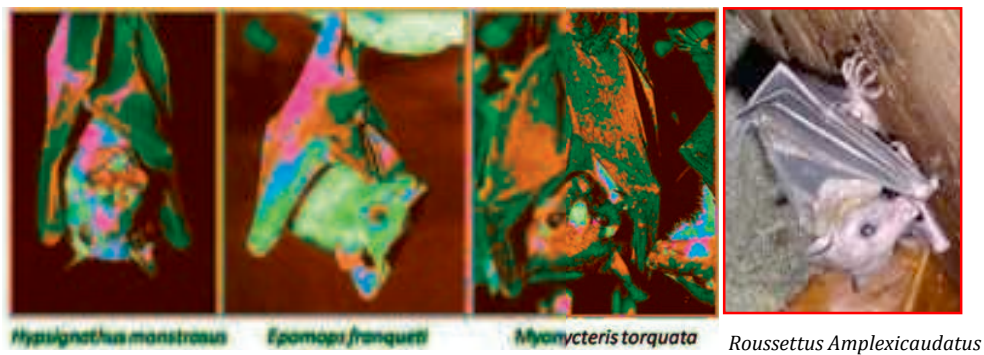


Figure 19 : Photos de chauves-souris susceptibles d'être le réservoir naturel du virus Ebola.

Une quatrième espèce de virus Ebola est découverte en 1994. Une primatologue est infectée après avoir pratiqué des autopsies de chimpanzés retrouvés morts dans la forêt Taï en Côte d'Ivoire. La patiente rapatriée et soignée en Suisse, survivra à l'infection. Cette nouvelle espèce est appelée Ebolavirus Côte d'Ivoire (CIEBOV) ou Taï Forest (TAFV), d'après la nomenclature revue par Kuhn en 2010 (Kuhn *et al.*, 2010). Cet épisode est le seul cas connu d'infection par le CIEBOV.

Enfin, entre 2007 et 2008, une épidémie dans le district de Bundibugyo, en Ouganda, toucha 131 personnes dont 42 mourront (Towner *et al.*, 2008). Le virus en cause est une nouvelle espèce, Ebolavirus Bundibugyo (BEBOV).

1.2. Épidémiologie

La distribution géographique des différentes épidémies de fièvres hémorragiques virales à filovirus, correspond à la zone équatoriale du globe. Les zones endémiques des virus Ebola Zaïre, Soudan, Bundibugyo et Côte d'Ivoire sont proches des forêts humides d'Afrique centrale. Le REBOV semble endémique dans le sud de l'Asie, aux Philippines (figure 18).

De nombreuses études ont été menées afin de découvrir l'hôte naturel des filovirus. Étant donné que les grands singes succombent rapidement à une infection par le virus Ebola en développant des signes cliniques similaires à ceux observés chez l'homme, ils ne peuvent pas être considérés comme le réservoir naturel du virus. Suite aux fortes épidémies de 1976, des recherches ont été entreprises sur le terrain : elles sont basées sur la capture d'animaux sauvages (vertébrés et invertébrés) susceptibles d'être des hôtes naturels potentiels des filovirus. Au total, près de 7000 invertébrés et 30 000 vertébrés ont été analysés et des séquences nucléotidiques spécifiques ont pu être détectées par des outils de biologie moléculaire chez des rongeurs (*Mus musculus*, *Praomys sp* et *Ollula sylvisorex*) mais ces résultats n'ont pas pu être confirmés.

Suite aux épidémies du début des années 2000, des prélèvements ont été effectués sur les animaux sauvages à proximité des villages touchés par l'infection et des fragments d'ARN ainsi que des anticorps anti-ZEBOV ont pu être détectés chez les chauves-souris frugivores (Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2007): *Hypsignatus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata* (figure 19). D'après Leroy et ses collaborateurs (Leroy *et al.*, 2011b), les chauves-souris semblent être le réservoir naturel des filovirus en Afrique, bien qu'aucune particule virale n'a encore pu être isolée.

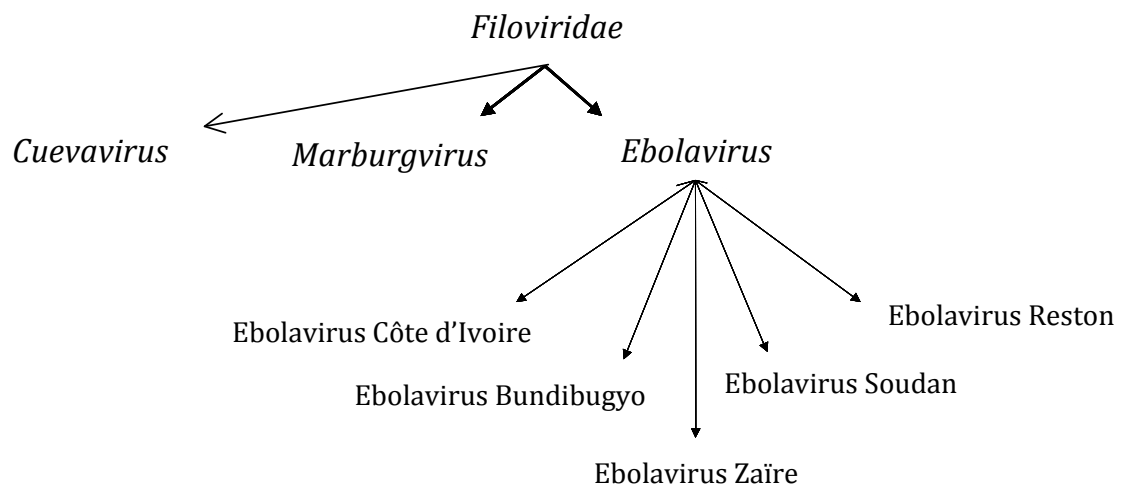


Figure 20 : Famille des *Filoviridae*

Enfin en 2011, une étude similaire a été menée aux Philippines ; des prélèvements ont été effectués chez des chauves-souris capturées dans la forêt de Dimilan, située à une trentaine de kilomètres des foyers d'infection de l'établissement de quarantaine des singes pour l'exportation et des élevages porcins où le REBOV a été isolé. Une espèce de chauve-souris a pu être mise en évidence comme réservoir potentiel du REBOV : *Rousettus amplexicaudatus* (figure 19) (Taniguchi *et al.*, 2011).

Récemment, une étude a montré que des anticorps anti-nucléoprotéine de ZEBOV et REBOV ont été détectés dans le sérum de nouvelles espèces de chauve-souris : *Epomorphorus gambianus*, *Nanycteris veldkampii* et *Eidolon helvum*, renforçant l'hypothèse selon laquelle les chauves-souris seraient le réservoir naturel des filovirus (Hayman *et al.*, 2012).

2. Caractéristiques des Filovirus

2.1. Classification

L'agent étiologique de la fièvre hémorragique virale à Ebola virus est le virus Ebola (EBOV). Il appartient à la famille des *Filoviridae* (figure 20). Il tient son nom de la vallée de la rivière Ebola en République Démocratique du Congo (anciennement Zaïre), qui est près du site de la première épidémie reconnue en 1976, dans un hôpital de la mission dirigé par des religieuses flamandes.

La famille des *Filoviridae* est divisée en trois genres: le genre *Ebolavirus*, le genre *Marburgvirus*, dont les virus infectent l'homme et les PNH et un nouveau genre, le genre *Cuevavirus*, comprenant le virus Lloviu, découvert en 2011 en Espagne et responsable d'infections mortelles chez les chauves-souris.

Le genre *Ebolavirus* comprend cinq espèces virales distinctes : *Ebolavirus Zaïre*, *Ebolavirus Soudan*, *Ebolavirus Bundibugyo*, *Ebolavirus Côte d'Ivoire* (ou Taï Forest) et *Ebolavirus Reston*.

L'espèce *Ebolavirus Zaïre* est la plus importante en virologie médicale, car il s'agit de l'espèce la plus mortelle pour l'homme et le primate non humain (PNH), le taux de mortalité pouvant atteindre 90%. Les autres espèces Soudan et Bundibugyo sont aussi pathogènes pour l'homme avec un taux moyen de mortalité plus faible (respectivement 53 % et 34 %). L'espèce *Ebolavirus Côte d'Ivoire* est mortelle pour le PNH. Chez l'homme, seulement deux cas non mortels, ont été rapportés par l'OMS. L'espèce

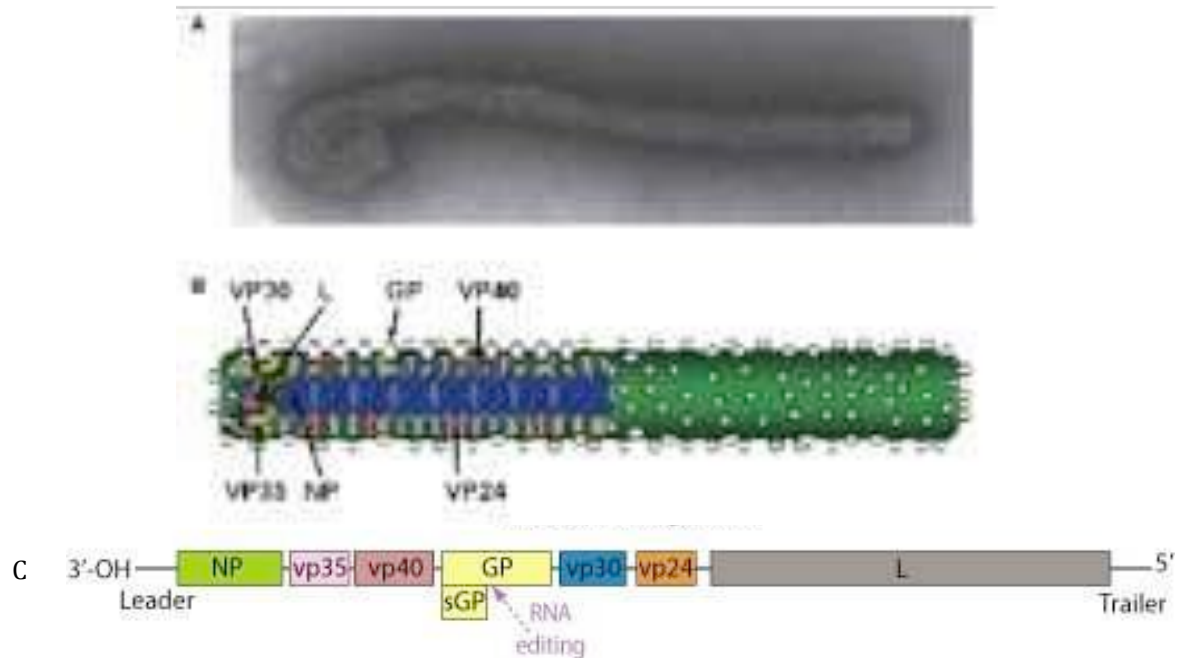


Figure 21 : Morphologie et organisation du virus Ebola. (A) Image de microscopie électronique d'une particule virale d'Ebola en forme de filament. (B) Organisation schématique des protéines du virus Ebola. (C) Organisation des gènes codants pour les 8 protéines du virus selon l'ordre 3'-5'. (Source : (Takada, 2012))

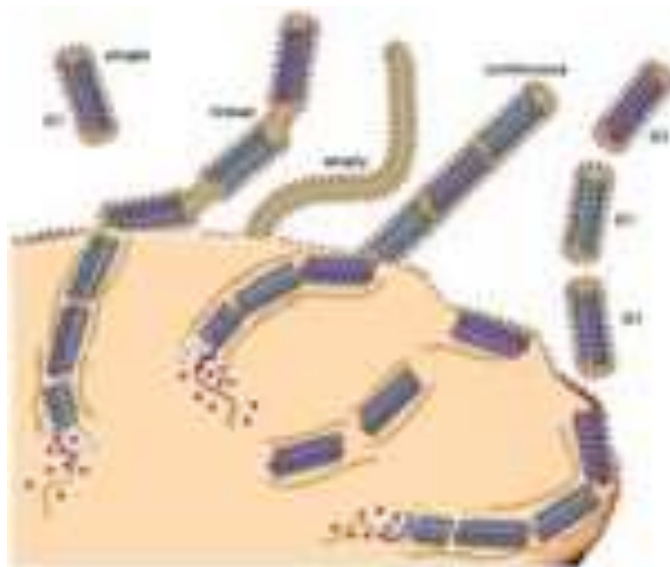


Figure 22 : Modèle d'assemblage des particules virales d'Ebola. Les nucléocapsides (NP) peuvent être constituées d'une ou plusieurs unités génomiques assemblées de manière continue ou liées avec un rétrécissement entre les génomes. (Source : (Beniac et al., 2012))

Ebolavirus Reston n'est pas pathogène pour l'homme (4 cas asymptomatiques décrits) mais est létal pour le PNH et les porcins. La majorité des espèces sont endémiques en Afrique équatoriale alors que l'espèce Ebolavirus Reston est endémique dans la région des Philippines.

2.2. Structure des virus

Les filovirus sont pléomorphes. En microscopie électronique, on peut les observer sous la forme d'un anneau, d'un six, d'un U et sous la forme d'un filament, d'où leur nom de filovirus (du latin *filum*). Les virions filiformes peuvent atteindre jusqu'à 14 000 nm de longueur et ont un diamètre uniforme de 80 nm (figure 21). Cette structure renferme un complexe ribonucléoprotéique hélicoïdal de 40 à 50 nm de diamètre. Une étude structurale très récente menée par une équipe canadienne sur la polypléidie des virions, expliquerait les différences de longueur entre les filaments par la présence d'une ou plusieurs nucléoprotéines (Beniac *et al.*, 2012). En effet, après l'étude de plus de 2000 virions, il apparaîtrait que la majorité des particules virales d'Ebola soient constituées de plusieurs unités de génome (ou nucléocapside) assemblées de manière continue ou liées, avec un rétrécissement entre les génomes. Cette équipe propose un modèle d'empaquetage du génome du virus Ebola (figure 22).

Les filovirus font partie des plus gros virus de l'ordre des *Mononegavirales*. Ils possèdent un génome linéaire à ARN simple brin non segmenté, de polarité négative, d'une longueur de 19 kpb codant pour 7 gènes organisés dans un ordre précis : la séquence 3'-leader – la nucléoprotéine (NP) – la protéine virale (VP) 35 – VP40- la glycoprotéine (GP) - VP30 - VP24 - la polymérase (L) et la séquence 5'-trailer (figure 21). Quatre de ces protéines : NP, VP30, VP35 et L sont associées à l'ARN génomique pour former la ribonucléoprotéine tandis que les trois autres protéines : GP, VP24, VP40 sont associées à la membrane. La membrane qui entoure la nucléocapside est une bicouche lipidique dérivée de la membrane cellulaire dans laquelle sont ancrés des trimères de GP formant des spicules à la surface des virions, nécessaires à l'attachement et à l'entrée du virus dans la cellule. Une huitième protéine non structurale est sécrétée par le virus : la Small GP (sGP) (Volchkov *et al.*, 1995). Les gènes sont séparés par de courtes régions d'un ou plusieurs nucléotides et certains gènes se chevauchent : VP35-VP40, GP-VP30 et VP24-L (figure 21). Les extrémités génomiques « Leader » et « Trailer » sont des régions non-codantes très conservées, importantes pour contrôler la transcription, la réplication

et le conditionnement des génomes viraux dans les nouveaux virions. Ce sont des régions très complémentaires qui permettraient aux virions, dans certaines conditions, de former des structures en épingle à cheveux : le 3'-leader est constitué de 30 à 70 nucléotides et le 5'-trailer est de longueur variable, selon l'espèce (Sanchez *et al.*, 2006).

C'est grâce à des analyses phylogénétiques de la région codante du gène de la GP qu'il a été possible de mettre en évidence l'existence des deux genres distincts *Ebolavirus* et *Marburgvirus* et de cinq espèces différentes parmi le genre *Ebolavirus*.

2.3. Cycle de réplication

2.3.1. Récepteurs du virus Ebola

Les filovirus possèdent un tropisme cellulaire très large. En effet, ils sont capables d'infecter différentes lignées cellulaires telles que des cellules épithéliales issues de différents tissus, des cellules endothéliales, des cellules monocytaires et les hépatocytes d'hôtes variés (homme, singe, chauve-souris, cobaye, souris). Ce large tropisme est dû à leur GP particulièrement glycosylée, capable de se lier à différents récepteurs telles que les lectines de type C (Dolnik *et al.*, 2008). Plusieurs protéines de surface ont ainsi pu être identifiées comme facteurs de liaison des filovirus avec la membrane cellulaire (Dolnik *et al.*, 2008). Ces récepteurs ne sont pas présents sur tous les types cellulaires sensibles à l'infection par les filovirus, mais ces molécules participent à la permissivité des cellules et sont considérées comme des co-facteurs de l'entrée du virus.

Dernièrement, Carette et son équipe ont identifié un facteur ubiquitaire essentiel à l'entrée du virus Ebola dans la cellule : le transporteur de cholestérol Niemann-Pick C1 (NPC1). Cette protéine est connue pour son rôle de transporteur du cholestérol depuis les endosomes et les lysosomes tardifs pour le redistribuer sur la membrane cellulaire (Carette *et al.*, 2011).

Une étude menée sur des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick, se traduisant par une accumulation du cholestérol libre dans les fibroblastes, induisant à long terme des troubles neurologiques et psychiatriques, (mutation délétère du gène NPC1) a montré que ces cellules étaient résistantes à l'infection par un virus de la stomatite vésiculaire recombinant exprimant la GP du virus Ebola. Par ailleurs, Cote et son équipe ont confirmé le rôle crucial de cette protéine, en

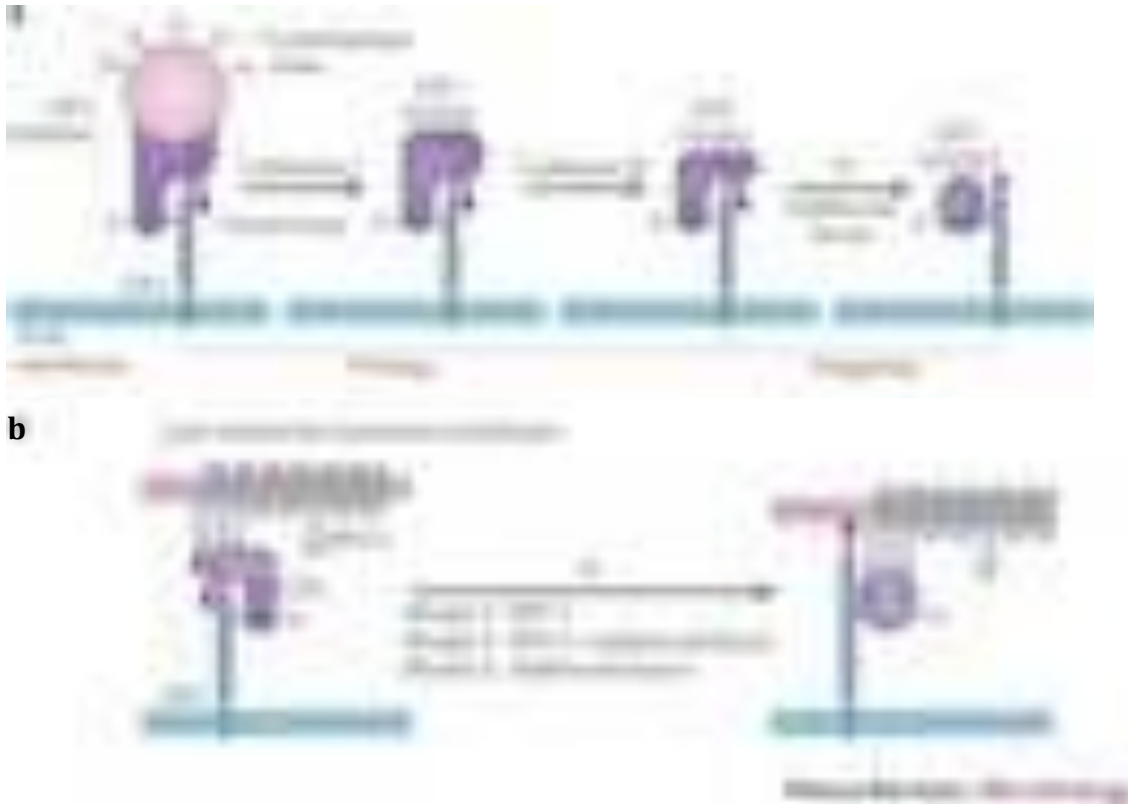


Figure 23 : Schéma des modifications subit par la glycoprotéine du virus Ebola lors de l'étape d'entrée dans la cellule. La GP du virus Ebola est clivée par la Cathepsines L puis la cathepsine B dans l'endosome (a). Le résidu de 19kDa subit ensuite une modification conformationnelle qui va libérer la boucle de fusion (flèche rouge) et permettre à la GP de lier le facteur de l'hôte NPC1. (b). Trois modèles sont proposés impliquant soit NPC1 (1), soit NPC1 et un facteur additionnel (2), soit un autre facteur de l'hôte (3), dans le processus de fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. (Source : [White & Schornberg, 2012](#))

démontrant que lorsque la protéine NCP1 était inhibée par des molécules chimiques, les cellules devenaient résistantes à l'infection par le virus Ebola (Cote *et al.*, 2011).

Un modèle plus développé de l'attachement du virus et de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire a été récemment décrit (White & Schornberg, 2012), montrant que la GP présente à la surface de la particule virale se lie à son (ses) récepteur(s) à la surface de la cellule, puis le virus est internalisé par macropinocytose et transporté jusqu'à un compartiment endosomal. Dans l'endosome-lysosome tardif, la GP (qui est une chaîne polypeptidique unique) va subir des transformations enzymatiques. Elle est constituée de deux sous-unités : GP1 (130kDa) et GP2. Ces deux sous-unités sont essentielles pour se fixer sur le récepteur membranaire (GP1) et pour la fusion avec la membrane cellulaire (GP2).

Une fois dans l'endosome, GP1 est clivée par la Cathepsine L (Hood *et al.*, 2010). Le résidu GP1 de 20kDa a perdu son domaine de type mucine et sa coiffe de glycan (Hood *et al.*, 2010; Schornberg *et al.*, 2006). Un deuxième clivage de la GP1 par la Cathepsine B ne va laisser qu'un résidu de 19kDa (Gnirss *et al.*, 2012 ; Schornberg *et al.*, 2006). Le pH faible à l'intérieur de l'endosome et l'action de facteur additionnel (NPC1) va entraîner des modifications conformationnelles du résidu GP1 de 19kDa et ainsi libérer la boucle de fusion portée par la sous-unité GP2 (figure 23). Les membranes cellulaire et virale vont fusionner, ce mécanisme permet de libérer la nucléoprotéine directement dans le cytoplasme où va avoir lieu la réplication du virus.

2.3.2. Réplication et transcription

Dès que la nucléocapside est dans le cytoplasme (figure 24), sept à huit ARNm monocistroniques polyadénylés et coiffés, sont synthétisés, suivant l'ordre 3'-5', à partir de l'ARN génomique encapsidé. Chaque gène possède sa propre séquence d'initiation et son codon STOP dans les régions intergéniques attenantes. La transcription se fait donc de manière séquentielle par le complexe protéique de la nucléocapside (NP, VP30, VP35 et la polymérase L) et selon un gradient décroissant de 3' en 5', induisant une forte expression de la NP et une faible expression de la polymérase L. Les ARNm sont ensuite traduits en protéines par les ribosomes cellulaires libres.

Lors de la transcription du gène de la GP, l'ARNm synthétisé est soumis à un mécanisme d'édition, qui se traduit par l'addition d'une adénosine. Lorsque l'ARNm n'est pas édité, une forme soluble de la GP, la sGP, est synthétisée.

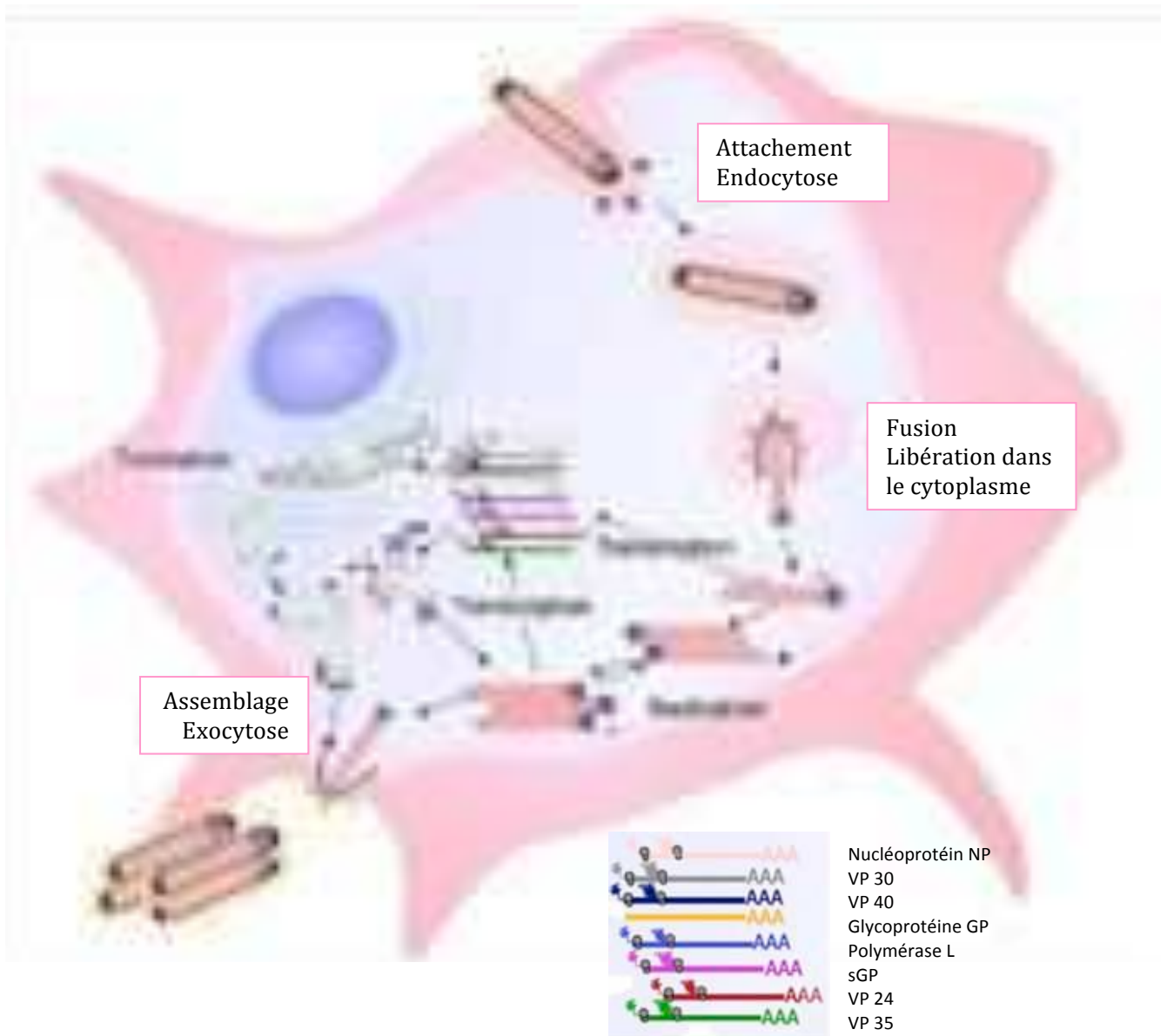


Figure 24 : Cycle de réplication du virus Ebola. (Source : (Olejnik *et al.*, 2011))

Lorsque le taux de NP néosynthétisée est trop élevé dans le cytoplasme il se produit un switch concernant l'activité du complexe enzymatique NP-VP30-VP35-L et celui-ci commence à répliquer l'ARN génomique en un brin « antisens » de polarité positive complémentaire. Ce brin d'ARN positif va alors servir de matrice à la synthèse de nouveaux génomes viraux d'ARN de polarité négative qui vont s'accumuler dans des « corps d'inclusion » puis vont être transportés jusqu'à la membrane plasmique pour former des nouvelles particules virales.

2.3.3. Assemblage des virus et bourgeonnement

Au niveau des corps d'inclusion, les nucléoprotéines et les protéines virales s'assemblent pour former des nucléocapsides et sont transportées jusqu'à la membrane plasmique. La façon dont la nucléocapside va se présenter sous la membrane cellulaire va déterminer la forme du virion (filament, U, six ou anneau). Le transport des corps d'inclusion vers la membrane lipidique semble être assuré par la protéine virale VP40. Le virion va ensuite sortir de la cellule par bourgeonnement au niveau des radeaux lipidiques (Freitas *et al.*, 2011). Il s'agit de microdomaines contenant des sphingolipides et du cholestérol qui sont présents naturellement dans les membranes biologiques. La nucléocapside va alors s'envelopper de membrane cellulaire, bourgeonner et se détacher de la cellule.

La GP du virus Ebola, passe par une étape de maturation dans l'appareil de Golgi. Le précurseur synthétisé lors de la transcription, la pré-GP, va subir différentes modifications, clivage, glycosylations, acétylations dans le compartiment golgien. La pré-GP est d'abord N-glycosylée dans le réticulum endoplasmique puis des O-glycosylations sont ajoutées sur la protéine dans l'appareil de Golgi. La pré-GP est ensuite clivée dans le réseau trans-golgien par une furine au niveau du résidu Arginine₅₀₁ en deux sous-unités, la GP₁ extracellulaire (501 acides aminés) et la GP₂ segment transmembranaire et intracellulaire (175 acides aminés) qui vont rester liées par un pont di-sulfure entre les acides aminés Cystéine en position 53 et 609 (Lee *et al.*, 2008). Les GP_{1,2} vont alors s'assembler en trimères, pour être transportés jusqu'à la membrane dans des vésicules sécrétrices et être exprimés à la surface de la cellule au niveau des rafts lipidiques, (Freitas *et al.*, 2011). Les virions qui bourgeonnent seront couverts de GP.

Une partie des trimères de GP_{1,2} membranaires peuvent être clivés par une métalloprotéase TACE (Tumor necrosis factor Alpha-Converting Enzyme) libérant ainsi

une forme soluble retrouvée parfois dans le sérum d'animaux infectés (Dolnik *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009).

3. Infection par les filovirus

3.1. Transmission des filovirus

Les filovirus sont à l'origine de zoonoses. Ils sont persistants chez un ou plusieurs animaux, lesquels pourraient être définis comme des « réservoirs », et pourraient alors se transmettre directement à l'homme ou au primate non humain (PNH).

Il s'est avéré que les personnes contaminées par le virus sont principalement des personnes travaillant dans la forêt équatoriale ou ses environs, le plus souvent en contact avec les animaux. La consommation d'animaux sauvages (singes et chauves-souris) accentue le risque de transmission du virus. Un certain nombre de modes de transmission sont connus : transmission inter-simienne et interhumaine, tandis que d'autres restent obscures tel le passage chauve-souris-singe/homme et singe-homme.

L'hypothèse selon laquelle le singe serait contaminé par l'ingestion de fruits souillés par la salive de chauves-souris porteuses du virus est la plus probable. Les primates non humains semblent très sensibles à l'infection naturelle par les filovirus et jouent un rôle essentiel dans les épidémies humaines, comme cela a été le cas à Marburg en 1967 et en Côte d'Ivoire en 1994. Les humains seraient ensuite infectés en manipulant les carcasses de primates.

Le mode de transmission interhumain se fait ensuite par contact direct entre les personnes, via les fluides corporels. L'infection peut être nosocomiale puisque l'environnement hospitalier a souvent favorisé la propagation du virus lors de plusieurs épidémies à ZEBOV et SEBOV.

La transmission par voie aérienne des filovirus est possible mais elle n'a pas été mise en évidence. Cependant, elle a été réalisée expérimentalement chez le singe rhésus ; elle cause alors une pathologie proche de celle observée après infection par voie intra-péritonéale et entraîne la mort de l'animal (Johnson *et al.*, 1995). L'aérosolisation de filovirus par un acte terroriste est donc à craindre. Ce mode de transmission a été observé avec le REBOV. En 1989 et 1990, tous les singes d'une animalerie à Reston ont été contaminés, même ceux qui étaient dans des cages à distance des macaques infectés, ce qui serait en faveur d'une transmission inter-simienne par aérosol (Kuhn, 2008).

L'observation des précédentes épidémies, fait penser que la transmission par aérosol n'est pas le mode principal de transmission des filovirus, mais des études sont en cours sur les primates non humains, pour évaluer le risque de la transmission de ZEBOV par voie aérienne et tenter de comprendre le mécanisme d'infection (Reed *et al.*, 2011).

La voie de transmission semble jouer un rôle important dans le développement et l'issue de la maladie. La voie parentérale semble être à l'origine d'une infection plus rapide (3 à 6 jours contre 5 à 9 jours pour une infection par exposition) de même, le taux de mortalité est plus important : 100% des cas associés à une injection contre 80% des cas associés à une exposition connue (Feldmann & Geisbert, 2011).

3.2. Clinique

Les virus ZEBOV, SEBOV et BEBOV sont responsables de fièvres hémorragiques sévères qui diffèrent dans leur période d'incubation, la sévérité de la maladie et le taux de mortalité.

La période d'incubation des fièvres hémorragiques à virus Ebola dure entre 2 et 21 jours (en moyenne 4 à 9 jours). L'état du patient se dégrade ensuite rapidement : il présente des signes cliniques et des symptômes non-spécifiques de la maladie : fièvre, fatigue, maux de tête, myalgie, nausées, qui peuvent être confondus avec les symptômes de la malaria, de la fièvre typhoïde ou d'autres maladies récurrentes en Afrique. La fièvre hémorragique à filovirus n'est pas suspectée jusqu'à l'apparition de rougeurs cutanées, d'hémorragie (1 patient sur 3, généralement en phase terminale) ou après des cas de transmission entre patients ou au personnel médical (Kortepeter *et al.*, 2011). Dans la majorité des cas, la mort du patient survient en deux semaines. Si celui-ci est toujours en vie au-delà du 14^{ème} jour, ses chances de survie sont supérieures à 75%.

Dans les formes fatales, les symptômes et les hémorragies s'aggravent rapidement et la mort survient en 48 heures. Inversement, dans les formes non fatales, les symptômes s'atténuent rapidement et la virémie diminue.

La convalescence est longue et marquée par des épisodes fébriles. Elle peut durer de quelques semaines jusqu'à 6 mois. Les séquelles d'une infection aiguë se caractérisent principalement par une asthénie, une perte de poids, des maux de tête, une myalgie, une arthralgie, une desquamation de la peau, une alopecie ou une anémie persistante (tableau 5).

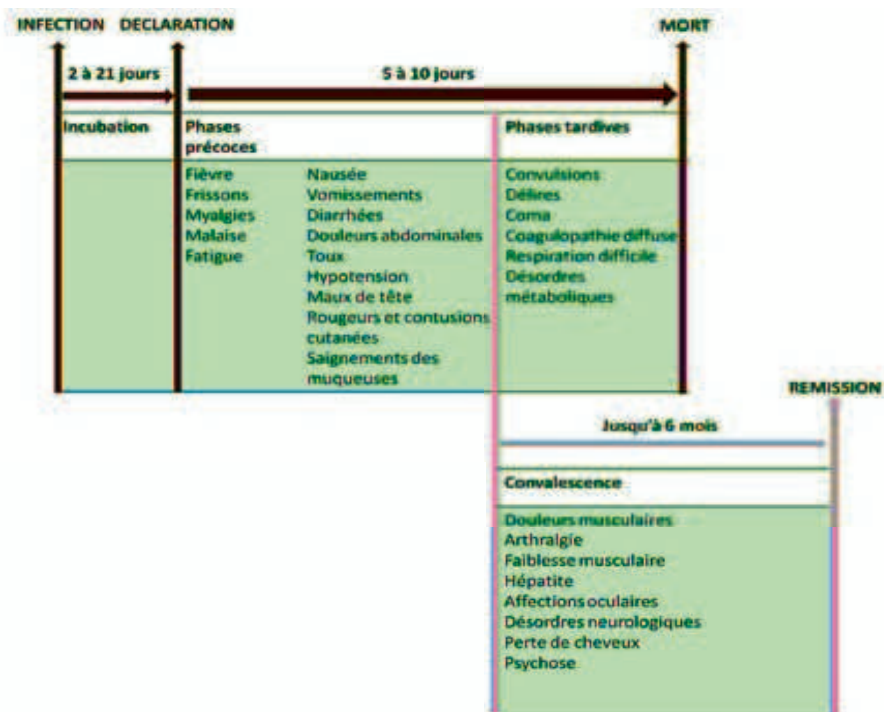


Tableau 5 : Aspects cliniques de la fièvre hémorragique à virus Ebola

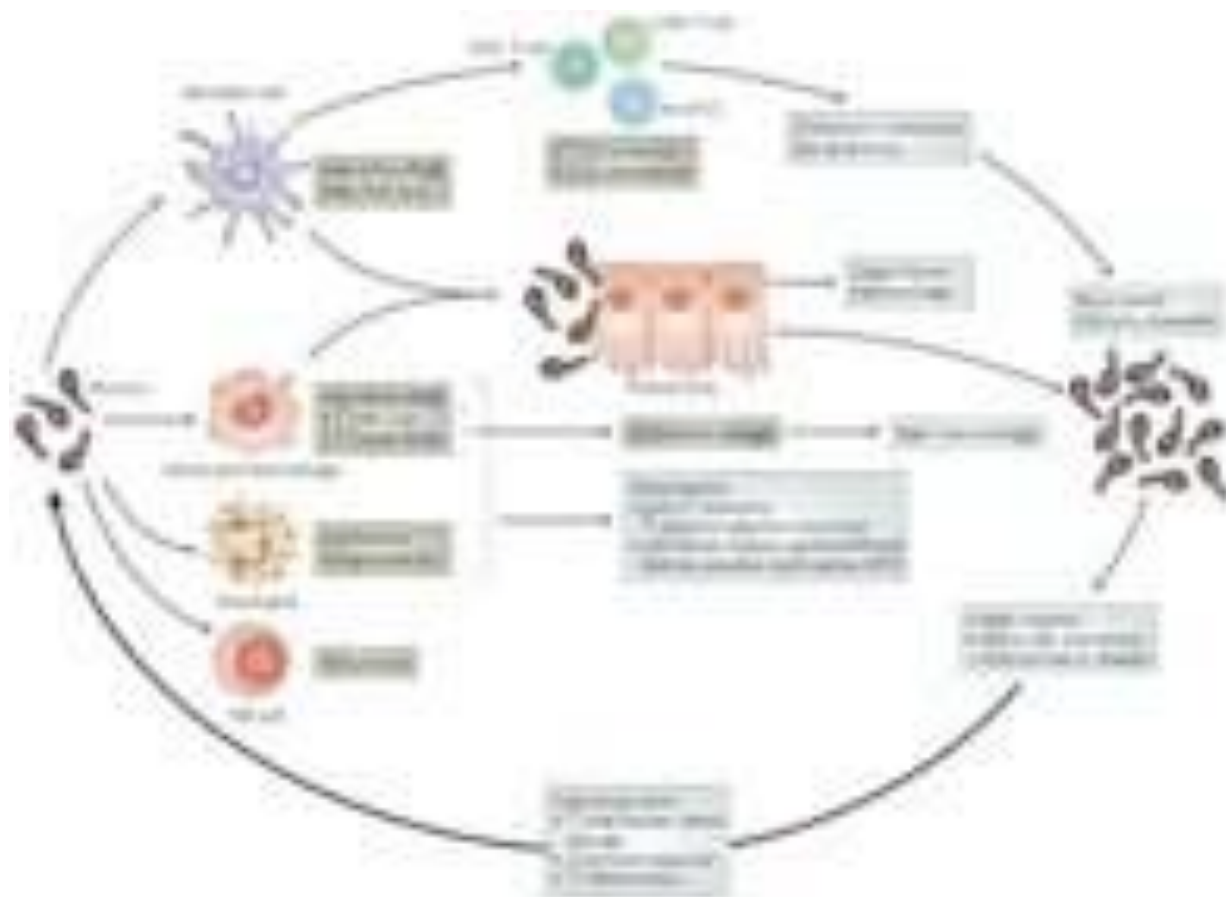


Figure 25 : Modèle de la pathogénèse de la fièvre hémorragique à virus Ebola.
(Source : (Mohamadzadeh *et al.*, 2007))

3.3. Pathogénèse

Les filovirus semblent entrer dans l'hôte en passant à travers les barrières mucosales, les lésions cutanées ou par voie parentérale : la réutilisation de seringues usagées a joué un rôle important lors des premières épidémies de virus Ebola en 1976. Leur tropisme cellulaire est large mais les cellules dendritiques (DC) et les macrophages, semblent être les principales cibles des filovirus. Ces cellules jouent un rôle important dans la dissémination du virus chez l'hôte de par leur capacité à atteindre tous les tissus par le système lymphatique et la circulation sanguine. Le virus est ainsi transporté jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, le foie et la rate, où il se réplique de manière abondante. En phase terminale, le virus infecte les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes des organes internes provoquant des hémorragies et une défaillance progressive de tous les organes qui conduisent à la mort de l'hôte en seulement deux semaines (Feldmann & Geisbert, 2011; Leroy *et al.*, 2011a; Mohamadzadeh *et al.*, 2007) (figure 25).

4. Les réponses immunitaires contre le virus Ebola

4.1. La réponse immunitaire innée

L'immunité innée est la première ligne de défense contre des agents infectieux et pathogènes qui nous entourent. Elle est mise en jeu immédiatement et est fonctionnelle quelques jours. La réponse immunitaire innée précoce a deux fonctions:

1- la reconnaissance non spécifique du « non-soi » : elle fait intervenir des récepteurs de reconnaissance de motif (Pattern Recognition Receptors : PRR), impliqués dans la détection des motifs du « non-soi » sur les agents pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs). La reconnaissance du non-soi fait aussi intervenir des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et met en place les acteurs de la fonction antivirale des cellules (induisant le recrutement de cellules immunitaires et l'apoptose de la cellule infectée).

2- induire et organiser la réponse immunitaire antigène-spécifique faisant intervenir les cellules T et les anticorps (Ac).



Figure 26 : Mécanisme d'inhibition de la voie de signalisation de l'INF par les protéines VP35 et VP24. (Source : (Ramanan *et al.*, 2011))

4.1.1. La réponse interféron

Lorsque la cellule reconnaît un PAMP du non-soi, ou détecte de l'ADN hétérologue dans son cytoplasme, une cascade de signalisation intracellulaire non-spécifique est activée et va stimuler la synthèse d'interféron (IFN) β . Une fois sécrété, l'IFN β va activer la voie de signalisation IFN-dépendante JAK/STAT et stimuler la synthèse d'IFN α/β qui va permettre le recrutement et l'activation (maturation) de cellules dendritiques (DC) (Mohamadzadeh *et al.*, 2007).

Des protéines du virus Ebola sont impliquées dans l'inhibition de la réponse IFN. En effet, VP35 fonctionne comme un antagoniste de l'IFN de type I en empêchant l'activation de facteurs de régulation de l'IFN, IFR-3 et IFR-7 (figure 26) (Hartman *et al.*, 2008; Ramanan *et al.*, 2011). VP24 interfère avec la cascade de signalisation de la voie IFN, en bloquant l'accumulation de la protéine STAT-1 phosphorylée au niveau nucléaire et par conséquent bloque le système intracellulaire de régulation de la sécrétion d'IFN (figure 26) (Feldmann & Geisbert, 2011; Leroy *et al.*, 2011a; Ramanan *et al.*, 2011).

4.1.2. La réponse cytokinique

Lorsque les cellules sentinelles (DC et macrophages) sont activées par la reconnaissance d'un agent pathogène, elles se mettent à sécréter des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance afin de recruter et d'activer d'autres cellules de l'immunité et induire une réponse immunitaire antivirale forte et efficace.

L'infection des DC et des macrophages par le virus résulte en une production rapide (3 à 6 heures post-infection) de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, tels que l'Interleukine (IL)-1, l'IL-10, l'IL-6 et de facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF) qui vont recruter d'autres macrophages et monocytes sensibles à l'infection, et par conséquent induire une réponse inflammatoire incontrôlable décrit comme un « orage cytokinique », lequel s'avère néfaste pour l'organisme.

La sécrétion de TNF- α (tumor necrosis factor) et de monoxyde d'azote (NO $^{\cdot}$) va mobiliser les neutrophiles immatures circulants et faciliter la sortie des molécules inflammatoires et des protéines de la circulation sanguine en causant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ce qui va induire des hémorragies (Bray, 2005).

Il semblerait qu'il y ait un profil cytokinique selon le filovirus. Un niveau d'expression de cytokines (TNF- α et IFN- γ) différent a pu être observé lors d'infections humaines par le SEBOV, ZEBOV ou le BEBOV, suggérant des réponses immunitaires différentes selon l'espèce (Gupta *et al.*, 2012; Hutchinson & Rollin, 2007; Sanchez *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer les différences de virulence et de taux de mortalité entre les différentes espèces (Gupta *et al.*, 2012).

De plus, une étude menée chez la souris, avec un virus ZEBOV adapté au modèle murin (maEBOV) par plusieurs passages successifs (Bray *et al.*, 1998; Ebihara *et al.*, 2007), a permis de mettre en évidence que certaines cytokines, Il-10 et IFN- γ , étaient nécessaires au contrôle de l'infection et à la survie de l'animal (Panchal *et al.*, 2009; Warfield *et al.*, 2003). Ce qui signifie qu'une régulation temporelle de la production de cytokines serait importante pour le contrôle de l'infection par les filovirus.

Enfin, l'infection des macrophages joue un rôle important dans l'activation de la coagulation intravasculaire disséminée avec la synthèse abondante d'un facteur tissulaire de surface qui va activer la cascade de coagulation et provoquer des microthromboses au niveau des différents organes et par conséquent épuiser les plaquettes et les différents facteurs de coagulation, provoquant ainsi des hémorragies dans tout l'organisme (Bray & Geisbert, 2005; Leroy *et al.*, 2011a; Martinez *et al.*, 2012; Mohamadzadeh *et al.*, 2007).

4.2. La réponse immunitaire adaptative

Les DC jouent un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire cellulaire. Les DC présentent l'antigène aux lymphocytes T_H par l'intermédiaire des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I ou II présentes à leur surface et vont ainsi stimuler les lymphocytes et polariser la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire TH₁ (lymphocytes LT CD4⁺ et lymphocytes LT CD8⁺) ou vers une réponse à médiation humorale TH₂ (Lymphocytes B + anticorps).

4.2.1. La réponse immunitaire à médiation cellulaire

L'infection des DC par le virus Ebola joue un rôle important dans la dérégulation de la réponse IFN et permet au virus d'échapper au système immunitaire adaptatif. La maturation des DC est altérée par les filovirus, les empêchant alors de présenter

l'antigène et d'induire une prolifération massive des lymphocytes T allogéniques. Il en résulte une inhibition de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative cellulaire (LT) et à médiation humorale faisant intervenir les lymphocytes B (LB). De plus, une déplétion des lymphocytes et des cellules NK est observée dès le début de l'infection dans les formes fatales alors que ces cellules ne sont pas sensibles à l'infection. L'apoptose massive de ces cellules a pu être mise en évidence et serait corrélée à l'expression de facteurs solubles sécrétés par les DC et les macrophages, tels que TNF- α , Fas, Fas-Ligand, TRAIL et le NO⁻ (Bray & Geisbert, 2005). Cependant, il semblerait que cette apoptose ne soit pas un facteur majeur de la pathogenèse de l'infection par les filovirus. En effet, des travaux menés avec des souris transgéniques exprimant fortement un facteur anti-apoptotique (bcl-2) montrent que l'inhibition de l'apoptose lymphocytaire ne protège pas ces animaux d'une infection létale avec le maEBOV (Bradfute *et al.*, 2010). En définitive, l'apoptose des lymphocytes serait probablement un effet secondaire de la surexpression des cytokines pro-inflammatoires plutôt que la cause de l'issue fatale de l'infection (Bradfute & Bavari, 2011).

Toutefois, il arrive qu'une réponse LT CD8⁺ puisse être générée à un stade tardif d'une infection grave, en dépit de l'apoptose massive des lymphocytes circulants et serait nécessaire pour la survie. En effet des individus ayant survécu à une infection par le SEBOV ont généré un profil cellulaire HLA-DR⁺ CD8⁺ plus important que les individus ayant succombé à l'infection (Baize *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2004). Ces observations ont été confirmées par une étude menée sur des souris ayant reçu une dose létale, et qui génèrent tout de même une réponse LT CD8⁺ spécifique de maEBOV en dépit de l'apoptose des cellules T. Il a été montré que cette réponse est essentielle pour l'initiation de la clairance du virus (Bradfute *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2004). Dans une autre étude, il a été possible de protéger des souris naïves contre une infection létale avec le maEBOV par un transfert adoptif de LT CD8⁺ purifiés (Bradfute *et al.*, 2008).

Le rôle des LT CD4⁺ dans le mécanisme de protection contre le virus Ebola n'est pas bien connu mais les travaux de Gupta ont permis de mettre en évidence que la virémie et la morbidité des souris infectées avec du maZEBOV augmentaient à un stade tardif de l'infection lorsque les souris étaient déplétées en lymphocytes T CD4⁺ et en cellules B, suggérant que ces deux composantes de l'immunité jouent un rôle dans le contrôle de la réplication virale à long terme (Gupta *et al.*, 2004).

ZEBOV protein	Epitope sequence	Amino acid position	Restriction
Glycoprotein	VSTGTGPGAGDFAFHK	141–155	H-2 ^d
	LYDRLASTVI	161–169	H-2 ^d
	EYLFEVDNL	231–239	H-2 ^d
	WIPYFGPAAEGIYTE	531–545	H-2 ^b
	TELRTFSI	577–584	H-2 ^k
Nucleoprotein	VYQVNNLEEIC	44–52	H-2 ^b
	GQFLFASL	148–156	H-2 ^b
	FLSFASLFL	150–159	HLA-A2.1
	RLMRTNFLI	202–210	HLA-A2.1
	SFKAALSSLA	279–287	H-2 ^d
	FQQTNAMVT	388–396	H-2 ^b
	KLTEAITAA	404–412	HLA-A2.1
	DAVLYYHMM	663–671	H-2 ^b
VP24	KFINKLDALH	159–168	H-2 ^d
	NYNGLLSSI	171–179	H-2 ^d
	PGPAKFSL	214–222	H-2 ^d
VP30	KFSKSQLSLLCETHLR	181–196	H-2 ^d
			H-2 ^b
	DLQSLIMFITAFLNI	231–245	H-2 ^d
		H-2 ^b	
VP35	CDIENNPGL	45–53	H-2 ^b
	MVAKYDHL	138–145	H-2 ^b
	TVPQSVREAFNNL	190–202	H-2 ^d
	RNIMYDHL	225–323	H-2 ^b
	PGFGTAFHQVLVQVICK	233–248	H-2 ^d
VP40	LRIGNQAFLQEFVLPP	150–165	H-2 ^b
	AFLQEFVLPPVQLPQ	160–175	H-2 ^d
	YFTFDLTALK	171–180	H-2 ^d
	TESPEKIQAI	232–241	H-2 ^d

Tableau 6 : Liste des épitopes des protéines du virus Ebola reconnus spécifiquement par les LT CD8+ cytotoxiques. (Source : (Warfield & Olinger, 2011))

Les études récentes menées sur les candidats vaccins en cours de développement ont pu mettre en évidence le rôle crucial de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL). En effet, plusieurs études ont pu montrer le caractère protecteur de la réponse CTL, par transfert passif, après une vaccination ou lors de l'étude des réponses immunitaires suite à une infection létale chez la souris (Bradfute *et al.*, 2008; Olinger *et al.*, 2005; Warfield *et al.*, 2005). Des épitopes spécifiques de CTL ont pu être prédits par informatique ou par l'utilisation de peptides synthétiques de la GP d'Ebola (tableau 6) (Wilson & Hart, 2001; Wilson *et al.*, 2000). Avec le développement de cette technologie, de plus en plus d'épitopes spécifiques de la réponse CTL sont mis en évidence dans des modèles murins spécifiques (Simmons *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2007; Takada *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2012). La connaissance de ces épitopes permet la production de peptides synthétiques spécifiques capables de restimuler *in vitro* les lymphocytes cytotoxiques spécifiques selon l'haplotype murin et par conséquent de mesurer la réponse cellulaire CD8 cytotoxique anti-Ebola.

4.2.2. La réponse immunitaire à médiation humorale

Le taux d'anticorps est généralement faible ou absent dans les cas d'infection fatale par le virus Ebola, conduisant à l'hypothèse que le titre en anticorps est corrélé à la protection vis-à-vis de l'infection. Parfois il arrive qu'une réponse humorale puisse être générée dans le cas d'infection létale à filovirus, cela pourrait simplement signifier que les anticorps générés par les individus qui ont survécu à l'épidémie seraient plus efficaces que ceux générés par les patients qui n'ont pas survécu. La réponse immunitaire humorale semble être de longue durée : une étude menée en 2007, a montré que 20 patients ayant survécu à trois épidémies différentes de ZEBOV au Gabon, entre 1996 et 2001, avaient encore, 11 années plus tard, un taux détectable d'immunoglobuline (IgG) anti-ZEBOV (Wauquier *et al.*, 2009).

De plus, le transfert de sang total de patients humains convalescents et positifs en IgG anti-GP a permis de protéger 8 patients sur 9, infectés par le ZEBOV en 1995 (alors que 20% seulement des patients non-traités ont survécu à l'infection) (Mupapa *et al.*, 1999). L'expérience n'a cependant pas été contrôlée et les patients transfusés ont reçu

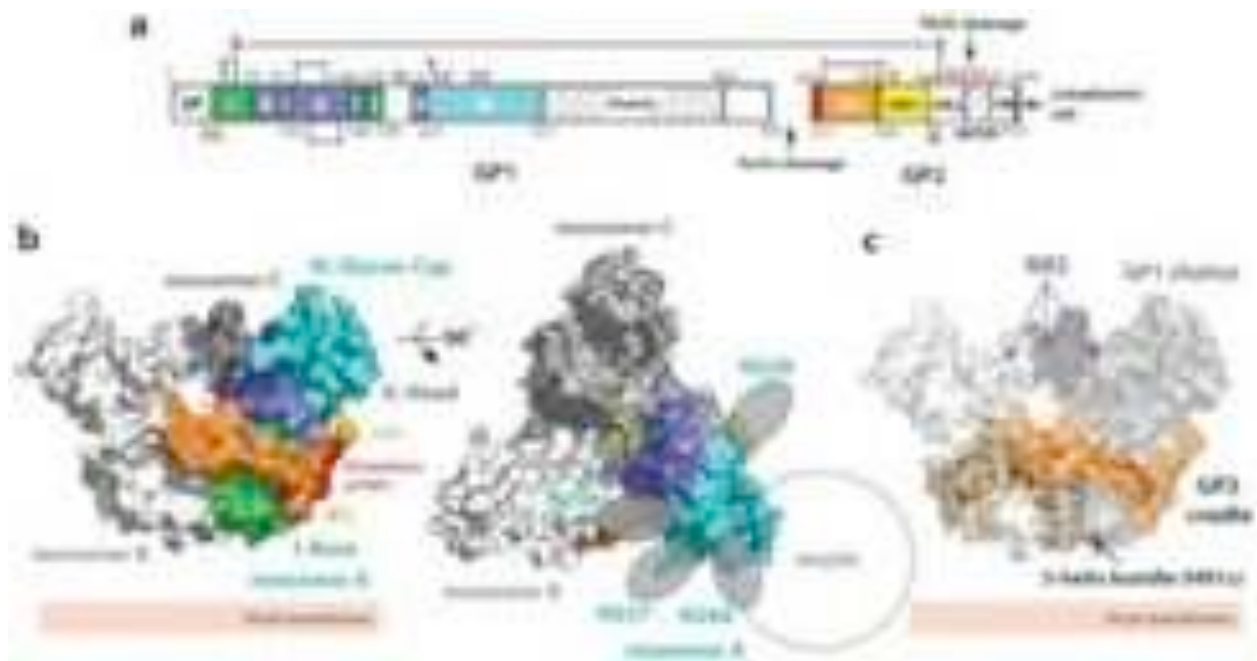


Figure 27 : Structure de la glycoprotéine d’Ebola. (a) Organisation génomique des domaines de la GP représentés (de la même couleur) sur la modélisation 3D de la GP (b). La GP d’Ebola est formé d’un trimère du complexe GP₁-GP₂. La structure 3D est représentée sous différents angles. (Source : (Lee *et al.*, 2008))

de meilleurs soins que les patients non traités, mais cela suppose tout de même que les anticorps pourraient être protecteurs contre une infection par le virus Ebola.

Un anticorps neutralisant humain, a été isolé à partir de moelle osseuse d'un survivant lors de l'épidémie de ZÉBOV en 1995. L'anticorps nommé « **KZ52** », est capable de neutraliser 90% des particules virales (Maruyama *et al.*, 1999). Il est spécifique d'une séquence de 15 résidus de la GP. Il neutralise le virus en gênant le réarrangement de la boucle de fusion empêchant ainsi les membranes virale et cellulaire de fusionner dans les endosomes. De plus, il semblerait que KZ52 en se fixant à son épitope, créerait un encombrement stérique qui cacherait le domaine de liaison au récepteur cellulaire (Lee *et al.*, 2008). Des essais de traitement avec cet anticorps ont été menés chez le primate non humain (PNH) et n'ont pas permis de protéger ces animaux en pré et post-exposition au ZÉBOV, ce qui a remis en cause l'idée d'utiliser le transfert passif d'anticorps pour traiter les patients infectés par les filovirus (Oswald *et al.*, 2007; Parren *et al.*, 2002).

Cependant une étude récente a montré qu'il était possible de protéger des PNH contre une infection létale avec différents filovirus par transfert passif d'IgG polyclonaux spécifiques du virus, obtenus à partir de singes vaccinés, ceci jusqu'à 48 heures post-infection (Dye *et al.*, 2012). Dans ces travaux, trois doses d'anticorps polyclonaux ont été administrées aux singes (à 48 heures ; 4 et 8 jours après infection), ce qui a permis de protéger 100% des macaques rhésus infectés par le virus Marburg et le ZÉBOV (souche de l'épidémie de 1995). Ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle, la survie semble corrélée à la qualité et la quantité des anticorps.

4.3. La glycoprotéine du virus Ebola, cible privilégiée du système immunitaire

La glycoprotéine d'Ebola (GP) est l'unique protéine de surface du virus Ebola. Elle est composée de deux sous-unités, GP₁ et GP₂, reliées entre elles par un pont disulfure. Elle est exprimée à la surface de la particule virale et à la surface des cellules infectées, sous la forme d'un hétérotrimère : trois complexes de GP1-GP2 (figure 27).

La GP d'Ebola joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Etant l'unique protéine de surface du virus, elle semble être la cible privilégiée du système immunitaire de l'hôte. La GP possède une région centrale hydrophile très variable entre les différentes espèces de virus Ebola. Les N-glycosylations à la surface de la GP sont

reconnues par les récepteurs de type Lectine-C présents sur de nombreuses lignées cellulaires (DC, macrophages, hépatocytes). Ces cellules deviennent alors permissives au virus et sont un site de réplication privilégié du virus. Les GP exprimées en grand nombre à la surface de la cellule infectée pourraient permettre au virus d'échapper au système antiviral de la cellule en camouflant certains de ses propres épitopes (encombrement stérique) et certaines protéines cellulaires (par exemple : CMH I et intégrine β) (Reynard *et al.*, 2009). De plus, la présence de la GP à la surface des cellules altérerait l'expression de certains marqueurs cellulaires, induisant parfois une perte d'adhérence intercellulaire qui résulterait en une désorganisation des cellules endothéliales, responsables des hémorragies caractéristiques des fièvres hémorragiques à filovirus. (Simmons *et al.*, 2002).

La sous-unité GP₂ possède une séquence nucléotidique de 26 acides aminés similaire au motif immunosuppresseur de certains rétrovirus (40% d'homologie) qui pourrait jouer un rôle dans la capacité du virus à échapper au système immunitaire de l'hôte mais le mécanisme n'est pas encore bien défini (Volchkov *et al.*, 1992).

La GP d'Ebola possède un domaine de type mucine exposé aux anticorps à la surface de la protéine. Ce domaine très glycosylé possède plusieurs épitopes reconnus par les LT CD8 cytotoxiques qui sont importants pour protéger l'hôte contre le ZEBOV (voir paragraphe 4.2.1 « la réponse immunitaire à médiation cellulaire »).

En conclusion, la GP d'Ebola joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire de l'hôte infecté et les réponses GP-spécifiques semblent les plus efficaces pour la protection contre l'infection. De nombreux chercheurs basent leur stratégie vaccinale sur l'expression de cette protéine, spécifique de son espèce (pas de protection croisée entre les différentes espèces de virus Ebola) dans le génome d'un vecteur viral, afin que celui-ci l'exprime à sa surface et stimule spécifiquement une réponse immunitaire protectrice efficace dirigée contre le virus Ebola.

5. Corrélats immuns de la protection contre l'infection par le virus Ebola

Les études pour développer un vaccin contre le virus Ebola ne peuvent pas être directement réalisées chez l'homme. La Food and Drug administration (FDA), l'homologue américain de l'EMA, a mis en place l'« **animal efficacy rule** » pour guider

les laboratoires dans leurs essais précliniques. D'après ces règles, une vaccination réussie engendre une réponse immunitaire protectrice capable de protéger l'animal contre une infection virale létale (Sullivan *et al.*, 2009). Il semblerait que les deux types de réponses, cellulaire et humorale, soient nécessaires pour la clairance du virus Ebola (Falzarano *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2009). Les études récentes sur les candidats vaccins anti-virus Ebola en cours de développement (voir le paragraphe 6 « les candidats vaccins contre le virus Ebola ») montrent que la protection fait intervenir la réponse immunitaire humorale et cellulaire (CD4⁺ et CD8⁺).

Des études menées chez le modèle murin et récemment chez le primate non humain, montreraient que la protection semble corrélée à la réponse humorale (Bradfute & Bavari, 2011). Cependant cela n'est pas toujours le cas, il arrive qu'un taux d'anticorps élevé ne résulte pas en une réponse protectrice (Warfield & Olinger, 2011); inversement des réponses protectrices n'induisent pas d'anticorps neutralisants (Sullivan *et al.*, 2009).

Finalement, d'après Sullivan, il existerait une corrélation entre le titre en anticorps (titre en immunoglobuline G) et la survie (Sullivan *et al.*, 2009) et d'après Warfield, ce serait la réponse CTL qui jouerait un rôle primordial dans la protection et notamment dans le contrôle de la réplication virale et de la clairance du virus (Warfield & Olinger, 2011). Ces données bibliographiques suggèrent qu'un vaccin efficace contre le virus Ebola devrait être un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire complète faisant intervenir toutes les composantes de l'immunité : la réponse humorale et les réponses cellulaires spécifiques (CD4⁺, CD8⁺ et CTL)

6. Les candidats vaccins contre le virus Ebola

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccins autorisés contre le virus Ebola. De nombreuses stratégies vaccinales ont été élaborées et plusieurs candidats vaccins sont encore à l'essai sur des modèles animaux.

Plusieurs études ont d'abord été réalisées sur des particules virales inactivées. Les travaux de Lupton ont montré que les cobayes pouvaient être partiellement protégés contre une infection à virus Ebola (Lupton *et al.*, 1980). L'équipe de Mikhailov a démontré que l'on pouvait obtenir une immunité protectrice chez le babouin avec des particules virales fixées au paraformaldéhyde alors que les travaux de Chepurnov n'ont

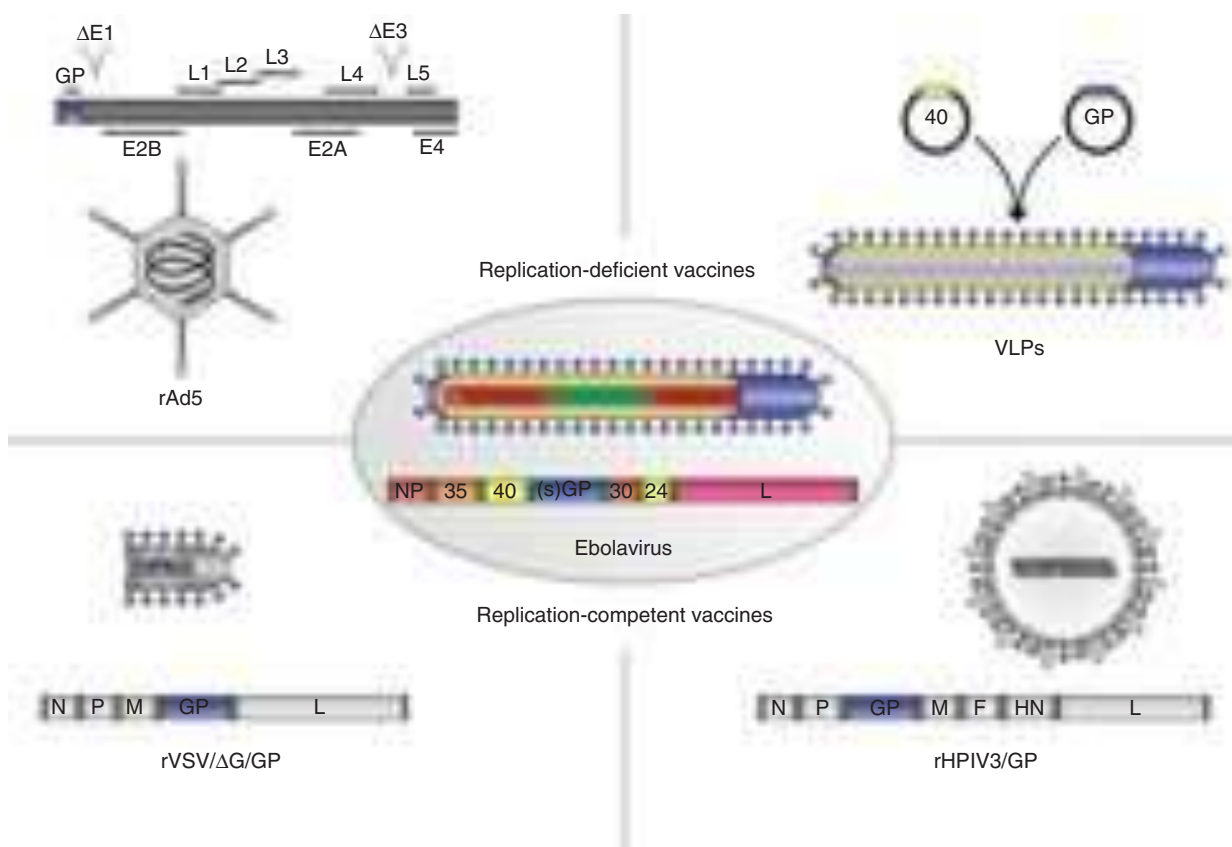


Figure 28 : Stratégies vaccinales utilisées pour les différents candidats vaccins anti-virus Ebola en cours de développement. (Source : (Hoenen *et al.*, 2012))

pas réussi à induire une immunité suffisante pour protéger les PNH, en les vaccinant avec du virus inactivé par gamma-irradiation (Geisbert *et al.*, 2010).

L'idée d'utiliser du virus atténué comme candidat vaccin est restée à l'état de «preuve de concept» (Bray *et al.*, 1998), le risque que le virus mute et redevienne pathogène pour l'homme étant trop grand pour être utilisé comme traitement chez l'homme (Volchkov *et al.*, 2001). Dans l'espoir d'amplifier les réponses immunitaires humorales et cellulaires chez un modèle animal, des liposomes encapsulés ont été utilisés comme système de libération de la particule inactivée mais la stratégie a échoué, ceux-ci ne protégeant pas le PNH contre un challenge léthal (Geisbert *et al.*, 2002a; Rao *et al.*, 2002). Aujourd'hui, toutes ces stratégies ont été abandonnées.

Les recherches se portent désormais, sur l'utilisation de pseudo-particules virales et sur l'utilisation de vecteurs viraux recombinants exprimant une ou plusieurs protéines virales du virus Ebola, principalement la glycoprotéine. Les vecteurs viraux concernent des virus recombinants non pathogènes ou non répliquatifs, tels que le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus parainfluenza humain de type 3 ou l'adénovirus humain de sérotype 5.

6.1. Le vecteur virus de la stomatite vésiculeuse

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) fut utilisé pour la première fois comme vecteur viral vaccinal par l'équipe de Roberts dans le but de développer un vaccin antigrippal (Roberts *et al.*, 1999).

Il s'agit du virus prototype de la famille des *Rhabdoviridae*. Le VSV possède de nombreuses caractéristiques favorables en tant que vecteur d'expression et vecteur vaccinal, telles qu'une facilité à se répliquer dans la plupart des cellules de mammifères, la possibilité d'induire une forte réponse humorale *in vivo*, la capacité d'induire à la fois une immunité systémique et une immunité mucoale.

Un VSV recombinant capable de se répliquer en cellules humaines a été développé pour la vaccination anti-Ebola. Pour exprimer la GP d'Ebola, le gène de la protéine G de surface a été remplacé par le gène de la GP de ZEBOV : VSV-GP (figure 28). Une étude de Jones a montré que 100% des PNH vaccinés avec une dose de 10^7 particules virales de ce candidat vaccin étaient protégés contre un challenge léthal (Jones

et al., 2005), en induisant une augmentation modérée des IgG EGP-spécifiques et une forte réponse cellulaire sécrétrice d'IFN γ et de TNF α .

Différentes voies d'inoculation peuvent être utilisées pour la vaccination, conférant une protection complète de l'animal (Qiu *et al.*, 2009). De plus, le VSV-GP protège le PNH à 100% contre un challenge aérosol avec du ZEBOV, qui serait potentiellement la voie d'infection privilégiée pour une attaque bioterroriste (Geisbert *et al.*, 2008).

Le VSV-GP a aussi été testé pour une utilisation en post-exposition, lors d'une étude de Feldmann (Feldmann *et al.*, 2007). La vaccination est efficace à 100% jusqu'à 24 heures post-infection chez la souris, permet la protection de 50% des PNH et 83% des cobayes, vaccinés 20 à 30 minutes après inoculation du ZEBOV ; ce qui correspond au temps de réaction lors d'un accident de laboratoire (Geisbert *et al.*, 2008). Ce candidat vaccin a d'ailleurs été récemment utilisé en Allemagne sur un chercheur suite à une exposition accidentelle au ZEBOV (Gunther *et al.*, 2011). Le vaccin en cours d'étude a été administré 48h après que la jeune femme se soit piquée avec l'aiguille d'une seringue contenant du ZEBOV. Une légère virémie de VSV recombinant, de la fièvre et une myalgie ont pu être observées dans les 48 heures suivant la vaccination. Aucun acide nucléique de ZEBOV n'a été détecté par PCR en temps réel, cette absence de virémie rendant impossible la confirmation de l'infection de la jeune femme avec le ZEBOV.

La population africaine est touchée de façon récurrente par des épidémies dues à différentes souches de filovirus. Pour protéger la population, un vaccin multivalent en une seule injection serait intéressant. Une étude menée par Geisbert en 2009 a montré que des PNH vaccinés avec une dose équivalente de VSV recombinant exprimant la GP de ZEBOV, de SEBOV ou de CIEBOV étaient protégés contre un challenge avec ces trois virus 28 jours après vaccination (Geisbert *et al.*, 2009). Une autre étude menée chez la souris a mis en évidence une protection croisée entre deux espèces de virus Ebola, ZEBOV et BEBOV (Hensley *et al.*, 2010). Ces résultats sont plutôt encourageants dans l'optique de construire un vaccin multivalent.

Le principal obstacle à l'utilisation d'un tel vecteur est sa capacité à se répliquer et donc à se transmettre à d'autres individus sensibles au VSV ou aux animaux

domestiques. L'infection humaine par le VSV est rare et n'est pas spécifiquement associée à une maladie grave bien que des cas d'encéphalites associées au VSV ont été rapportés (Gaidamovich *et al.*, 1966; Quiroz *et al.*, 1988; Reif *et al.*, 1987). Dans le but d'évaluer la pathogénicité du virus atténué réplcatif, le candidat vaccin VSV-GP a été testé sur des PNH immunodéprimés (infectés par le virus de l'immunodéficience simien) et n'a entraîné aucun effet secondaire. VSV-GP a induit une réponse immunitaire protectrice efficace contre un challenge léthal avec du ZEBOV (Geisbert *et al.*, 2008). Curieusement, la protection observée chez le primate non humain semble dépendre de la réponse CD4⁺ plutôt que du titre en anticorps anti-GP ZEBOV (Geisbert *et al.*, 2008). Ce vecteur a été inoculé en intracérébral chez des PNH et n'a induit aucune neurovirulence (pas de lésion sur les coupes histologiques de tissus nerveux) contrairement à l'infection avec le VSV parental non modifié (Mire *et al.*, 2012).

6.2. Le vecteur adénovirus humain de sérotype 5

Il s'agit d'un vecteur viral qui a été très utilisé en thérapie génique expérimentale (Hitt & Gauldie, 2000). Les adénovirus possèdent un tropisme cellulaire large et sont capables d'induire à la fois une réponse immunitaire innée et une réponse immunitaire adaptative chez les mammifères. Les adénovirus sont responsables d'infections respiratoires bénignes, de gastroentérites et de conjonctivites. A l'heure actuelle, un seul cas de décès a été recensé en 1999, suite à l'inoculation de vecteurs adénovirus. Malgré cet accident, l'intérêt pour ces vecteurs est resté important et les efforts se sont concentrés sur le développement d'un vecteur de faible toxicité.

L'adénovirus humain de sérotype 5 atténué non réplcatif est le plus commun. Il peut être délété de différents gènes :

- E1 (dans tous les vecteurs) : région essentielle à la régulation de la transcription et à la réplication du virus.
- E3 (dans certains vecteurs) : gène non-essentiel à la réplication de l'adénovirus. Son locus est utilisé pour l'insertion de gène exogène.
- E4 (en *trans* pour la production de virus recombinants) : région qui peut parfois être délétée pour augmenter la capacité du virus à intégrer un gène exogène et réduire la réponse immunitaire de l'hôte (*in vivo*).

Dans le cadre de la vaccination anti-Ebola, un AdHu5 recombinant a été développé, dans lequel EGP a été clonée (Figure 28).

Il est possible de protéger le PNH avec ce candidat vaccin mais plus de six mois sont nécessaires pour obtenir une immunisation complète et le taux d'anticorps est faible. Pour accélérer l'obtention de la protection complète chez le PNH et la réduire à quatre semaines post-vaccination, l'idée était de combiner une vaccination avec un ADN et une vaccination avec un AdHu5 (à 60 jours d'intervalle) (Sullivan *et al.*, 2006). Une dose importante de 1×10^{10} particules virales est alors nécessaire pour obtenir une réponse complète. Des études chez la souris ont été menées pour tenter d'améliorer le système d'expression de la protéine afin de pouvoir diminuer la dose à inoculer (Richardson *et al.*, 2009).

L'AdHu5 a aussi été utilisé dans le but de faire un candidat vaccin multivalent contre différentes espèces de virus Ebola, ZEBOV et SEBOV, dans lequel les GP des virus ont été clonées. Les PNH ont pu être protégés après deux injections du candidat vaccin à 60 ou 120 jours d'intervalle. Les animaux étaient protégés à 100% contre les deux espèces de virus (Pratt *et al.*, 2010). Dans une autre étude, une protection croisée contre une troisième espèce de virus Ebola, BEBOV, a pu être observée chez des PNH vaccinés avec un ADN exprimant la GP de ZEBOV et la GP de SEBOV (4 injections à 0 ; 4 ; 8 et 14 semaines) en intramusculaire suivi d'une injection, un an plus tard, de 10^{11} particules virales d'AdHu5 exprimant la GP de ZEBOV (Hensley *et al.*, 2010).

Un candidat vaccin AdHu5 codant pour des GP de ZEBOV et SEBOV mutées ponctuellement au niveau du résidu 71 (E71D = mutation réduisant la cytotoxicité induite par la GP) est actuellement en cours d'essai clinique de phase I, chez des patients sains. Cet AdHu5 n'induit pas d'effet secondaire chez l'homme et génère des réponses humorales et cellulaires spécifiques chez 25 à 45% des sujets vaccinés (Ledgerwood *et al.*, 2010).

Le principal obstacle à l'utilisation de l'AdHu5 comme vecteur vaccinal est l'immunité préexistante chez certains individus (60% de la population générale et surtout jusqu'à 85% en Afrique) se traduisant lors de l'essai clinique par un faible taux d'anticorps et par conséquent limitant considérablement son immunogénicité. Ce problème pourrait être contourné en injectant des doses plus fortes d'AdHu5-GP mais il existe un risque de toxicité pour l'homme.

Les tentatives actuelles pour contourner cet obstacle majeur sont :

- d'utiliser un autre sérotype beaucoup moins fréquent dans la population de manière à ce qu'il n'y ait pas d'immunité préexistante chez l'homme : adénovirus de sérotype 26 ou 35 (Geisbert *et al.*, 2011).
- de modifier la voie d'administration et le nombre d'inoculations (Croyle *et al.*, 2008).
- de développer un adénovirus qui ne soit pas d'origine humaine (adénovirus de chimpanzé) (Kobinger *et al.*, 2006).

6.3. Le vecteur virus parainfluenza humain de type 3

Le virus parainfluenza humain de type 3 (HPIV3) est un membre de la famille des *Paramyxoviridae*. Il s'agit d'un pathogène commun du système respiratoire infantile. Il se réplique dans le tractus respiratoire où il induit une stimulation directe de l'immunité muqueuse en plus d'induire une réponse immunitaire systémique forte. Il s'agit d'un bon candidat vaccin pour une infection virale via le tissu muqueux.

Une forme atténuée du HPIV3 est en cours de développement et pourrait être utilisée en tant que vaccin contre le HPIV3 (essai clinique de phase 1/2) et contre d'autres maladies respiratoires infantiles tels que le virus parainfluenza humain de type 2 (HPIV2), le virus respiratoire syncytial (RSV), la rougeole (Bailly *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Skiadopoulos *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2001). Il s'agit d'un candidat non pathogène en raison de son tropisme pour les cellules épithéliales superficielles du tractus respiratoire : il ne se propage pas de façon significative au-delà de ce site.

Les travaux de Bukreyev ont récemment permis de développer un vecteur HPIV3 exprimant la GP de ZEBOV (HPIV3-GP) et un vecteur exprimant la GP et la nucléoprotéine (NP) de ZEBOV (HPIV-GP+NP) (figure 28). Dans ces conditions, la présence de la GP modifie légèrement la cytopathologie induite par le virus (50-70% des cellules infectées sont arrondies alors que le virus témoin forme un syncytium en plus de quelques cellules arrondies) ainsi que l'efficacité de la réplication (augmentation du nombre de plages de lyse) (Bukreyev *et al.*, 2006). Au cours de cette étude, il a pu montrer qu'une dose de HPIV3-GP ou de HPIV3-GP+NP est suffisante pour protéger 100% des cobayes vaccinés avec l'une de ces deux constructions, contre une épreuve létale avec le ZEBOV adapté au cobaye. Dans une autre étude, il a aussi montré que HPIV3-GP induisait une protection de 100% des singes après deux vaccinations, en

intranasal et en intratrachéal, de 2×10^7 particules virales à 28 jours d'intervalle (Bukreyev *et al.*, 2007).

Le problème de cette stratégie était l'immunité résiduelle chez l'homme : tous les adultes possèdent une immunité contre le HPIV3 par lequel ils ont été infectés au moins une fois pendant leur enfance, ce qui pourrait atténuer considérablement la réponse immunitaire anti-ZEBOV et donc son efficacité. Burkreyev et son équipe ont alors développé un nouveau clone de HPIV3, délété des gènes HN (hémagglutinine-neuraminidase, qui se lie au récepteur cellulaire au cours de l'attachement du virus à la cellule) et F (responsable de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire), qui codent pour des protéines de surface : HPIV3/ Δ HN-F/GP. La glycoprotéine d'Ebola est alors la seule protéine de surface du virus recombinant. Ce nouveau candidat vaccin a été testé chez le cobaye et induit une protection de 100% des animaux contre une épreuve létale avec une seule vaccination par 4×10^6 particules virales (Bukreyev *et al.*, 2009).

De plus, Bukreyev et son équipe, ont récemment démontré que la vaccination de PNH avec deux doses du candidat HPIV3/ Δ HN-F/GP alors qu'ils avaient été infectés au préalable avec HPIV3, induit des réponses immunitaires humorales similaires à celles observées chez les singes naïfs pour HPIV3. Ce qui montre que ce candidat vaccin est immunogène, en dépit d'une immunité préexistante contre le vecteur viral. Cependant aucune donnée n'est précisée sur l'efficacité de la protection des PNH contre un challenge (Bukreyev *et al.*, 2010).

Enfin, la nature répliquative de ce candidat pourrait tout de même poser des problèmes de pathogénicité chez l'homme.

6.4. Les pseudo-particules virales

Les pseudo-particules virales (VLP) sont des particules virales sans génome (des pseudo-virions) obtenus par l'assemblage spontané de protéines de la capsid d'un virus. Il s'agit de sous-unités spécifiques du virus qui imitent structurellement le virion mais qui ne contiennent pas de matériel génétique et par conséquent, devraient être plus sûres que la plupart des vecteurs viraux. Les VLP sont obtenues par expression des gènes correspondants en levures recombinantes ou par l'intermédiaire d'un baculovirus recombinant. Il n'y a pas de risque de réversion du virion contrairement aux vaccins atténués.

Les VLP peuvent présenter les antigènes viraux à la surface de la particule non infectieuse sous une conformation présumée native. Cette stratégie est actuellement utilisée pour plus de trente virus différents, dont le virus Ebola.

Différentes stratégies ont été élaborées pour améliorer la production de VLP : expression en cellules eucaryotes, cellules d'insectes, dérivé de plantes, assemblage chimique. La production en cellules d'insectes est l'une des méthodes mises au point par GSK (GlaxoSmithKline) pour un vaccin VLP-HPV (papilloma virus) bivalent possédant une autorisation de mise sur le marché en Europe depuis 2007 et depuis 2009 aux Etats-Unis (Cervarix®).

L'auto-assemblage chimique est utilisé par Merck pour leur vaccin VLP-HPV tétravalent qui s'est avéré être très protecteur et immunogène lors d'essais cliniques chez l'homme. Il possède une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en Europe depuis 2006 (Gardasil®).

Ces vaccins VLP-HPV ciblent jusqu'à 4 génotypes différents parmi les centaines de génotypes HPV existant, ce qui signifie que les VLP pourraient aussi être utilisées comme vaccin multivalent contre différentes espèces de filovirus.

La formation de VLP pour vacciner contre EBOV requiert au minimum l'expression de la protéine de matrice VP40. Il est possible d'introduire d'autres protéines dans cette pseudo-particule telles que GP ou NP, ce qui semble améliorer le relargage des VLP lors de l'étape de bourgeonnement des pseudo-virions au niveau de la surface cellulaire (Figure 28). Une protection complète a pu être observée lors d'une étude chez la souris, après 2 injections de VLP (VP40+GP) ou une injection de VLP complétement par l'adjuvant QS-21 (dérivé de la saponine), contre un challenge léthal avec le maZEBOV (Warfield *et al.*, 2005). Dans cette étude, le candidat vaccin génère une réponse T-CD4⁺ et T-CD8⁺ spécifique de GP et VP40 ainsi qu'une réponse humorale spécifique chez la souris (Warfield *et al.*, 2005).

Dans une autre étude, des cynomolgus ont été vaccinés par 3 injections de VLP en intramusculaire à 42 jours d'intervalle (VP40+ EGP+NP+ un adjuvant : RIBI) et ont pu être complètement protégés contre un challenge léthal quatre semaines après la dernière injection. De plus, la vaccination n'a engendré aucun signe clinique chez les animaux (Warfield *et al.*, 2005) alors que les animaux témoins ont développé de la fièvre dès le 4^{ème} et 5^{ème} jour et sont décédés dès le 6^{ème} jour post-infection. Des anticorps ont été

déTECTÉS dès la première vaccination et le titre a atteint un plateau après la deuxième inoculation. Cependant un titre modeste d'anticorps neutralisant a été observé : 20 à 160 (inverse de la dilution). Des réponses CD8⁺ cytotoxiques dirigées contre la GP et la nucléoprotéine (NP) d'Ebola ont pu aussi être détectées après restimulation des lymphocytes avec des peptides synthétiques (Warfield *et al.*, 2007).

Afin d'industrialiser la production de VLP tout en respectant les bonnes pratiques de fabrication, les candidats vaccins sont désormais produits en cellules d'insectes (alors qu'elles l'étaient sur cellules rénales d'embryon humain (HEK 293T) jusqu'à présent). Ces nouvelles VLP ont été testées sur un modèle murin et protègent l'animal contre un challenge létal (Sun *et al.*, 2009).

En conclusion, la mise au point de nouveaux vaccins contre le virus Ebola a fait des progrès considérables. Plusieurs candidats vaccins anti-Ebola sont en cours d'étude chez l'animal et donnent de bons résultats. Tous semblent effectivement prometteurs. Certains sont même en cours d'essai clinique de phase I chez l'homme comme le candidat vaccin AdHu5 qui est bien toléré par les personnes à qui il a été administré. Cependant, il induirait des réponses cellulaires relativement faibles, ce qui pourrait ne pas permettre une protection efficace chez l'homme contre une infection létale à virus Ebola (Sullivan *et al.*, 2009; Warfield & Olinger, 2011).

Les candidats vaccins développés à partir de vecteurs viraux réplikatifs sont en cours d'évaluation en ce qui concerne leur efficacité chez le PNH. Leur innocuité et leur immunogénicité ne sont pas complètement évalués chez le PNH, ils ne peuvent être testés chez l'homme pour le moment.

Un vaccin développé à partir de pseudo-particules virales (VLP) semblerait sûr puisque les VLP ne sont pas infectieuses mais la mise en place de la réponse immunitaire induite par les VLP nécessite un délai trop long pour que ce candidat vaccin soit efficace dans le scénario d'une attaque bioterroriste. De plus, pour que ce candidat vaccin soit aussi immunogène que les autres candidats en cours de développement, de grandes quantités de VLP doivent être administrées (10^{10} particules), nécessitant une production importante et coûteuse. Enfin, nous ne possédons pas assez de recul sur ces VLP pour être sûr que leur inoculation ne soit pas sans danger et qu'il n'y ait pas un risque que de l'information génétique virale hétérologue soit encapsidée dans la VLP.

Concernant les candidats HPIV3 et AdHu5, l'homme possède naturellement une immunité contre ces vecteurs viraux, ce qui pourrait réduire leur efficacité. Pour le virus HPIV3, des mutations génétiques permettraient de contourner ce problème chez le PNH pré-immunisé artificiellement. Des doses plus importantes de virus peuvent également contourner le problème de la séroprévalence contre le vecteur viral, comme c'est le cas pour le vecteur viral AdHu5, mais cela implique d'inoculer des très fortes doses de virus aux sujets vaccinés, avec des risques réactogènes plus élevés.

Finalement, le candidat VSV-GP semble le plus intéressant : il induit une protection partielle du PNH en une seule inoculation même lorsqu'il est injecté en post-exposition et il est bien toléré par les singes immunocompétents et immunodéprimés. Cependant, il a été montré que la GP d'Ebola modifie légèrement le tropisme cellulaire du vecteur viral (Bukreyev *et al.*, 2006) : il existe donc un risque que le VSV (virus connu

pour être zoonotique) développe un tropisme pour les cellules neuronales humaines ou qu'il puisse être disséminé à des sujets proches ou aux animaux (en milieu rural), du fait qu'il s'agisse d'un virus répliatif.

Les épidémies sporadiques en Afrique sont dues à une proximité des habitants avec des animaux sauvages infectés. La vaccination de ces animaux pourrait être une solution pour limiter ces épidémies mais le candidat VSV (le seul nécessitant une seule dose pour être efficace) n'est pas la plateforme adéquate pour cette vaccination du fait qu'il est un pathogène animal. Actuellement un vaccin bivalent est en cours de développement contre la rage et le virus Ebola (Blaney *et al.*, 2011; Papaneri *et al.*, 2012). Les études sur ce candidat menées chez la souris montrent qu'il n'induit pas de neurovirulence et permet de protéger l'animal contre une infection létale avec le virus Ebola, après seulement une seule inoculation. Son mode d'administration ne pose pas de problème, il a largement été utilisé pour vacciner les animaux sauvages contre la rage en Europe et aux Etats-Unis. Cette plateforme semble donc intéressante pour vacciner les animaux sauvages mais ce candidat vaccin n'a pas encore été testé chez le PNH.

Chapitre III :

PARTIE EXPERIMENTALE

Contexte des travaux de thèse

La variole a été un véritable fléau pour l'humanité, tuant plusieurs centaines de millions de personnes sur tous les continents au cours des siècles. Il n'existe pas de traitement efficace et la vaccination antivariolique a été arrêtée quelques années après l'annonce de l'éradication de la maladie par l'OMS, en 1980. Aujourd'hui une grande partie de la population n'est pas immunisée contre la variole et nombreux sont ceux qui présenteraient des contre-indications à la vaccination.

L'utilisation de la variole en tant qu'arme biologique est à craindre. Cette inquiétude s'est intensifiée après la découverte d'un programme soviétique de militarisation de cet agent biologique, durant la guerre froide, le rendant disponible à des groupes terroristes.

Une utilisation de la variole aurait de graves conséquences et les épidémies deviendraient vite incontrôlables, se répandant sur tous les continents par le biais des transports aériens. Le développement de nouveaux vaccins est donc une des priorités de l'OMS concernant la recherche sur la variole.

Un autre virus est aussi à redouter dans un contexte de bioterrorisme : le virus Ebola. Il est l'agent étiologique d'une fièvre hémorragique sévère accompagnée d'une défaillance progressive de tous les organes entraînant la mort en moins de deux semaines de l'hôte infecté, dans les cas les plus graves. La maladie sévit essentiellement en Afrique équatoriale et est fatale jusque dans 90% des cas pour certaines épidémies. Le réservoir naturel du virus n'est pas clairement connu, cependant les chauves-souris pourraient être impliquées dans ce rôle.

Il n'existe aujourd'hui aucune prophylaxie et aucun traitement contre ce virus. En outre, la possibilité qu'il puisse être utilisé comme arme biologique rend le développement de contre-mesures médicales nécessaire.

Une des stratégies mise en place pour développer un vaccin contre ce virus a été l'utilisation d'un vecteur viral exprimant la GP du virus Ebola. Ainsi, plusieurs virus recombinants contenant la GP sont en cours d'étude, mais aucun n'est autorisé par les autorités de santé.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse a été de développer de nouveaux candidats vaccins antivarioliques et anti-Ebola.

La première partie de ce travail a consisté à caractériser plusieurs candidats vaccins antivarioliques développés à l'IRBA et pour lesquels un brevet a été déposé. Après cette caractérisation, un candidat a été choisi sur la base de son atténuation et de son efficacité de protection contre une infection à poxvirus. Ce virus de la vaccine est vivant et atténué. Il dérive de la souche Lister qui a fait ses preuves lors de l'éradication de la variole. Dans ce travail, nous avons caractérisé l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de plusieurs candidats vaccins produits par délétion d'une ou plusieurs régions génomiques non essentielles pour le virus, chez différents modèles murins.

La deuxième partie de ce travail porte sur le développement d'un candidat vaccin anti-virus Ebola afin de répondre à la demande de l'OMS sur la recherche de contre-mesures médicales contre les fièvres hémorragiques. Pour cela, nous avons utilisé le candidat vaccin décrit dans la première partie de ces résultats comme vecteur viral, les orthopoxvirus étant connus pour leur particularité à pouvoir intégrer des gènes hétérologues dans leur génome et à les exprimer comme s'il s'agissait de l'une de leurs protéines. Nous avons cloné le gène de la glycoprotéine de surface du virus Ebola dans le génome du virus de la vaccine atténué. Nous avons ensuite caractérisé le candidat vaccin bivalent en culture cellulaire pour l'expression de la GP d'Ebola puis chez un modèle murin immunodéprimé nous avons évalué l'innocuité du virus recombinant et enfin chez un modèle immunocompétent nous avons évalué l'immunogénicité du candidat vaccin, vis-à-vis du virus Ebola et du virus de la vaccine.

1. Développement et caractérisation d'un nouveau candidat vaccin antivariolique atténué

1.1. Introduction

Le virus de la vaccine souche Lister a été utilisé comme vaccin antivariolique pendant la campagne de vaccination antivariolique qui a conduit à l'éradication de la variole, déclarée officiellement en 1980 par l'OMS. La vaccination fut donc arrêtée. Mais par crainte du bioterrorisme, la recherche de nouveaux vaccins antivarioliques s'est intensifiée pour répondre aux exigences de l'OMS.

De nouveaux vaccins antivarioliques ont été développés ces dernières années ; les deux plus avancés utilisent la souche atténuée MVA. Cette souche virale, non répliquative chez l'homme, a l'avantage sur les vaccins traditionnels de 1^{ère} génération, d'avoir une bonne innocuité. En effet, après vaccination, il n'est pas observé de complications qui étaient rapportées avec le vaccin de 1^{ère} génération et notamment les plus sévères : *eczema vaccinatum*, *vaccinia necrosum* et encéphalites post-vaccinales. Cependant, ce type de vaccin (« ACAM 3000 », « IMVAMUNE ») a l'inconvénient d'être faiblement immunogène ; en effet une dose 1000 fois supérieure à celle du vaccin historique et au moins un rappel 28 jours après la première injection, conduisent le plus souvent à des réponses immunitaires humorales et cellulaires plus faibles que celles obtenues avec le vaccin de 1^{ère} génération (von Krempelhuber *et al.*, 2010; Wilck *et al.*, 2010).

D'autre part, la souche MVA n'ayant jamais été utilisée au cours de l'éradication de la variole, il n'est pas sûr qu'à des doses élevées elle soit efficace contre la variole chez l'homme.

Dans ce contexte, il semblait que le vaccin antivariolique idéal pourrait être constitué d'une souche virale ayant montré son efficacité au cours de l'éradication, mais ayant une innocuité proche de celle de la souche MVA. C'est ce type de candidat vaccin que nous avons essayé de développer dans la première partie de ce travail.

L'unité de virologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées avait étudié le vaccin antivariolique souche Lister et isolé un clone de la population polyclonale, pour ses caractéristiques génétiques et phénotypiques (Garcel *et al.*, 2007;

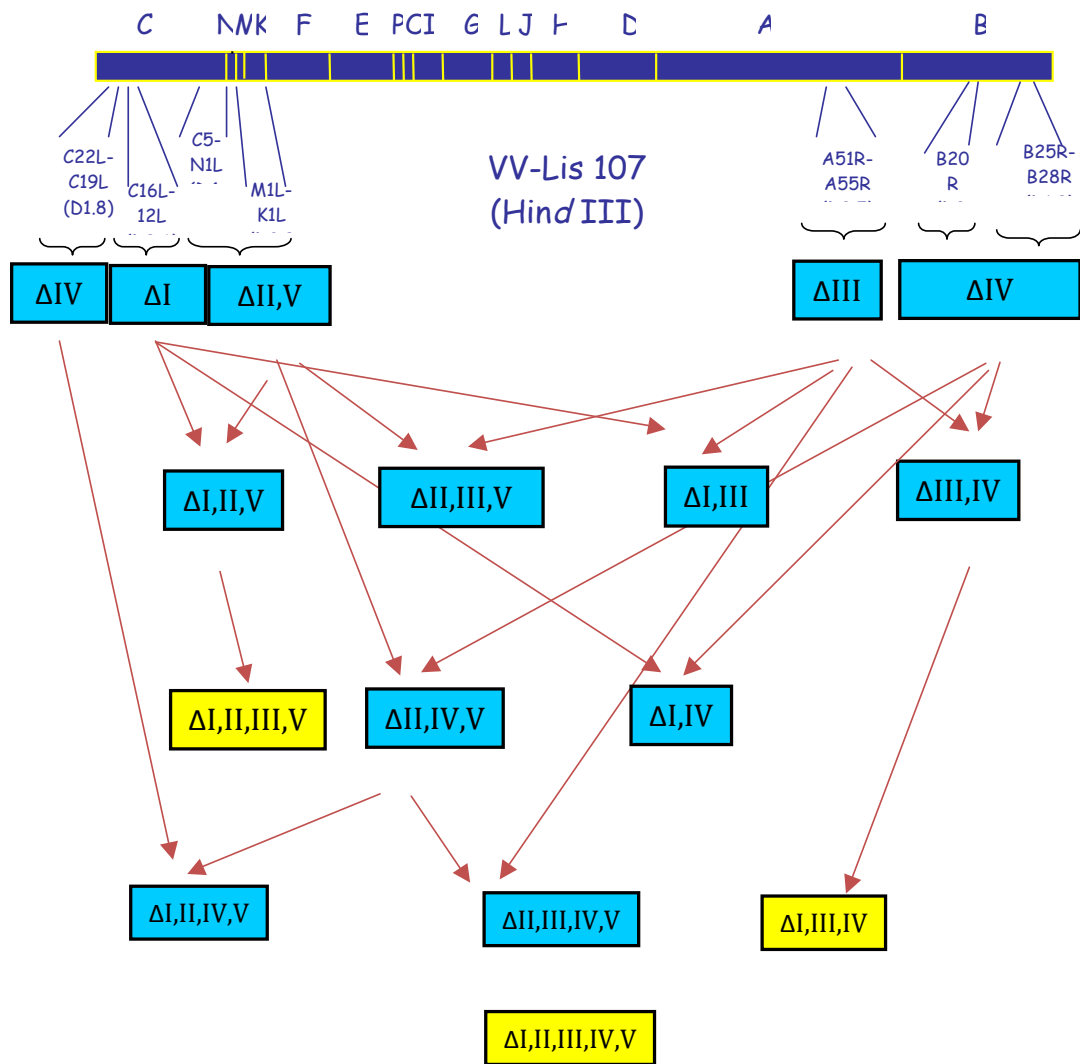


Figure 29 : Représentation schématique des délétions ciblées du virus clonal VV-Lis 107

Garcel *et al.*, 2008). Le clone, nommé VAC-Lis 107, est celui dont le comportement est le plus proche de celui de la population vaccinale de la souche Lister non clonée.

Afin d'augmenter l'atténuation de ce clone, la stratégie choisie a été de reproduire dans le génome de VACV-Lis 107, les délétions de régions génomiques du génome de la souche virale MVA (Meyer *et al.*, 1991), susceptibles d'être à l'origine de son atténuation.

Six délétions sont bien décrites chez MVA. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'impact d'une ou de plusieurs délétions (jusqu'à cinq) dans le génome du clone 107 (figure 29) et d'observer les effets sur la réplication, l'innocuité et l'efficacité vaccinale de ces virus mutants.

Les résultats sont présentés dans l'article ci-après.

1.2. Résultats expérimentaux

Les résultats obtenus avec les différents virus mutants ont été publiés dans l'article suivant :

Julie Dimier, Audrey Ferrier-Rembert, Karine Pradeau-Aubreton, Matthias Hebben, Danièle Spehner, Anne-Laure Favier, Danielle Gratier, Daniel Garin, Jean-Marc Crance, et Robert Drillien

Journal of Virology, mai 2011 – vol 85(10) ; p 5016-5026

Deletion of Major Nonessential Genomic Regions in the Vaccinia Virus Lister Strain Enhances Attenuation without Altering Vaccine Efficacy in Mice[∇]

Julie Dimier,¹ Audrey Ferrier-Rembert,¹ Karine Pradeau-Aubreton,² Matthias Hebben,^{2†}
Danièle Spehner,² Anne-Laure Favier,¹ Danielle Gratier,¹ Daniel Garin,¹
Jean-Marc Crance,^{1*} and Robert Drillien^{2*}

Unité de Virologie, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées Emile Pardé, IRBA, La Tronche, France,¹ and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Strasbourg, France²

Received 11 November 2010/Accepted 22 February 2011

The vaccinia virus (VACV) Lister strain was one of the vaccine strains that enabled smallpox eradication. Although the strain is most often harmless, there have been numerous incidents of mild to life-threatening accidents with this strain and others. In an attempt to further attenuate the Lister strain, we investigated the role of 5 genomic regions known to be deleted in the modified VACV Ankara (MVA) genome in virulence in immunodeficient mice, immunogenicity in immunocompetent mice, and vaccine efficacy in a cowpox virus challenge model. Lister mutants were constructed so as to delete each of the 5 regions or various combinations of these regions. All of the mutants replicated efficiently in tissue culture except region I mutants, which multiplied more poorly in human cells than the parental strain. Mutants with single deletions were not attenuated or only moderately so in athymic nude mice. Mutants with multiple deletions were more highly attenuated than those with single deletions. Deleting regions II, III, and V together resulted in total attenuation for nude mice and partial attenuation for SCID mice. In immunocompetent mice, the Lister deletion mutants induced VACV specific humoral responses equivalent to those of the parental strain but in some cases lower cell-mediated immune responses. All of the highly attenuated mutants protected mice from a severe cowpox virus challenge at low vaccine doses. The data suggest that several of the Lister mutants combining multiple deletions could be used in smallpox vaccination or as live virus vectors at doses equivalent to those used for the traditional vaccine while displaying increased safety.

Vaccinia virus (VACV) has displayed extraordinary efficacy as a live attenuated vaccine since it has enabled the eradication of smallpox, one of the most deadly infectious diseases for mankind. Although smallpox vaccination is no longer routinely employed, some countries continue to vaccinate selected populations because of the fear of biological warfare or bioterrorism. During the course of their use, the smallpox vaccines were responsible for numerous vaccine-associated accidents like eczema vaccinatum and progressive vaccinia in individuals with immune deficiencies or skin disorders. Encephalitis was also long recognized as a very serious vaccine-related risk with an unknown predisposition (35), and vaccine-induced myopericarditis has been documented as an adverse event (27, 32). It is therefore not surprising that a good deal of research has been devoted to designing strategies that reduce the risks associated with smallpox vaccination (52). Further attenuation of the smallpox vaccine has also been sought because VACV is an attractive live virus vector for vaccination against infectious

diseases and displays promising activity as a vector for prophylaxis and therapy of cancer (25).

Modified vaccinia virus Ankara (MVA) was one of the first VACV strains shown to be highly attenuated in small-animal models and safe in human trials (42, 66). MVA was isolated during the 1960s from the chorioallantois vaccinia virus Ankara strain (CVA) by extensive serial passage in chicken embryo fibroblasts, a process which entailed 6 major deletions as well as numerous smaller deletions and point mutations within 122 of the 195 open reading frames (ORFs) (4, 45, 50). One of the outstanding properties of MVA is its failure to multiply in most mammalian cells, particularly human cells. Studies in HeLa cells have shown that MVA infection is followed by a nearly complete virus life cycle up to the accumulation of immature (68) or aberrant (63) viral particles and the release of a few aberrant enveloped viral particles (44). This abortive virus life cycle is clearly sufficient to immunize mice against a variety of orthopoxvirus challenge infections, to vaccinate non-human primates against severe monkeypox virus infection (14, 15, 67), and to induce a VACV-like immune response in human volunteers (71). In most studies which have evaluated MVA as a vaccine against challenge orthopoxvirus infections, it has displayed efficacy only at much higher doses than the traditional smallpox vaccine (7, 14, 20, 75) (with one surprising exception [56]), in keeping with the fact that MVA is unable to propagate at the site of inoculation and large virus doses are well tolerated. Such high doses have even been shown to have

* Corresponding author. Mailing address for Jean-Marc Crance: Unité de Virologie, IRBA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, La Tronche, France. Phone: (33) 4 76 63 69 16. Fax: (33) 4 76 63 69 06. E-mail: jmcrance@crssa.net. Mailing address for Robert Drillien: IGBMC 1 rue Laurent Fries, BP10142, Illkirch 67404, France. Phone: (33) 3 88 65 57 46. Fax: (33) 3 88 65 32 01. E-mail: drillien@igbmc.fr.
† Present address: Vivalis, 6 rue Alain Bombard, Saint-Herblain, 44800 Nantes, France.

[∇] Published ahead of print on 2 March 2011.

the added advantage of inducing a more rapid immune response than traditional smallpox vaccines (15, 55, 62, 65).

In view of the very promising behavior of MVA as a highly attenuated smallpox vaccine as well as a vaccine vector, it is important to gain a full understanding of the molecular basis of its attenuation and vaccine efficacy. Clearly the failure of MVA to multiply in most mammalian cells is one essential feature that explains *in vivo* attenuation although the full spectrum of viral genes that accounts for this phenotype has only been partially characterized (74). The MVA genome also lacks a number of genes encoding immunomodulatory functions found in other VACV genomes, indicating that it does not interfere with the antiviral immune response as efficiently as other VACV strains (4, 8). In fact, numerous studies have shown that MVA activates the innate immune response more effectively than standard VACV (8, 11, 13, 21, 72).

Two strategies were considered to further investigate how the major deletions in the MVA strain affect its attenuation and vaccine efficacy. The first one would involve introducing regions deleted from the MVA strain back into this virus, whereas the second would involve deleting the same regions from another virus, the parental strain of MVA (CVA) or a related strain. We chose the latter strategy because it might allow the isolation of more-attenuated VACV strains from an established smallpox vaccine whose efficacy had been historically demonstrated. Instead of using the CVA strain as the starting point, as recently reported by Meisinger-Henshel et al. (46), we chose to start from the VACV Lister (VACV-Lis) strain because this WHO reference strain was one of the most widely used strains during the smallpox eradication campaign (17). Recent data have established that the Lister strain induces human antibody responses comparable to that of the Dryvax strain, another commonly used smallpox vaccine (51). Genomic deletions of this strain could increase its safety and make it more suitable for further use. It was also postulated that using an established smallpox vaccine with a smaller number of deletions than the number that occurs in the MVA strain may lead to a safe vaccine that is effective at lower doses than those used with the MVA strain.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cell culture. A clonal isolate of the Lister strain of the smallpox vaccine, designated VACV-107 (22, 23), was used as the parental strain for isolation of deletion mutants. Virus was propagated on the chicken embryonic stem cell line EB 14 (provided by Vivalis, France) cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)-F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and 40 µg/ml gentamicin. Virus stocks were produced on EB 14 cells; however, because monolayers of these cells tend to detach, virus titrations were preferentially carried out on baby hamster kidney cells (BHK21) cultured in DMEM and supplemented with 1.5 mg/ml Bacto tryptose phosphate, 10% FCS, and 40 µg/ml gentamicin. Vero cells used in virus neutralization assays were cultured in M199 medium supplemented with 5% FCS, 100 IU penicillin/ml, and 100 IU/ml streptomycin. HeLa and MRC5 cells used to follow virus multiplication were cultured in DMEM with 10% FCS or in RPMI 1640-Glutamax medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40 µg/ml gentamicin.

Molecular cloning and PCR. PCR amplification of viral DNA and molecular cloning in plasmids were carried out according to previously described methods (61). DNA fragments encompassing approximately 500 bp on either side of the regions targeted for deletion were amplified from the VACV-107 genome using the oligonucleotides listed in Table 1. Fragments on the left sides of the regions to be deleted were amplified so as to have a left XhoI site and a right BamHI site, while fragments on the right sides of the regions to be deleted were designed to

have a left BamHI site and a right SacI site. PCR-amplified fragments were inserted into minimal bacterial vector pEM8, derived from pPoly3 (36) and containing unique adjacent sites for XhoI, BamHI, SacI, EcoRI, and PstI in that order. After PCR amplification the left side of each region targeted for deletion was inserted into pEM8 using XhoI and BamHI whereas the right side was inserted using BamHI and SacI. A cassette flanked by unique SacI and PstI sites and encoding both green fluorescent protein (GFP) under the control of a VACV synthetic early promoter (29) and the enzyme guanine phosphoribosyltransferase (GPT) under the control of the VACV 7.5-kDa promoter (12) was then inserted adjacent to the rightmost fragment into the EcoRI and PstI sites of pEM8 using a single-stranded oligonucleotide linker to ligate the SacI site to the EcoRI site.

Isolation of deletion mutants. Virus deletion mutants were isolated by transient dominant selection, a procedure that results in a region being deleted or modified in another manner without any foreign selection marker being retained (16). EB 14 cells were plated at approximately 300,000 cells per 35-mm² petri dish, incubated overnight at 37°C in a cell culture incubator containing 5% CO₂, and then infected with approximately 0.1 PFU/cell for 1 h. After this period of time the suspension containing unadsorbed virus was removed, the cells were washed twice with serum-free medium, and 1 µg of the appropriate plasmid was transfected using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). One day later cells were observed under the microscope by UV illumination to visualize expression of GFP, a marker of successful transfection, and then frozen at -20°C. Afterwards, infected cells were subjected to several additional rounds of freezing and thawing, and virus-containing cell lysates were used to infect fresh EB 14 cells in the presence of selective pressure for the expression of the GPT gene. Viral plaques formed in the presence of the selective medium were visualized by microscopy under UV light, and fluorescent plaques were picked and amplified on EB 14 cells in liquid medium in the presence of selective pressure. This procedure of cloning the virus under selective pressure and amplification was repeated several times. Two or three independent virus clones able to form fluorescent plaques were then used to infect fresh cells after limiting dilution and in the absence of selective pressure but under an agarose overlay. Nonfluorescent plaques were picked after 2 days of infection, and the virus was amplified in the absence of selective pressure. A sample of the amplified virus stock was used to extract total DNA, and the DNA was subjected to PCR using one of the appropriate pairs of primers indicated in Table 1, column 5. The primers were designed to detect the presence of the deleted viral DNA, undeleted viral DNA, or a mixture of the two. Primers A and B together were designed to flank the areas deleted. Primer A' was chosen so that it lies within the deleted sequence and together with B enables amplification of a fragment in the parental virus. Virus stocks containing mixtures of deletion and parental virus generated the two PCR products 1 and 2 listed in column 6 of Table 1, whereas stocks containing only virus with the targeted region deleted generated only PCR product 2 (approximately 500-bp fragments in all cases except for one deletion IV stock which generated a 1,000-bp fragment).

Virus clones containing only DNA with deletions were subjected to two additional cloning steps in the absence of selective pressure. The deletions were again confirmed in another round of PCR analysis of DNA from the more thoroughly cloned virus mutants. To detect large DNA fragments (2.5 to 9 kbp) in the VACV-107 strain or the corresponding shortened fragments in the deletion mutants, PCR amplification was carried out using the Expand Long Template system (Roche Applied Science) by a common protocol for all viruses of 30 cycles with 8-min elongation periods. Finally, virus stocks were made by amplification on EB 14 cells. Viruses with simultaneous deletions in multiple regions were constructed by repeating the operations outlined on virus that already had deletions. A portion of the thymidine kinase (TK) gene was also deleted in a similar manner to isolate a VACV mutant with this gene deleted.

Evaluation of neutralizing antibodies and T lymphocyte responses. Vaccinated mice were anesthetized with pentobarbital and bled by intracardiac puncture, and VACV-neutralizing antibodies in serum samples were titrated according to a previously described method (39) validated in four laboratories (58). Briefly, serum samples were first incubated at 56°C for 30 min to inactivate complement and then subjected to serial 2-fold dilutions in phosphate-buffered saline (PBS). The samples were mixed with an equal volume of VACV containing approximately 35 PFU in 0.1 ml for 1 h at 37°C, and the mixture was added to Vero cell monolayers. Two days later virus plaques were counted. The neutralization titer was expressed as the reciprocal serum dilution that led to a 50% reduction in the number of plaques compared to the control. The threshold of the titration was 10.

To measure T lymphocyte responses, the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing intracellular gamma interferon (IFN-γ) were determined by flow cytometry as previously described (18). Briefly, mature bone marrow

TABLE 1. Primers used to make targeted deletions in the VACV Lister strain and screen for deletion mutants^a

Lister deletion	MVA deletion(s)	Plasmid used to create deletion	Primers for plasmid construction (5'-3')	Primers for virus screening and genome characterization	Fragment sizes (bp)
Lis Δ I Δ 3,560 (6118 to 9677)	I (d3,585)	pEM22	Left, GCGCTCGAGGAGTAAC AGTCGAACA and GCGGGATC CGATCATTAATGTTTCAT CAG; right, CGCGGATCCTAAA TTTCAGTTTATGTTTGT and GGCGAGCTCTAGCGTTTGTA ATTTCTGG	A, GCAATCATTCTCTATAAGA; A', ATAGAAACTGGA GAAATCAA; B, CAATATTGAATG TGTGCTG	1, 380; 2, 525; 3, 4,085
Lis Δ II,V Δ 8,552 (19758–28309)	II + V (d2,763 + d4,817)	pEM18	Left, TCGAGAACTTGATATTGG ATATATCAC, GAACCTTGATAT TGGATATATCAC, GATCCAT AGAGAAAATAGCTCCAGA ATA, and CATAGAGAAAATA GCTCCAGAATA; right, GATCC GAATCATCCATTCCACTGA ATA, CGAATCATCCATTCCAC TGAATA, CCATGGTAGCTAC GCGGAGAT, and AGTCCAT GGTAGCTACGGCGAGAT	A, GATAGAATCAG ACTCTAAAAG; A', TAGAACATCAGT CTCCAA; B, ATG GATCTGTCCAG AATT	1, 355; 2, 510; 3, 9,062
Lis Δ III Δ 3,519 (161293–164811)	III (d3,501)	pEM20	Left, GCGCTCGAGATAAAGTAG CCATTCTTCC and GCGGGAT CCTACCAGCCACCGAAA GAG; right, CGCGGATCCTTTG GAAAGTTTATAGGTAG and CGCGAGCTCATGTCATAAAG AATGCACAT	A, GCTGATAAATAG AACTCAGC; A', GATAAATGGTCA GGTGTA; B, AAG ACGTCGCTTTT AGCA	1, 375; 2, 520; 3, 4,039
Lis Δ IV Δ 1,742 twice (1833–3574 and 185848–187589)	d1,771	pEM23	Left, GCGCTCGAGTCGAAATTC AGAGTGCAC and GCGGGATC CGACGCGATCGTGTAACA; right, CGCGGATCCACATTGTT GACAGAAACG and CGCGAG CTCACAGACTGAGATAC GCAA	A, GCGCTCGAGTC GAAATTCAGAGT GCAC; B, CGCGA GCTCACAGACTG AGATACGCAA	1, 2,692; 2, 1,000; 3, 2,742
Δ 2,074 (181231–183304)	IV (d809)	pEM21	Left, GCGGAGCTCCATGGAGCT AATCTAAACG and GCGGGAT CCAAGATAGGTAGAGATGG AAG; right, GCGCTCGAGGAG AGTAACAGTCGAACA and GCGGGATCCGATCATTAAAT GTTTCATCAG	A, GCTATGAAGGA AAGACAT; A', GTCTCTCTACAG GCTTCT; B, GCAA TCATTCCTCA TAAG	1, 350; 2, 510; 3, 2,584

^a The names of the VACV Lister deletion mutants, the sizes of the deletions in base pairs, and their positions on the VACV-107 genome are listed in the first column. The second column indicates the corresponding deletion in the MVA strain in roman numerals (according to Meyer et al. [50]) and/or the size of the deletion in base pairs relative to the VACV Copenhagen strain (according to Antoine et al. [4]). The names of the plasmids used to isolate each deletion mutant are indicated in the third column (note that two plasmids targeting closely spaced deletions were used to isolate mutant Δ IV, whereas one plasmid was used to make a single deletion overlapping two closely spaced deletions in the case of mutant Δ II,V. The oligonucleotide primers used to amplify PCR fragments which flank the targeted regions on their left and right sides are listed in the fourth column (note that the left and right fragments of the deletions created in plasmid pEM18 were amplified twice by PCR using oligonucleotide primers that enabled creation of the required restriction sites at the ends by annealing the two fragments together). Virus deletions were checked by PCR analysis of total DNA extracted from infected cells using the three oligonucleotide primers A, A', and B listed in the fifth column. The expected sizes of PCR fragments are indicated in the sixth column: fragment 1, PCR product using A' and B in parental virus; fragment 2, PCR product using A and B in deletion virus; fragment 3, PCR product using A and B in parental virus.

dendritic cells from uninfected BALB/c mice were infected with VACV and then incubated with spleen cell suspensions from infected animals for 6 h at a ratio of one mature dendritic cell for two splenocytes. Brefeldin A (5 μ g/ml) was added for the last 4 h to block cytokine secretion. Cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-CD8b2 and allophycocyanin (APC)-coupled anti-CD4 monoclonal antibodies (MAbs), fixed, and permeabilized. Intracellular IFN- γ was stained with a phycoerythrin (PE)-coupled anti-IFN- γ MAb, and cells were fixed in 2% formaldehyde diluted in PBS. Flow cytometry was performed on an FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL), and the data were analyzed with Cytomics RXP software (Beckman Coulter).

Vaccination of mice against a lethal intranasal CPXV infection. The ability of the deletion viruses to confer protective immunity after vaccination was assayed

in female BALB/c mice. Groups of 6 animals were tested and treated in the same manner for each condition studied. Before vaccination, 4-week-old mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg of body weight) and atropine (1.5 mg/kg). The mice were then scarified at the base of the tail by a series of scratches using the tip of a 23-gauge needle, and 3 μ l of virus at various concentrations was deposited at the scarification site according to an established method (48, 49) that performed consistently in studies we conducted previously (18, 20, 23). A characteristic pustule, testifying a take, was observed 8 to 10 days later at the site of scarification in mice vaccinated with the highest virus doses and in some mice vaccinated with lower doses. Twenty-eight days after vaccination, the mice were anesthetized as described above and challenged by intranasal instillation with 2×10^6 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) of cowpox

virus (CPXV; Brighton strain VR302, obtained from the ATCC and amplified in Vero cells), which corresponds to 30 times the 50% lethal dose (LD₅₀) (19). For the challenge, 50 μ l of virus or 50 μ l of NaCl (9‰) was deposited in both nostrils using a micropipette with a sterile tip. Clinical signs of disease (weight loss, ruffling of the fur, and reduced mobility) and the number, size, and body localization of lesions, as well as mortality, were noted for the following 3 weeks. The animals were euthanized at the end of experiments by cervical dislocation.

Assessment of attenuation in nude mice and SCID mice. Five-week-old Swiss nude mice [CrI:NU(Ico)-*Foxn1*^{nu}] or SCID mice (CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcrCrI C.B-17) (Charles River Laboratories) were anesthetized (100 mg/kg ketamine and 1.5 mg/kg atropine) and inoculated with VACV-Lis, VACV-107, or deletion mutants derived from VACV-107 by tail scarification as described above using 5.0 log PFU of each virus. A characteristic pustule, testifying a take, was observed 8 to 10 days later at the site of scarification in all mice vaccinated with VACV-Lis and VACV-107. Clinical signs of disease (weight loss and presence of specific skin lesions) and mortality were followed over an 8-week period.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out using analysis of variance (ANOVA) by Dunnett's multiple comparison test for weight loss, neutralization, and T cell immune responses. The log rank test was used for survival. Calculations were performed with GraphPad (La Jolla, CA) software. *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS

Isolation of VACV deletion mutants and analysis of their multiplication in cell culture. Six major regions are deleted in the MVA strain relative to other closely related VACV strains. These regions are localized at the left and right ends of the viral genome and have been previously designated with roman numerals from I to VI (50). We deleted each of these regions (Fig. 1, top) except region VI from the genome of VACV-107, a clonal isolate of the Lister strain, using the transient dominant selection method described by Falkner and Moss (16). Region I (3,585 bp), which encodes several putative proteins of unknown function as well as a serine protease inhibitor (Spi1) important for virus host range in at least one human cell line (2, 64), was deleted individually. Regions II and V, which are adjacent at the left end of the genome, were deleted together with the intervening region (overall 8,552 bp). This affected 10 ORFs, including one encoding a kelch protein that antagonizes viral immunopathology (C2L in the VACV Copenhagen strain) (57), one encoding a complement control protein (C3L in the VACV Copenhagen strain) (34), and one encoding a host range protein and inhibitor of type I interferons (K1L) (24, 47), as well as two genes that lie at the boundary of regions II and V (the virulence factor N1L gene [5] and the α amanitin-sensitive gene N2L [69]), the former frameshifted at its 3' end and the latter internally deleted in MVA (4). Region III (3,519 bp with respect to VACV-107, corresponding to a 3,501-bp deletion with respect to VACV Copenhagen), overlapping four ORFs, including ORFs encoding a tumor necrosis factor (TNF) receptor (CrmC [1]), a suppressor of Toll/IL-1 signaling (9), and a kelch protein which affects the virus-induced cytopathic effect (6), was deleted on its own. Region IV was deleted in two steps. The first step was to delete 1,742 bp with respect to VACV-107 (1,771 bp with respect to VACV Copenhagen) at both ends of the Lister genome; the deleted regions overlap five genes corresponding to truncated segments of full-length genes found in other orthopoxviruses. Viral deletion mutants were screened by PCR to identify those with mirrored deletions at both ends of the genome. The second step involved deleting 2,074 bp overlapping a TNF receptor (CrmE) gene (1, 60) and an antiapoptotic virulence factor

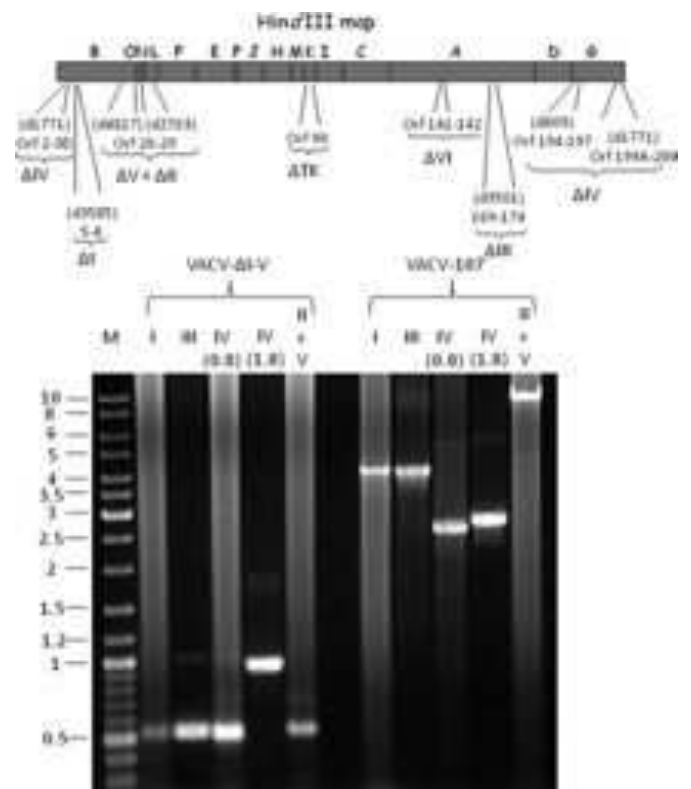


FIG. 1. Localization of deletions within the Lister VACV-107 genome and genomic characterization of a mutant within five distinct regions. (Top) The VACV-107 genome with the positions of the HindIII restriction fragments. The numbers in parentheses below the viral genome indicate the approximate locations of deletions previously mapped in the MVA strain relative to the Copenhagen strain (from left to right according to the nomenclature of Antoine et al. [4]). The actual ORFs that were deleted in the Lister genome are indicated beneath the indicated MVA deletions and numbered according to Garcel et al. (22) The roman numeral nomenclature of Meyer et al. (50) is indicated underneath each of the regions deleted and used throughout the paper. Note that the position of the TK deletion is indicated but that there is no corresponding deletion in the MVA strain and that deletion Δ VI has not been created in the Lister strain. (Bottom) Agarose gel of PCR products on DNA extracted from BHK21 cells infected with VACV Δ I-V or VACV-107. PCR was performed to amplify region I, III, IV (0.8-kbp part), IV (1.7-kbp part), or the combined regions II and V using primers A and B, specific for each region (Table 1, column 5). Note that the 30 PCR cycles, each for 8 min, were performed to favor amplification of long fragments. The amount of PCR loaded on the agarose gel was adjusted to facilitate visualization of the products produced unequally from one reaction to another. Molecular size markers (kbp) are depicted in the left lane.

gene (26). The two deletions were then combined in one virus to streamline subsequent analyses. Once virus mutants with single deletions or in some cases combined deletions were isolated, they were used as parental viruses to isolate mutants with increasing numbers of deletions in such a way that various combinations of the five targeted deletions were constructed. The predicted structures of the mutant genomes were confirmed by PCR and illustrated for one mutant which had all five deletions (VACV Δ I-V) (Fig. 1, bottom). Primers were chosen for each region deleted so as to amplify a 0.5- or 1-kbp fragment in the mutant virus VACV Δ I-V, whereas fragments ranging in size from 2.6 kbp to 9.1 kbp were amplified in the

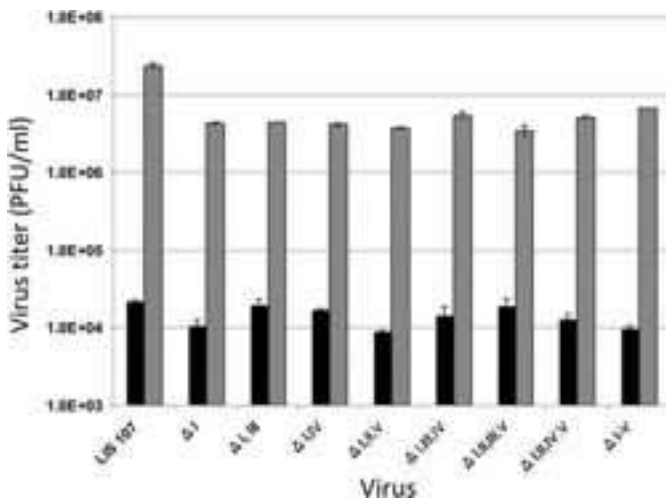


FIG. 2. Virus yields in HeLa cells infected with VACV Lister deletion mutants. HeLa cell monolayers were infected with 0.01 PFU/cell and incubated for either 3 h (black bars) or 48 h (striped bars). Virus titers in the cell cultures were then determined on BHK21 cell monolayers.

VACV-107 strain as predicted from the sizes of the intact regions in the parental virus, including the surrounding 0.5- or 1-kbp regions (Table 1, column 6). Finally, a deletion was also introduced into the thymidine kinase (TK) gene of the Lister strain to create a virus strain with previously documented attenuation (10).

The ability of the mutants to multiply in several cell lines was examined. All mutants were routinely propagated on the chicken embryonic stem cell line EB 14, and all of them were found to form plaques and multiply to high yields in these cells (data not shown). Titration of virus was performed on hamster BHK21 cells, and all of the deletion mutants produced clearly visible plaques after a 2-day incubation period. Since several of the regions deleted included previously characterized host range genes essential for multiplication in human cell lines (2, 24, 64), the deletion mutants were tested for their ability to multiply in HeLa cell cultures. Initial experiments showed that all of the mutants isolated after one round of deletion multiplied well in these human cells except mutant ΔI , which produced yields about 5-fold lower than the parental Lister strain. The influence of the ΔI deletion within the background of other deletions was then investigated. Virus titers in the infected-cell cultures of BHK21 cells were assayed after several cycles of freezing and thawing samples either 3 h after infection to estimate the amount of input virus or 48 h after infection (multiplicity of infection [MOI] = 0.01) to determine virus yield. All of the mutants containing the ΔI deletion multiplied to levels 4- to 5-fold lower than the parental Lister strain (Fig. 2), indicating that this deletion indeed affected virus multiplication in human HeLa cells. However, there was no additional effect of the other deletions on virus multiplication, indicating that only ΔI contributed to the reduced virus yields. Similar experiments carried out in the MRC5 cell line also indicated that the ΔI deletion entailed reduced virus yields in this human diploid cell line (data not shown).

Assessment of attenuation of the deletion mutants in nude mice and SCID mice. First the pathogenicity of the deletion

mutants was assessed in athymic nude mice defective for the production of antigen-specific T lymphocytes and T cell-dependent antibodies because these animals are highly susceptible to VACV infection, unlike immunocompetent mice (54, 59). Groups of six mice were inoculated by scarification at the base of the tail with virus suspensions titrating at 10^8 PFU/ml, thus delivering approximately 10^5 PFU, a dose equivalent to that used for smallpox puncture vaccination in humans, which is also recognized to be a highly effective means of vaccination in mice (40). The morbidity and mortality of the infected animals as well as those of a control mock-infected group were followed over an 8-week period in separate experiments performed at least twice for each mutant. Mock-infected animals gained weight regularly over the period of observation, whereas animals infected with the VACV-107 isolate or the original VACV Lister strain (VACV-Lis) gained weight more slowly over the first 2 weeks, then dramatically lost weight until their deaths between day 35 and 44 postinfection (Fig. 3). Loss of weight in these animals correlated with virus dissemination to other sites on the tail and the body. All of the mice infected with the single deletion mutant ΔIV or the TK gene-deleted mutant died, and some died in the groups infected with the single-deletion mutants ΔI and ΔIII although overall weight loss was delayed (Fig. 3A and B). Therefore, each of these deletions only mildly reduced the pathogenicity of the VACV-107 clone in nude mice. The double-deletion mutant $\Delta I,IV$ also induced weight loss and mortality similar to those induced by the single-deletion mutants ΔI and ΔIV . Mice infected with mutants with two or more regions deleted survived infection (except for $\Delta I,IV$) but in most instances failed to gain weight as fast as mock-infected animals ($P < 0.05$). Mice infected with mutants $\Delta I,III$, $\Delta II,V$, $\Delta I,II,V$, and $\Delta I,II,IV,V$ gained weight as fast as control animals at first but failed to reach the same body weight as uninfected animals. Mice infected with mutants $\Delta III,IV$, $\Delta I,III,IV$, and $\Delta II,IV,V$ gained weight more slowly than control animals, then started to lose weight compared with the initial body weight. Therefore, these deletion mutations induced significant morbidity in nude mice, albeit not to the extent of the parental VACV strain. In contrast, mice infected with four mutants gained weight over the period of observation in a similar manner to that of the mock-infected control mice ($\Delta II,III,V$, $\Delta I,II,III,V$, $\Delta II,III,IV,V$, and $\Delta I-V$; $P > 0.05$) (Fig. 3C). These data show that the combined deletion of the three genomic regions II, III, and V is sufficient to completely eliminate morbidity, as measured by loss of body weight, in nude mice. The number of secondary lesions on the tail and the rest of the body of these mice varied between 0 and 4, and their sizes were reduced (1 to 3 mm) (Table 2). The number of secondary lesions has been found to correlate closely with body weight loss in infected nude mice (see Fig. 1 at http://igbmc.fr/Schultz_jv2011). Overall, three independent experiments were performed with the four most highly attenuated mutants presented in Fig. 3C, and in two of them nude mice gained weight as if they were uninfected ($P > 0.05$), whereas in a third experiment animals infected with mutants $\Delta II,III,IV,V$ and $\Delta I,II,III,V$ also behaved like uninfected animals ($P > 0.05$) while animals infected with mutants $\Delta I-V$ and $\Delta II,III,V$ survived infection but failed to gain as much weight as uninfected animals ($P < 0.05$; data not shown).

Severely immunodeficient SCID mice were then used to

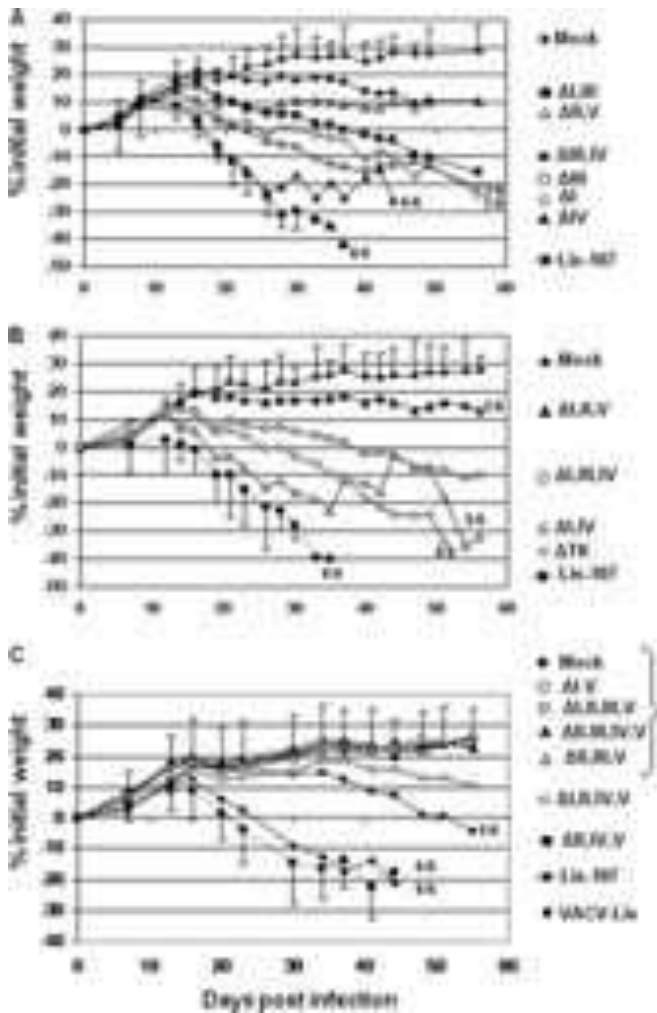


FIG. 3. Weight changes in nude mice vaccinated with VACV Lister deletion mutants. Groups of 6 nude mice were infected by scarification with 10^5 PFU of the VACV deletion mutants in three separate experiments (A, B, C), each including an uninfected control group and a group infected with the VACV-107 parental strain. The mean change in weight for each group of animals as a percentage of the initial weight is plotted against time. The standard deviation of the mean is plotted above the line for mock-infected mice and below the line for VACV-107-infected mice (standard deviations for other groups of mice were within the same range). Where death occurred, the number of animals that succumbed is indicated as a ratio of the six animals in the group.

examine the pathogenicity of the deletion mutants that displayed the highest level of attenuation in the nude mouse model. As expected, tail scarification with 10^5 PFU of VACV-Lis or the clonal isolate VACV-107 resulted in considerable weight loss beginning about 10 days postinfection and continuing until the animals died (Fig. 4). On the other hand, all mice infected with the deletion mutants gained more weight than animals infected with the parental viruses but then slowly lost weight over the period of observation, probably due to slow virus multiplication in these animals. In fact, the lesion at the site of vaccination gradually increased in size, and there were several secondary lesions that appeared over time. These animals were nevertheless alive after 56 days of infection, when the experiment was ended.

TABLE 2. Numbers of secondary lesions on the tail and the rest of the body for nude mice after vaccination with the different deletion mutants^a

Vaccine strain	No. of skin lesions on individual mice						Mean no. of lesions \pm SD
VACV-107	5	12	7	12	6	9	8.5 ± 3.0
VACV-Lis	6	14	10	7	9	7	8.8 ± 2.9
Δ II,III,V	2	2	3	1	0	1	1.5 ± 1.0
Δ I,II,III,V	1	2	0	3	0	0	1.0 ± 1.3
Δ II,III,IV,V	3	2	4	2	1	2	2.3 ± 1.0
Δ I,II,III,IV,V	1	1	1	0	0	1	0.7 ± 0.5

^a Nude mice were inoculated at the basis of the tail with 10^5 PFU of each deletion mutant, VACV-107 clone, or the traditional smallpox vaccine (VACV-Lis). The secondary skin lesions were counted at day 49 for deletion mutants or at day 30 for the VACV-Lis and VACV-107 groups, before death.

Immune responses induced by the deletion mutants. We then assessed the immune responses induced by the most highly attenuated viruses in immunocompetent BALB/c mice after vaccination by tail scarification with a virus dose equivalent to that used in immunodeficient mice (10^5 PFU per animal). A local lesion appeared at the site of scarification for most mice a few days after vaccination, then regressed, and the mice did not display any signs of morbidity whatever virus was employed. Four weeks later the mice were bled and neutralizing antibody (Nab) titers in the serum samples were determined and expressed as the reciprocal of the serum dilution leading to a 50% reduction in plaque count (Fig. 5). Whereas uninfected animals displayed mean Nab titers less than 10, mice infected with the parental VACV-Lis strain or the clonal isolate induced similar levels of Nab ($P > 0.05$), which were

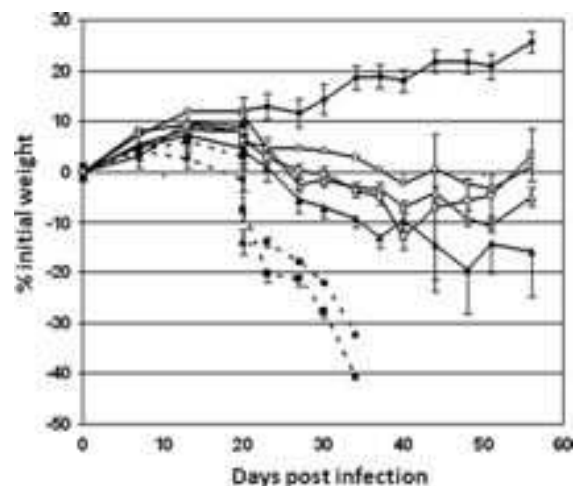


FIG. 4. Weight change in SCID mice vaccinated with VACV Lister deletion mutants. Groups of 6 SCID mice were infected by scarification with 10^5 PFU of the VACV deletion mutants in two experiments, each including an uninfected control group and a group infected with the VACV-107 parental strain and the traditional smallpox vaccine. The mean change in weight as a percentage of the initial weight is plotted against time for one of the experiments as well as the standard deviations for some groups (standard deviations not shown were in the same range as those plotted). Note that considerable weight loss resulted in death of all mice in groups infected with VACV-107 and VACV-Lis before the end of the experiment. Animals in all other groups survived. ■, VACV-107; ●, VACV-Lis; △, Δ II,III,V; □, Δ I,II,III,V; ▲, Δ II,III,IV,V; ○, Δ I-V.

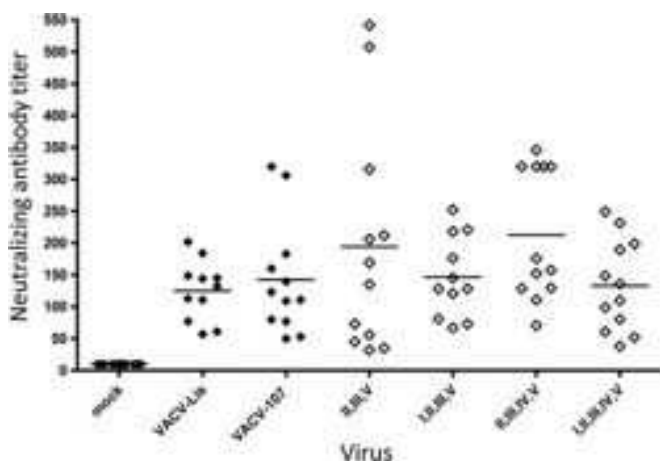


FIG. 5. Levels of neutralizing antibodies in mice vaccinated with VACV Lister deletion mutants. BALB/c mice were vaccinated by scarification at the base of the tail with 10^5 PFU (six animals per group) in two experiments. Four weeks later the mice were bled and VACV-neutralizing antibodies in the serum of each animal were titrated. The results of the two experiments are represented as the reciprocal of the serum dilution which led to a 50% reduction in the VACV plaque count. Horizontal lines indicate the mean values for all mice in a group. Neutralization titers in serum samples from uninfected animals were below 10, the threshold of neutralization.

within the range of the titers found in human subjects vaccinated against smallpox (39, 58). The Nab titers with all of the deletion mutants were similar to those with the parental Lister strain and the clonal VACV-107 isolate ($P > 0.05$).

The cell-mediated immune responses were also assayed 4 weeks after tail scarification of BALB/c mice with 10^5 PFU/animal. After 4 weeks vaccinated mice display a steady-state level in their cell-mediated immune response (18), suggesting that this is an appropriate time to assay this response and challenge them (see below). Spleens were recovered, and spleen cell suspensions were stimulated with VACV-infected dendritic cells. The levels of VACV-specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes were measured by assaying for the percentage of IFN- γ -secreting cells in the spleen cell population using flow cytometry (Fig. 6). The clonal isolate VACV-107 and the traditional Lister vaccine induced comparable VACV-specific CD4⁺ lymphocyte responses ($P > 0.05$), which were about 3- to 4-fold higher than the background level in mock-infected animals ($P = 0.001$). The highly attenuated deletion mutants Δ II,III,V and Δ I,II,III,V induced a VACV-specific CD4⁺ response slightly but significantly lower than that induced by the parental VACV strains ($P < 0.05$), whereas the mutants Δ II,III,IV,V and Δ I-V induced responses comparable to those induced by the parental strains. In the case of the specific CD8⁺ cell response, both the uncloned VACV-Lis strain and the clonal isolate induced similar responses, which were about 8-fold higher than the basal level measured for splenocytes from mock-infected animals ($P < 0.05$). The specific CD8⁺ response with all of the deletion mutants except Δ II,III,V was significantly lower than that induced by the parental viruses ($P < 0.05$) but between 4- and 6-fold higher than that of uninfected animals.

Protection of mice from CPXV challenge by vaccination with the deletion mutants. Previous studies have demonstrated that

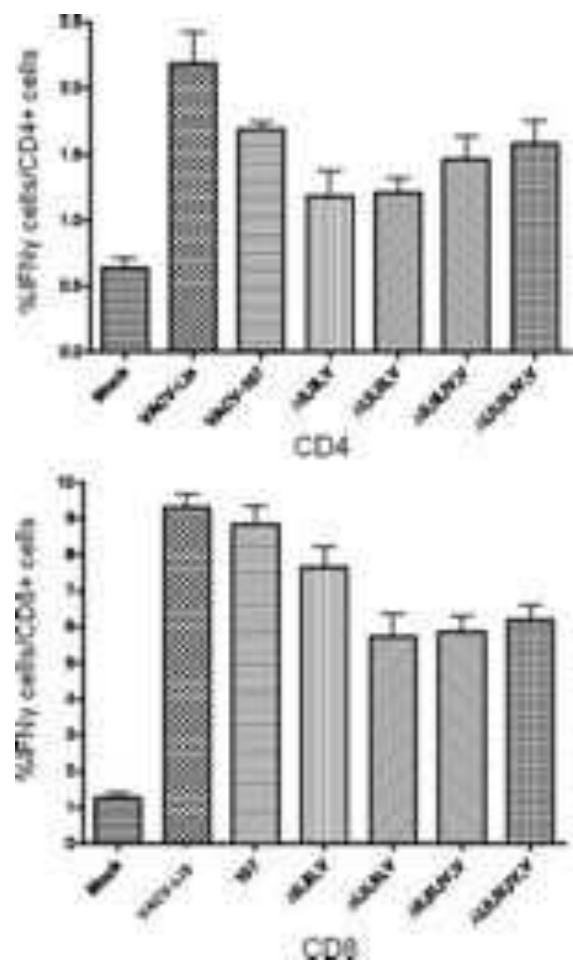


FIG. 6. Level of VACV-specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in mice vaccinated with VACV Lister deletion mutants. BALB/c mice were vaccinated by scarification at the base of the tail with 10^5 PFU (six animals per group) in two experiments. Four weeks later the mice were bled, spleens were recovered, and the percentages of CD4 and CD8 T lymphocytes able to secrete IFN- γ in the presence of dendritic cells presenting VACV antigens were determined. The mean values for animals in the two experiments and the corresponding standard deviations are plotted.

cowpox virus (CPXV) infection of mice by the intranasal route provides a model infection for smallpox and that traditional smallpox vaccines can protect against disease and death in this model system (19, 41). In order to assess the efficacy of the most highly attenuated deletion mutants, BALB/c mice were vaccinated by scarification at the base of the tail with 1×10^2 to 1×10^4 PFU of each deletion mutant, VACV-107, or VACV-Lis. Each dose was administered to six mice per group, and 1 month later the animals were challenged with 30 LD₅₀ of CPXV. All animals in the unvaccinated groups succumbed after challenge between the 6th and 10th day after infection, and none of the unvaccinated, unchallenged animals died (data not shown). Most of the animals vaccinated with the highest virus dose (10^4 PFU/scarification) lost between 25 and 35% of their body weight by about the ninth day postinfection because of the severity of the challenge and then progressively recovered. There was no statistically significant difference in the rates of weight loss or weight recovery between animals vacci-

TABLE 3. Protection of mice from CPXV challenge by vaccination with the deletion mutants

Vaccine strain	No. of surviving mice/group of six mice at indicated vaccine dose (PFU) in expt:									PD ₅₀ (log PFU) ± SD ^a
	1			2			3			
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁴	10 ³	10 ²	
VACV-107	6	6	1	6	3	2	4	0	0	3.0 ± 0.7
VACV-Lis	6	3	1	ND ^b	ND	ND	6	0	0	3.2 ± 0.2
ΔII,III,V	4	1	0	ND	ND	ND	6	2	1	3.4 ± 0.4
ΔI,II,III,V	ND	ND	ND	6	1	1	6	1	1	3.4 ± 0.1
ΔII,III,IV,V	ND	ND	ND	6	4	1	6	1	1	3.0 ± 0.5
ΔI-V	ND	ND	ND	5	5	2	5	5	0	2.6 ± 0.2

^aSD, standard deviation of the mean calculated using the method of Reed and Muench considering 100% survival at the 10⁵ PFU dose (data not shown).

^bND, not done.

nated with the different virus mutants or the VACV parental viruses ($P > 0.05$) (see Fig. 2 at http://igbmc.fr/Schultz_jv2011). The survival of mice in three independent experiments where each virus was tested at least twice is shown in Table 3. In two experiments all animals vaccinated with 10⁴ PFU of the VACV-107 Lister clone survived, and 4 out of 6 mice survived in the third experiment, consistent with the level of protection afforded by the uncloned VACV-Lis strain. Similarly, the majority of the animals vaccinated with 10⁴ PFU of the deletion mutants survived (Table 3) and all of them survived after vaccination with 10⁵ PFU (data not shown) except one animal in group ΔII,III,IV,V. Intermediate and poor levels of survival were observed for animals vaccinated with 10³ or 10² PFU, respectively, of VACV-107, VACV-Lis, or the deletion mutants. The viral dose able to protect 50% of the animals (PD₅₀) was calculated using the method of Reed and Muench and found to be 3.0 ± 0.7 log PFU in the case of the Lister clone and 3.2 ± 0.5 log PFU with the traditional vaccine. The PD₅₀s for the mutants were within the same range as that for the parental clone or VACV-Lis, demonstrating that the deletion of up to five selected regions in the VACV Lister virus genome did not alter the ability to efficiently protect mice against a challenge infection.

DISCUSSION

We have investigated the role of 5 regions in the VACV Lister genome, known to be deleted in the MVA genome (deletions I to V), on replication in human cells, virulence in the nude and SCID mouse models, induction of specific immune responses in immunocompetent mice, and vaccine efficacy in a CPXV challenge model. The influence of deleting region VI was not investigated because it was thought unlikely to affect virulence since it encompasses one gene fragmented in all VACV strains (an orthologue of the CPXV virus gene encoding the A-type inclusion protein [3]) as well as a truncated copy of another gene (p4c) shown to be important for association of viral particles with A-type inclusions (43), which are absent from VACV-infected cells (28, 33).

Infection of human cells indicated that deletion of region I entails a significant reduction in virus multiplication. This result was not too surprising, as region I contains the SpiI gene, which has previously been shown to be required for multiplication of VACV WR in the human lung cell line A549 (64). Deletion of region I could therefore contribute to further at-

tenuation of the VACV Lister strain if the strain is used to vaccinate humans. Deletion mutants of the CVA strain, similar to the ones we have constructed, were extensively studied for their host ranges *in vitro* and found to be replication defective in two rabbit cell lines, consistent with deletion of the KIL gene (46). However, the same CVA mutants were able to multiply efficiently in 12 other mammalian cell lines, including 5 human cell lines (46). The distinct genetic background of the CVA strain could account for failure of the CVA deletions to affect viral multiplication in human cells as we have noticed for Lister mutants with region I deleted.

Infection of athymic nude mice with the mutants demonstrated that the deletion of single genomic regions was insufficient to induce a high level of attenuation compared with the parental viral clone VACV-107 or the traditional smallpox vaccine. Particularly interesting in this respect is region IV, which contains, in addition to a number of truncated genes, a biologically active TNF receptor (Crme) gene previously shown to be required for VACV virulence in a murine intranasal model (60) and a gene encoding a Golgi resident anti-apoptotic protein whose deletion did not affect weight loss in the murine intranasal model but rather increased the severity of other signs of illness (26). Thus, the opposite effects of deleting these two genes in the ΔIV mutant may result in no phenotype at all, or alternatively these two genes may play no significant role in the particular mouse scarification model we have employed. The combined deletion of at least two regions (for instance, regions I and III) resulted in survival of all nude mice although some morbidity occurred. Several VACV mutants harboring multiple deletions were clearly more attenuated than VACV-107 or the traditional smallpox vaccine but still displayed some pathogenicity. Only four deletion mutants proved to be totally attenuated in the T cell-deficient mouse model, as ascertained from survival and body weight loss (ΔII,III,V, ΔI,II,III,V, ΔII,III,IV,V, and ΔI-V), all of them having at least regions II, III, and V deleted. In contrast, deletion of the TK gene, known to be attenuating upon VACV infection in other animal models (10, 70, 73), did not significantly alter virus pathogenicity for nude mice. In SCID mice, which are more severely immunocompromised than nude mice, the highly attenuated deletion mutants characterized in the nude mouse model did not induce any mortality over the period of observation but mice failed to gain weight as well as uninfected animals and eventually started to lose weight. These results reflect the fact that the deletion mutants are able to

multiply in SCID mice as multiple secondary lesions appeared over time.

The data from studies in human cells, nude mice, and SCID mice suggest that the deletion of regions I, II, III, and V may be sufficient to obtain satisfactory attenuation of the Lister strain in humans. Two deletion mutants tested would best fit this requirement, namely, mutants Δ I,II,III,V and Δ I,II,III,IV,V.

Despite clear-cut attenuation in immunocompromised mice, the four most attenuated VACV deletion mutants induced humoral responses equivalent to those of the standard Lister vaccine. On the other hand, the cell-mediated immune responses induced by the mutants were in several instances significantly lower than those of the Lister parents. Nevertheless, all of the highly attenuated mutants displayed remarkable vaccine efficacy, as illustrated by protection of immunocompetent mice from a severe CPXV challenge infection. Calculation of the 50% protective dose and analysis of weight loss and recovery after challenge with CPXV did not allow us to discern any difference in vaccine efficacy between the most attenuated mutants studied. It is possible, however, that the use of lower challenge doses or other animal models would enable such a discrimination. On the other hand our results suggest that the major MVA deletions contribute to attenuation of this virus, but they cannot explain why high MVA doses are needed to achieve maximum vaccine potency. It is probably the failure of MVA to multiply in most mammalian hosts, including mice, which entails the requirement for high MVA vaccine doses. In contrast, our experimental data suggest that the VACV Lister deletion mutants that replicate in human cells (although more poorly in the case of Δ I) may be able to effectively vaccinate human subjects at a dose equivalent to that used for the traditional smallpox vaccine while displaying increased safety for immunocompromised and other contraindicated subjects.

Numerous studies of VACV mutants with single nonessential genes deleted have shown that the vast majority of these genes contribute to virulence in one animal model or another. However, few studies have examined the consequences of such attenuation for vaccine efficacy. Most of the attenuating deletions in the NYCBH and Wyeth strains, examined by Lee et al. (37), actually resulted in reduced immunogenicity at low vaccine doses, with the exception of a mutant with the TK gene deleted. On the other hand, deletion of the E3L gene, encoding a double-stranded RNA (dsRNA) binding protein, resulted in striking attenuation in a mouse model of severe combined immunodeficiency and considerable vaccine potency by scarification of immunocompetent mice despite the fact that the deletion mutant appeared inefficient at inducing VACV-neutralizing antibodies (31). Deletion of several genes encoding immunomodulatory functions from the Wyeth strain resulted in only moderate attenuation in an intracranial weanling mouse model, and most of the mutants maintained immunogenicity although no vaccine protection studies were performed (30). Deletion of the genes encoding serpin 1 (B22R; equivalent to ORF 008 in the Lister strain) and serpin 2 (B13R in VACV Cop) from the VACV WR strain led to significant attenuation, characterized by a delay in death after infection of nude mice and lack of pathogenicity in immunocompetent mice after intraperitoneal inoculation (38). The deletion viruses maintained their ability to induce potent humoral and

cell-mediated immune responses, but orthopoxvirus challenge infections were not performed. Deletion of region II in the Tian Tan strain of VACV resulted in attenuation in immunocompetent mice and immunity when used as a vaccine vector, but no challenge studies were performed (77). Recently, by recombinering the CVA genome in bacterial artificial chromosomes, Meisinger-Henschel et al. reported the construction of deletion mutants mirroring the major MVA deletions (46). They noticed only moderate attenuation of the deletion mutants in immunocompetent mice infected intranasally and identified region V as the major region involved. Their studies clearly indicate that the 6 major deletions in the MVA strain are not sufficient to account for the characteristic MVA phenotype and that other mutations, still to be identified, are needed. The CVA deletion mutants were, however, not examined for their ability to induce an immune response or protect mice from a challenge orthopoxvirus infection.

In conclusion, our results extend previous findings by demonstrating that considerable virus attenuation may be achieved for immunocompromised animals if multiple regions of the Lister genome are deleted. Despite this attenuation, the deletion mutants are able to induce VACV-specific immune responses and display vaccine potency similar to that of the traditional smallpox vaccine. Recent studies have shown that VACV multiplication may be a requirement in some instances for the induction of potent immune responses (53, 76). The combination of multiple deletions in a single virus makes it unlikely that the mutants revert to a virulent phenotype, thus providing a potentially safer yet efficient smallpox vaccine as well as the basis for the development of a novel VACV vector.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed in part by a grant from INSERM-Transfert. J.D. is the recipient of a Ph.D. scholarship from the Délégation Générale pour l'Armement.

We are grateful to Majid Mehtali for kindly providing the EB 14 chicken embryonic stem cell line and to Patrick Schultz, Jean-Louis Mandel, and Dino Moras for support.

REFERENCES

1. Alcamí, A., A. Khanna, N. L. Paul, and G. L. Smith. 1999. Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors. *J. Gen. Virol.* **80**:949-959.
2. Ali, A. N., P. C. Turner, M. A. Brooks, and R. W. Moyer. 1994. The SPI-1 gene of rabbitpox virus determines host range and is required for hemorrhagic pox formation. *Virology* **202**:305-314.
3. Amegadzie, B. Y., J. R. Sisler, and B. Moss. 1992. Frame-shift mutations within the vaccinia virus A-type inclusion protein gene. *Virology* **186**:777-782.
4. Antoine, G., F. Scheiffinger, F. Dorner, and F. G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**:365-396.
5. Bartlett, N., J. A. Symons, D. C. Tschärke, and G. L. Smith. 2002. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J. Gen. Virol.* **83**:1965-1976.
6. Beard, P. M., G. C. Froggatt, and G. L. Smith. 2006. Vaccinia virus kelch protein A55 is a 64 kDa intracellular factor that affects virus-induced cytopathic effect and the outcome of infection in a murine intradermal model. *J. Gen. Virol.* **87**:1521-1529.
7. Belyakov, I. M., et al. 2003. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:9458-9463.
8. Blanchard, T. J., A. Alcamí, P. Andrea, and G. L. Smith. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* **79**:1159-1167.
9. Bowie, A., et al. 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:10162-10167.

10. Buller, R. M., G. L. Smith, K. Cremer, A. L. Notkins, and B. Moss. 1985. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**:813–815.
11. Buttner, M., C. P. Czerny, K. H. Lehner, and K. Wertz. 1995. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**:237–250.
12. Davison, A. J., and B. Moss. 1989. Structure of vaccinia virus early promoters. *J. Mol. Biol.* **210**:749–769.
13. Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau. 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J. Gen. Virol.* **85**:2167–2175.
14. Earl, P. L., et al. 2004. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature* **428**:182–185.
15. Earl, P. L., et al. 2008. Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:10889–10894.
16. Falkner, F. G., and B. Moss. 1990. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **64**:3108–3111.
17. Fenner, F., D. A. Henderson, I. Arita, Z. Jezek, and I. D. Ladnyi (ed.). 1988. Smallpox and its eradication. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
18. Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, B. Meignier, D. Garin, and J. M. Crance. 2007. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine* **25**:8290–8297.
19. Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, J. N. Tournier, D. Garin, and J. M. Crance. 2007. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine* **25**:4809–4817.
20. Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, J. N. Tournier, D. Garin, and J. M. Crance. 2008. Short- and long-term immunogenicity and protection induced by non-replicating smallpox vaccine candidates in mice and comparison with the traditional 1st generation vaccine. *Vaccine* **26**:1794–1804.
21. Franchini, M., et al. 2004. Dendritic cells from mice neonatally vaccinated with modified vaccinia virus Ankara transfer resistance against herpes simplex virus type I to naive one-week-old mice. *J. Immunol.* **172**:6304–6312.
22. Garcel, A., J. M. Crance, R. Drillien, D. Garin, and A. L. Favier. 2007. Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J. Gen. Virol.* **88**:1906–1916.
23. Garcel, A., et al. 2008. Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine* **27**:708–717.
24. Gillard, S., D. Spehner, R. Drillien, and A. Kirn. 1986. Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:5573–5577.
25. Gomez, C. E., J. L. Najera, M. Krupa, and M. Esteban. 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* **8**:97–120.
26. Gubser, C., et al. 2007. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog.* **3**:e17.
27. Halseell, J. S., et al. 2003. Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naïve US military personnel. *JAMA* **289**:3283–3289.
28. Howard, A. R., A. S. Weisberg, and B. Moss. 2010. Congregation of orthopoxvirus virions in cytoplasmic A-type inclusions is mediated by interactions of a bridging protein (A26p) with a matrix protein (AT1p) and a virion membrane-associated protein (A27p). *J. Virol.* **84**:7592–7602.
29. Howley, P. M., D. Spehner, and R. Drillien. 1996. A vaccinia virus transfer vector using a GUS reporter gene inserted into the I4L locus. *Gene* **172**:233–237.
30. Jackson, S. S., et al. 2005. Role of genes that modulate host immune responses in the immunogenicity and pathogenicity of vaccinia virus. *J. Virol.* **79**:6554–6559.
31. Jentarra, G. M., et al. 2008. Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: scarification vaccination. *Vaccine* **26**:2860–2872.
32. Karjalainen, J., et al. 1983. Etiology of mild acute infectious myocarditis. Relation to clinical features. *Acta Med. Scand.* **213**:65–73.
33. Kato, S., M. Takahashi, S. Kameyama, and J. Kamahora. 1959. A study on the morphological and cyto-immunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD, and a consideration of the term "Guarnieri body." *Biken J.* **2**:353–363.
34. Kotwal, G. J., and B. Moss. 1988. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* **335**:176–178.
35. Kretzschmar, M., J. Wallinga, P. Teunis, S. Xing, and R. Mikolajczyk. 2006. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med.* **3**:e272.
36. Lathe, R., J. L. Vilotte, and A. J. Clark. 1987. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene* **57**:193–201.
37. Lee, M. S., et al. 1992. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J. Virol.* **66**:2617–2630.
38. Legrand, F. A., et al. 2004. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses by attenuated vaccinia virus vectors with deleted serpin genes. *J. Virol.* **78**:2770–2779.
39. Leparc-Goffart, I., et al. 2005. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* **32**:47–52.
40. Liu, L., et al. 2010. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat. Med.* **16**:224–227.
41. Martinez, M. J., M. P. Bray, and J. W. Huggins. 2000. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**:362–377.
42. Mayr, A., and K. Danner. 1978. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev. Biol. Stand.* **41**:225–234.
43. McKelvey, T. A., S. C. Andrews, S. E. Miller, C. A. Ray, and D. J. Pickup. 2002. Identification of the orthopoxvirus p4c gene, which encodes a structural protein that directs intracellular mature virus particles into A-type inclusions. *J. Virol.* **76**:11216–11225.
44. Meiser, A., C. Sancho, and J. Krijnse Locker. 2003. Plasma membrane budding as an alternative release mechanism of the extracellular enveloped form of vaccinia virus from HeLa cells. *J. Virol.* **77**:9931–9942.
45. Meisinger-Henschel, C., et al. 2007. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J. Gen. Virol.* **88**:3249–3259.
46. Meisinger-Henschel, C., et al. 2010. Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice. *J. Virol.* **84**:9907–9919.
47. Meng, X., et al. 2009. Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. *J. Virol.* **83**:10627–10636.
48. Meseda, C. A., et al. 2005. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology* **339**:164–175.
49. Meseda, C. A., et al. 2009. Comparative evaluation of the immune responses and protection engendered by LC16m8 and Dryvax smallpox vaccines in a mouse model. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**:1261–1271.
50. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* **72**:1031–1038.
51. Midgley, C. M., M. M. Putz, J. N. Weber, and G. L. Smith. 2008. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* **89**:2992–2997.
52. Moss, B. 2011. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* **239**:8–26.
53. Najera, J. L., C. E. Gomez, J. Garcia-Arriaza, C. O. Sorzano, and M. Esteban. 2010. Insertion of vaccinia virus C7L host range gene into NYVAC-B genome potentiates immune responses against HIV-1 antigens. *PLoS One* **5**:e11406.
54. Neyts, J., P. Leyssen, E. Verbeken, and E. De Clercq. 2004. Efficacy of cidofovir in a murine model of disseminated progressive vaccinia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2267–2273.
55. Paran, N., et al. 2009. Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox. *J. Infect. Dis.* **199**:39–48.
56. Phelps, A. L., A. J. Gates, M. Hillier, L. Eastaugh, and D. O. Ulaeto. 2007. Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine. *Vaccine* **25**:34–42.
57. Pires de Miranda, M., P. C. Reading, D. C. Tscharke, B. J. Murphy, and G. L. Smith. 2003. The vaccinia virus kelch-like protein C2L affects calcium-independent adhesion to the extracellular matrix and inflammation in a murine intradermal model. *J. Gen. Virol.* **84**:2459–2471.
58. Poirier, B., et al. 2005. Establishment of a national network of validated and qualified laboratories for neutralizing anti-vaccinia antibodies titration. *Biologicals* **33**:277–282.
59. Ramshaw, I. A., M. E. Andrew, S. M. Phillips, D. B. Boyle, and B. E. Coupar. 1987. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia virus/IL-2 recombinant infection. *Nature* **329**:545–546.
60. Reading, P. C., A. Khanna, and G. L. Smith. 2002. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* **292**:285–298.
61. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
62. Samuelsson, C., et al. 2008. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest.* **118**:1776–1784.
63. Sancho, M. C., S. Schleich, G. Griffiths, and J. Krijnse-Locker. 2002. The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J. Virol.* **76**:8318–8334.
64. Shisler, J. L., S. N. Isaacs, and B. Moss. 1999. Vaccinia virus serpin-1

- deletion mutant exhibits a host range defect characterized by low levels of intermediate and late mRNAs. *Virology* **262**:298–311.
65. **Staib, C., Y. Suezter, S. Kising, U. Kalinke, and G. Sutter.** 2006. Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J. Gen. Virol.* **87**: 2917–2921.
 66. **Stickl, H., et al.** 1974. MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA). *Dtsch. Med. Wochenschr.* **99**:2386–2392.
 67. **Stittelaar, K. J., et al.** 2005. Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus. *J. Virol.* **79**: 7845–7851.
 68. **Sutter, G., and B. Moss.** 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:10847–10851.
 69. **Tamin, A., J. Esposito, and D. Hruby.** 1991. A single nucleotide substitution in the 5'-untranslated region of the vaccinia N2L gene is responsible for both alpha-amanitin-resistant and temperature-sensitive phenotypes. *Virology* **182**:393–396.
 70. **Taylor, G., E. J. Stott, G. Wertz, and A. Ball.** 1991. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk⁺ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol.* **72**:125–130.
 71. **Vollmar, J., et al.** 2006. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine* **24**: 2065–2070.
 72. **Waibler, Z., et al.** 2007. Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses. *J. Virol.* **81**:12102–12110.
 73. **Williamson, J. D., R. W. Reith, L. J. Jeffrey, J. R. Arrand, and M. Mackett.** 1990. Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route. *J. Gen. Virol.* **71**:2761–2767.
 74. **Wyatt, L. S., et al.** 1998. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* **251**:334–342.
 75. **Wyatt, L. S., P. L. Earl, L. A. Eller, and B. Moss.** 2004. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:4590–4595.
 76. **Youn, J. W., et al.** 2008. Evidence for protection against chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees by immunization with replicating recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **82**:10896–10905.
 77. **Zhu, W., et al.** 2007. The attenuation of vaccinia Tian Tan strain by the removal of the viral M1L-K2L genes. *J. Virol. Methods* **144**:17–26.

1.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle de 5 délétions génomiques majeures, délétions I à V, de la souche MVA (figure 29), connue pour être fortement atténuée. Ces mêmes délétions ont été réalisées dans le génome du clone 107 du virus de la vaccine, un schéma expliquant la stratégie utilisée pour créer les délétions et la techniques de sélection des virus délétés sont décrites dans l'annexe 1. L'impact de chacune de ces délétions et des combinaisons de plusieurs d'entre elles, a été étudié sur la réplication de chaque virus muté correspondant dans des cellules humaines (HeLa), sur leur virulence chez des modèles murins immunodéprimés, sur leur immunogénicité et sur leur efficacité vaccinale contre une infection létale à cowpoxvirus chez un modèle murin immunocompétent.

Nous avons montré par l'infection de cellules HeLa, que les virus mutants se répliquaient en cellules humaines, contrairement à MVA qui est connu pour être non répliquatif en cellules humaines. Tous les virus ayant été mutés pour la délétion I (ΔI) se répliquent plus faiblement que le clone parental et que le vaccin Lister. Cette réduction de multiplication virale est associée à la délétion I. En effet, la réplication de ces virus mutants est 4 à 5 fois plus faible que le clone parental 107. Cette délétion est donc nécessaire au spectre d'hôte du virus en culture cellulaire.

La délétion I recouvre quatre cadres de lecture. La fonction de trois de ces gènes est inconnue alors que le gène List008 est identique au gène dénommé Spi-1 dans la souche WR du virus de la vaccine (Shisler *et al.*, 1999) et dans la souche rabbitpox (Brooks *et al.*, 1995). Ce gène code une protéine homologue à des protéines inhibitrices de protéases à sérine et il a été démontré que sa délétion dans le cadre de la souche WR et rabbitpox diminue la capacité de multiplication du virus dans les cellules humaines et entraîne une apoptose des cellules infectées (articles cités ci-dessus). Ainsi le gène Spi-1 pourrait être à la fois un facteur viral anti-apoptique et un facteur important pour le spectre d'hôte cellulaire mais les recherches effectuées jusqu'à présent n'ont pas permis de corrélérer ces deux phénotypes ou d'expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Le fait que la délétion I de la souche Lister 107 soit associée à une multiplication déficiente induirait que le gène List008 serait responsable du défaut de multiplication du virus dans les cellules humaines. L'explication moléculaire de ce déficit reste

cependant à être étudié. En définitif, les cellules humaines coderaient un facteur anti-viral appartenant au système de l'immunité innée dont l'activité serait inhibée par le gène List008 (Spi-1) afin que la multiplication virale soit optimale.

La réplication des candidats vaccins n'est pas altérée dans d'autres types cellulaires telles que les cellules EBxR ou les cellules de hamster BHK-21. Des titres élevés de virus ont été obtenus avec ces deux types cellulaires ce qui signifierait que les cellules d'autres espèces (oiseaux ou rongeurs) ne coderaient pas le même facteur ou la séquence de celui-ci serait différente et donc inactive sur le virus de la vaccine, permettant ainsi de produire le virus à un titre élevé.

Nous avons ensuite évalué la virulence des différents virus mutés dans des modèles murins immunodéprimés. Chez la souris Nude athymique, déficiente en cellules T mais possédant une immunité humorale, l'étude a montré, que seuls quatre virus délétés étaient assez atténués pour ne pas induire de mortalité, de perte de poids et diminuer fortement le nombre de pustules secondaires (0 à 2 pustules en moyenne chez ces animaux contre plus de 8 pustules en moyenne chez les animaux vaccinés avec VACV-Lis et VACV-Lis 107 au moment de leur décès). Cela semble associé à la présence de trois mutations : Δ II, Δ III et Δ V. En effet, les animaux inoculés avec les virus Δ I,II,III,V ; Δ II,III,V ; Δ II,III,IV,V et Δ I,II,III,IV,V (Δ I-V) ont une prise de poids similaire aux souris témoins (non infectées). Ces candidats ont ensuite été inoculés à des souris SCID (déficientes en cellules T et B en raison d'un déficit enrégulation VDJ de leur récepteur) et ont induit une légère perte de poids, mais aucune mortalité n'a été observée pendant la durée de l'expérimentation (56 jours) alors que les souris vaccinées avec le vaccin de 1^{ère} génération ou le clone 107 ont toutes succombées après une trentaine de jours.

Enfin, ces quatre virus mutants induisent une immunogénicité et une protection similaires à celles du clone parental 107 et du vaccin historique chez un modèle murin immunocompétent.

Une étude menée au laboratoire par le Dr Audrey Rembert, sur le vaccin de 3^{ème} génération MVA (Ferrier-Rembert *et al.*, 2008) a montré que MVA était aussi efficace que le vaccin de 1^{ère} génération à court terme, tout comme nos candidats vaccins décrits

dans ce travail. Mais cette même étude, a mis en évidence que la protection des animaux immunisés avec MVA à long terme n'était que partielle, nécessitant ainsi un rappel de vaccination. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette perte d'efficacité après 5 mois de vaccination pourrait être l'incapacité de MVA à se répliquer en cellules de mammifère. Nos candidats vaccins étant répliatifs en cellules humaines, nous pourrions ainsi éviter une vaccination secondaire.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent que l'on peut obtenir une souche vaccinale fortement atténuée à partir de la souche vaccinale Lister, en reproduisant le schéma de délétion de la souche MVA. Le même travail a été réalisé à partir de la souche parentale de MVA : CVA (Meisinger-Henschel *et al.*, 2010), mais la délétion des six principales régions génomiques de MVA n'a pas suffi à atténuer le virus CVA et obtenir le même phénotype que MVA en culture cellulaire. Les auteurs de ce travail pensent qu'outre les régions délétées connues, des mutations plus restreintes, voire ponctuelles observées dans de nombreux gènes, seraient à l'origine de la perte de capacité de MVA à se répliquer en cellules humaines et pourraient expliquer l'absence de virulence avec MVA.

Deux candidats vaccins ressortent de cette étude, étant aussi immunogènes et efficaces que le vaccin traditionnel et ayant une innocuité proche du candidat vaccinal MVA. Ces deux virus, délétés respectivement des régions I,II,III,V et I,II,III,IV,V semblent être des candidats intéressants pour compléter la gamme actuelle des vaccins de 3^{ème} génération.

Après une analyse minutieuse de tous les résultats obtenus au cours de ce travail, il s'est avéré que le candidat vaccin nommé **ΔI,II,III,V** semble être le virus mutant le plus atténué en culture cellulaire humaine et le plus efficace en termes d'immunogénicité et de protection. Nous avons décidé de le renommer **MVL** pour **Modified Vaccinia Lister**, en référence au virus MVA : Modified Vaccinia Ankara.

2. Développement d'un vaccin bivalent antivariolique et anti-Ebola

2.1. Le vecteur virus de la vaccine contre les maladies émergentes et le cancer

Le virus de la vaccine est depuis longtemps utilisé comme vecteur viral, en raison de sa stabilité une fois cryodesséché, de sa facilité de production et d'administration. Le génome des orthopoxvirus est un ADN simple brin de 200kpb. Les orthopoxvirus sont bien caractérisés et sont un fabuleux outil de génie génétique. Ils sont capables de supporter l'insertion d'un long fragment d'ADN hétérologue (jusqu'à 25 kpb) et de l'exprimer comme s'il s'agissait de l'une de leurs protéines, dans le cytoplasme de la cellule infectée, sans que l'information génétique ne soit intégrée au génome de l'hôte et sans que cela n'affecte sa réplication.

Le virus de la vaccine est très stable génétiquement ce qui est aussi un critère important dans le choix du vecteur viral utilisé et comme on a pu le montrer dans le premier chapitre de cette partie expérimentale, il est possible d'obtenir une bonne innocuité en délétant le vecteur de certains gènes impliqués dans la virulence.

Le virus de la vaccine souche Copenhague a été le premier orthopoxvirus utilisé comme vecteur viral pour un vaccin à usage vétérinaire, Raboral V-RG ®. La glycoprotéine du virus de la rage a été clonée dans le génome du virus au niveau du locus de la thymidine kinase (Pastoret & Brochier, 1996; Wiktor *et al.*, 1984). Ce vaccin administrable par voie orale a permis d'éradiquer la rage vulpine dans plusieurs pays d'Europe occidentale.

Un vaccin à usage humain, dérivé de la souche Wyeth (vaccin Dryvax), a ensuite été développé contre le cancer de la prostate, en clonant un antigène spécifique des cellules tumorales de la prostate, associé à des facteurs de costimulation du système immunitaire afin d'amplifier la réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses. Les résultats de l'essai clinique ont été publiés récemment (Kantoff *et al.*, 2010) et montrent que le taux de mortalité du cancer aurait diminué de 44% et que la durée de vie des malades pourrait être augmentée de 5 à 8 mois.

Toutefois le fait d'utiliser un vecteur viral vivant peut engendrer des problèmes de dissémination du virus comme cela a été le cas avec le vaccin antirabique. Des cas d'infection d'humains en contact avec les animaux sauvages vaccinés ou les appâts, ont été rapportés (CDC, 2009b; Rupprecht *et al.*, 2001).

En raison des risques de santé publique, une grande partie de la population n'étant pas immunisée contre les orthopoxvirus, les études se portent désormais sur le développement de vecteurs viraux atténués, non répliatifs en cellules humaines, tel le virus MVA. De nombreux travaux ont démontré que le système de vectorisation de l'antigène avec MVA est sans danger et induit des réponses immunitaires partiellement protectrices contre différentes pathologies d'origine virale (VIH), bactérienne (tuberculose), parasitaire (malaria, toxoplasmose, leishmaniose) ou cancéreuse (Gomez *et al.*, 2011; Walsh & Dolin, 2011). Une partie des essais précliniques et cliniques en cours sur les vaccins utilisant un vecteur viral MVA sont listés dans l'annexe 2.

Un autre virus de la vaccine a été développé comme vecteur viral, il s'agit du vecteur NYVAC. Il a été développé aux Etats-Unis par Virogenetics. Il dérive de la souche Copenhague, dont le génome a été délété de 18 gènes (Tartaglia *et al.*, 1992). Il s'agit pour l'essentiel de facteurs impliqués dans la pathogénicité et dans la virulence des orthopoxvirus tels que des facteurs de modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et des facteurs impliqués dans la réplication du virus. Cette souche n'est plus capable de se propager dans l'hôte infecté (étude menée chez la souris immunodéficente) et sa capacité à se répliquer en cellules humaines a considérablement diminué.

Le premier essai clinique concernant l'utilisation de NYVAC comme vecteur viral est un candidat vaccin contre la malaria. Sept gènes du parasite *Plasmodium falciparum*, parasite responsable de la maladie, ont été clonés dans le vecteur NYVAC (Ockenhouse *et al.*, 1998). Les résultats ont montré que NYVAC avait une bonne innocuité et pouvait être utilisé comme vecteur. Des candidats vaccins sont maintenant en cours de développement contre des pathologies d'origine virales (VIH, rage) ou cancéreuse. Les différents essais cliniques en cours sont listés dans l'annexe 2.

Nous avons décidé d'utiliser cette capacité du virus de la vaccine à exprimer un gène hétérologue, pour développer un vaccin bivalent antivariolique et anti-virus Ebola.

Le virus de la vaccine avait déjà été utilisé comme vecteur viral pour exprimer la glycoprotéine du virus Ebola (Gilligan, 1997). Le clonage de différentes protéines du virus Ebola (NP, VP35, VP40, GP et la sGP) avait permis d'exprimer les protéines dans le cytoplasme cellulaire (lysats de cellules infectées analysés par Western Blot) mais le taux d'anticorps induit par la vaccination des cobayes avec les différents virus

recombinants était faible. Les animaux n'étaient que partiellement protégés contre une épreuve létale : la construction contenant uniquement la GP avait permis de protéger 3 cobayes sur 5 alors que les autres constructions n'avaient pas protégé les rongeurs. Une étude ultérieure chez le singe, montre que la construction avec la GP d'Ebola n'était pas protectrice bien que des anticorps neutralisants anti-GP aient été détectés avant le challenge (Geisbert *et al.*, 2002b). Cette stratégie a été abandonnée. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet échec :

- une trop faible expression de la GP du virus Ebola en raison de l'utilisation du promoteur p7.5, promoteur relativement faible.
- l'utilisation du locus de la thymidine kinase qui ne serait alors pas adapté à l'expression de la GP du virus Ebola.
- l'absence de la GP d'Ebola sur l'enveloppe du virus recombinant
- une mauvaise présentation de la GP d'Ebola aux anticorps, à la surface de la cellule, ne permettant pas d'induire une réponse protectrice efficace.

Dans un travail précédent, Katz et son équipe avaient développé un virus de la vaccine exprimant l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe du VIH (HIV-1 *env*) et produisant des virus ayant incorporé cette protéine virale dans leur enveloppe (Barchichat & Katz, 2002; Katz *et al.*, 1997). Cette incorporation a été possible en construisant un virus recombinant dont le génome a intégré un gène chimérique codant pour la partie ectoplasmique de la protéine d'enveloppe du VIH et pour les domaines transmembranaire et cytoplasmique de la principale protéine d'enveloppe des formes EEV du virus de la vaccine, nommée B5. Ce virus recombinant était capable d'induire chez le lapin des anticorps spécifiques de l'antigène d'enveloppe du VIH.

Notre objectif a été de réaliser un tel type de construction avec l'ectodomaine de la GP de ZEBOV pour induire une réponse immunitaire protectrice efficace.

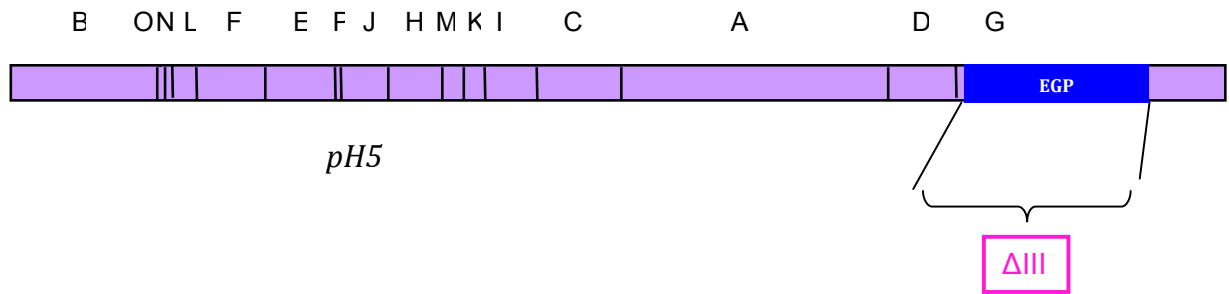
Nous avons décidé d'utiliser le virus MVL, développé au laboratoire, pour construire ce candidat vaccin, pour les raisons suivantes :

- le vecteur MVL répliquatif a été montré plus immunogène que le vecteur MVA non répliquatif et devrait donc être plus immunogène vis-à-vis de la GP d'Ebola

- le vecteur MVL n'ayant pas entraîné de morbidité évidente chez la souris immunodéficiente, avait une innocuité qui pourrait être acceptable pour le développement d'un vaccin chez l'homme
- Un brevet ayant été déposé pour ce vecteur, son utilisation pour le développement d'un vaccin contre Ebola revêtait un caractère d'originalité à exploiter (Brevet déposé le 19 septembre 2008 ; N°EP08305570.7).

Enfin, dans un communiqué de presse paru le 13 octobre 2010, les laboratoires Bavarian-Nordic ont annoncé un nouveau projet subventionné par le National Institute of Health (NIH, Etats-Unis) concernant le développement d'un vecteur viral de type MVA (MVA-BN®) multivalent exprimant plusieurs glycoprotéines de filovirus (de genre *Ebolavirus* et *Marburgvirus*). Ce développement subventionné par le NIH, d'un candidat vaccin de type virus de la vaccine par une firme pharmaceutique montrait que notre stratégie vaccinale pouvait être prometteuse.

A



B

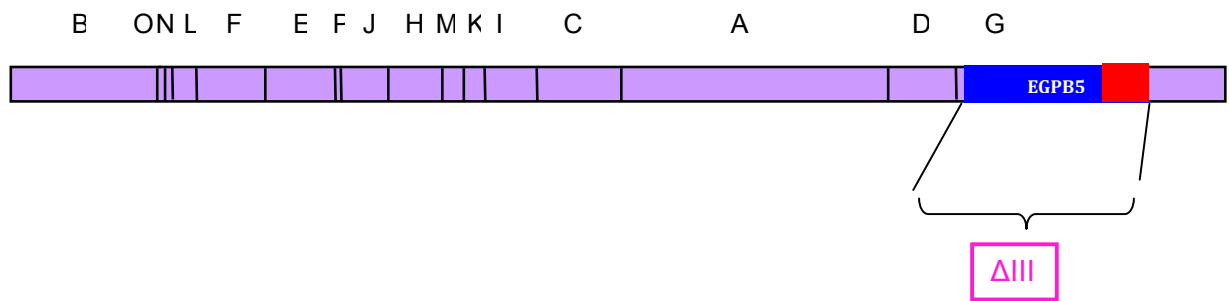


Figure 30 : Représentation schématique des constructions EGP et EGPB5. (A) EGP : gène entier de la GP du virus Ebola vacciné et sous le contrôle du promoteur pH5, flanqué des extrémités de la délétion III (Del III) pour l'insertion dans le locus de la délétion III. (B) EGPB5 : gène chimérique de l'ectodomaine de la GP du virus Ebola fusionné aux domaines transmembranaire et cytoplasmique de B5, vacciné et flanqué des extrémités de la délétion III.

2.2. Résultats expérimentaux

2.2.1. Construction des virus recombinants

Nous avons choisi d'exprimer la GP du virus Ebola Zaïre (GP), souche Mayinga de 1976 (numéro GenBank: AF086833, (Volchkov *et al.*, 2001)). Il s'agit de la souche la plus meurtrière jusqu'à aujourd'hui.

Le gène de la GP d'Ebola a été modifié pour déléter le signal d'édition responsable de l'initiation de l'expression de la forme non structurale secrétée : sGP (Volchkov *et al.*, 2001) puis « vacciné » : les codons sont optimisés pour être compatibles avec la réplication du virus de la vaccine par enrichissement de la séquence nucléotidique en A et T (68% naturellement dans les codons) grâce au logiciel VectorNTi, de façon à ce que les acides aminés correspondant aux nouveaux codons ne soient pas modifiés (propriété de répétition du code génétique).

Nous avons décidé d'insérer le gène de la GP d'Ebola dans le génome de MVL au locus correspondant à la délétion III et d'utiliser le promoteur précoce/tardif pH5 du gène H5R du virus de la vaccine, codant pour une protéine multifonctionnelle impliquée dans la réplication, la transcription et la morphogénèse des virions du virus de la vaccine (D'Costa *et al.*, 2010).

Nous avons choisi de faire deux constructions afin de pouvoir estimer l'intérêt de l'expression du gène de fusion par rapport au gène entier de la GP d'Ebola, par le vecteur viral (figure 30) :

- une construction dite « classique » dans laquelle le gène entier de la GP est inséré dans le génome au locus de la délétion III : **MVL-EGP**
- une construction dite « chimérique » dans laquelle, un gène de fusion entre l'ectodomaine de la GP et les domaines transmembranaire et intracytoplasmique de la glycoprotéine B5 du virus de la vaccine, est cloné dans le génome du virus de la vaccine au niveau de la délétion III : **MVL-EGPB5**

B5 est une protéine membranaire glycosylée de type I, comme la GP du virus Ebola. La synthèse de la protéine B5 passe par une étape de maturation dans le Golgi,

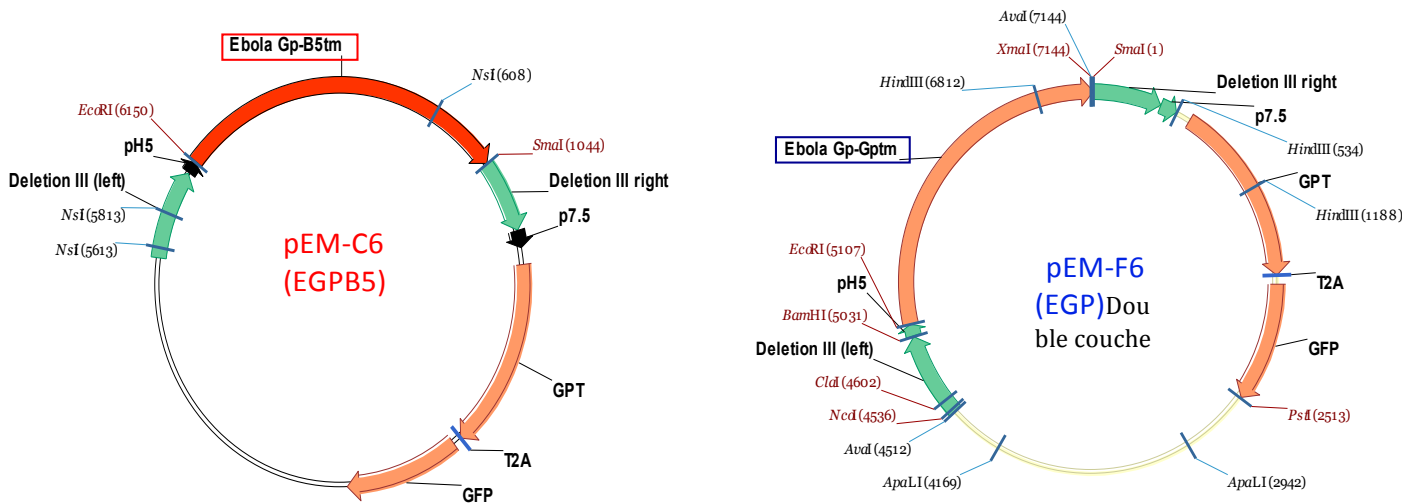


Figure 31 : Carte de restriction des plasmides utilisés pour la construction des virus recombinants. (logiciel Vector Nti)

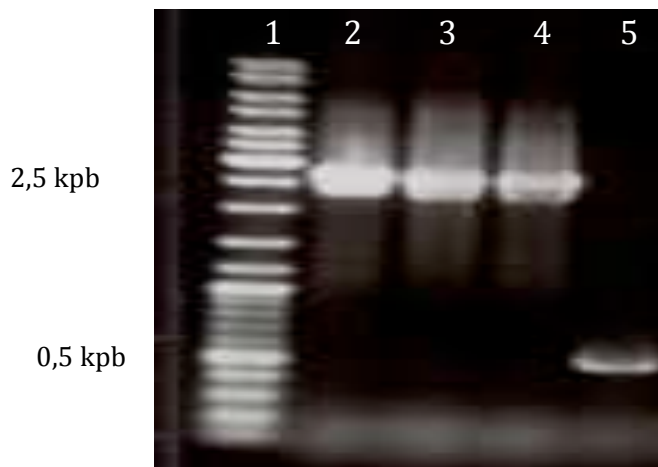


Figure 32 : Les plages de lyse isolées sont pures et les virus ont inséré le gène hétérologue dans leur génome. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec un lysat cellulaire de l'isolement d'une plaque de lyse. Des plages de lyse isolées de virus recombinants sont à nouveau récoltées et analysées par PCR. Piste 1 : PM, piste 2 : MVL-EGPB5, piste 3 : MVL-EGP (1), piste 4 : MVL-EGP (2), piste 5 : MVL-EGP (3). La bande à 2,5 kpb sur le gel d'agarose correspond à EGP/EGPB5 flanquées des extrémités de la délétion III, la bande à 0,5 kpb correspond aux extrémités de la délétion III. Les amorces utilisées ciblent les extrémités de la délétion III et sont décrites dans l'article (Dimier *et al.*, 2011).

puis une fraction de B5 est transportée jusqu'à la membrane de la cellule infectée par le réseau *trans*-golgien, comme pour la GP du virus Ebola. Dans le cas de B5 une fraction importante de B5 reste cependant associée à l'appareil de Golgi où elle est incorporée dans la double enveloppe virale, dérivée du Golgi, qui entoure les particules matures du virus de la vaccine. Ces virions doublement enveloppés perdent une des enveloppes d'origine Golgienne lors de leur fusion à la membrane cellulaire ce qui libère des virus ayant une seule enveloppe (EEV) et pourvus de B5 à leur surface. Cette prédisposition à se trouver à la surface de l'EEV est due à un signal de rétention de la protéine dans l'appareil de Golgi codé dans la séquence nucléotidique au niveau du domaine transmembranaire de B5 (Katz *et al.*, 1997).

En réalisant la fusion entre l'ectodomaine de la GP et les domaines transmembranaire et intracytoplasmique de B5, la protéine de fusion EGPB5 devrait suivre la même voie de maturation que B5 et serait alors adressée à la surface des virus enveloppés dans les cellules infectées par MVL. Ainsi, les réponses immunitaires anti-Ebola pourraient être plus fortes et plus efficaces.

Ces deux gènes ont été synthétisés par Proteogenix (Illkirch) et clonés dans un plasmide bactérien nommé pEM8 (fourni par le Dr Robert Drillien) par ligation *in vitro* (extrémités EcoRI-SmaI). Les plasmides ont été amplifiés en bactéries compétentes *E. coli* DH5 α . Les plasmides une fois clonés sont renommés : le plasmide possédant l'insert EGPB5 est nommé **pEM-C6**, et le plasmide possédant l'insert EGP est renommé **pEM-F6** (Figure 31).

Des cellules de hamster BHK21 ont ensuite été infectées avec le virus de la vaccine MVL, développé au laboratoire (décrit ci-dessus) et transfectées avec l'un de ces deux plasmides. Puis des virus issus de la recombinaison en culture cellulaire avec les plasmides ont été isolés grâce aux gènes de sélection présents sur les plasmides à savoir le gène codant la guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase (GPT sélectionné avec l'acide mycophénolique) et le gène codant la protéine verte fluorescente (ou green fluorescent protein, GFP, repérée au microscope à fluorescence). Ces premiers virus recombinants ont ensuite été amplifiés en absence de pression sélective (sans acide mycophénolique) de façon à permettre la perte des gènes GPT et GFP et le maintien de l'insert codant la GP d'Ebola ou la GP fusionnée à B5. L'ADN de ces virus recombinants a ensuite été vérifié par PCR avec des amorces ciblant les régions flanquantes de la

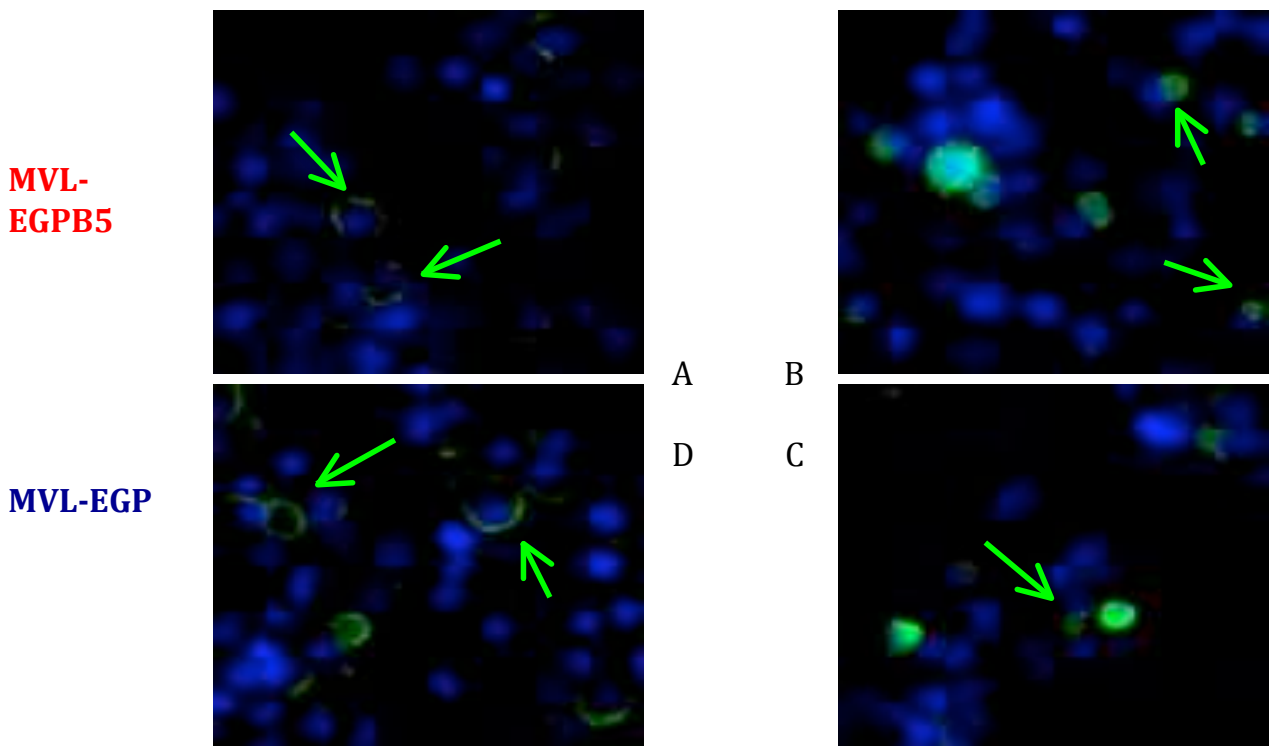


Figure 33 : Les virus recombinants expriment le gène d'EGP ou d'EGPB5. L'analyse de l'expression des protéines EGP et EGPB5 est réalisée en immunofluorescence. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec les virus recombinants à une moi de 1. Seize heures après, les cellules sont fixées avec du PFA 4% et perméabilisées avec du triton X-100 (image A et C) ou non traitées (images B et D) puis la GP est marquée par couplage d'un anticorps monoclonal anti-GP du virus Ebola avec un anticorps secondaires anti-IgG de souris, lui même couplé à l'Alexa 546. La fluorescence est observée avec un microscope à fluorescence.

délétion III (décrites dans l'article (Dimier *et al.*, 2011)). Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose (figure 32). Le premier puits contient le marqueur de poids moléculaire. La piste 2 contient l'ADN du virus MVL-EGPB5 ; les pistes 3, 4 et 5 contiennent l'ADN de trois virus MVL-EGP isolés après six purifications successives. Sur les quatre virus MVL-EGPB5 et MVL-EGP, trois sont purs (piste 2, 3 et 4) et possèdent l'insert (EGPB5 ou EGP), alors que l'on observe une bande de poids moléculaire plus faible (environ 0,5 kilo paires de bases - kpb) sur la piste 5, signifiant que ce virus a perdu son insert lors des étapes de purification ou n'avait pas d'insert initialement. Les virus des pistes 2 (MVL-EGPB5) et 3 (MVL-EGP) seront utilisés dans la suite de ces travaux.

2.2.2. Caractérisation des virus en culture cellulaire

Les virus sont produits en cellules BHK-21. Nous avons pu observé à plusieurs reprises que le virus MVL-EGP se répliquait deux fois plus que le virus MVL-EGPB5. Nous avons toutefois obtenu les mêmes titres de virus que la souche virale parentale MVL (jusqu'à 10^9 pfu de virus après purification de la culture virale par ultracentrifugation).

La caractérisation de l'expression d'EGP classique par le virus MVL-EGP ou d'EGPB5 chimérique par le virus MVL-EGPB5 est effectuée en culture cellulaire, par quatre techniques différentes : immunofluorescence, immunohistochimie, Western Blot et microscopie électronique.

2.2.2.1. Analyse par immunofluorescence

L'expression de la GP du virus Ebola est détectée par immunofluorescence indirecte. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec les virus recombinants MVL-EGP et MVL-EGPB5 à une multiplicité d'infection (moi) de 1,0 pfu par cellule. Après 16 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis marquées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la GP d'Ebola espèce Zaïre (mAc α -ZEBOV GP). Les cellules sont lavées puis marquées avec un anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines G (IgG) de souris, couplé à un fluorochrome, l'Alexa Fluor 546. Nous avons pu observer la fluorescence au niveau de la surface des cellules infectées, ce qui signifie qu'EGP et EGPB5 sont bien synthétisées respectivement par les virus MVL-EGP et MVL-EGPB5 et semblent adressées à la surface des cellules infectées correspondantes pour être

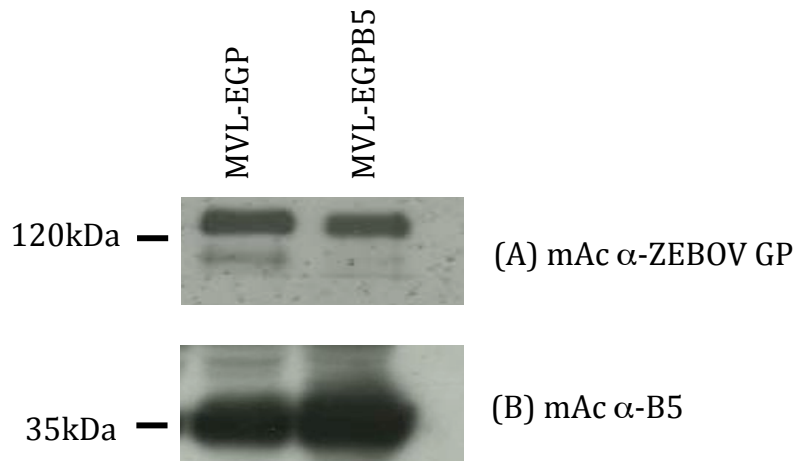


Figure 34 : Les glycoprotéines EGP et EGPB5 sont détectées sur les enveloppes d'EEV en western blot. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec MVL-EGP ou MVL-EGPB5 à une moi de 0,1. 24 heures après infection, les surnageants de culture sont prélevés et les particules EEV concentrées par ultracentrifugation 2h à 49000g. Les culots de virus sont repris dans du tampon Tris 10mM pH8. Les protéines virales sont dénaturées dans du Laemmli 5 minutes à 95°C et analysées par western blot avec les anticorps indiqués. (A) La bande est à environ 120kDa. (B) La bande est a environ 35kDa.

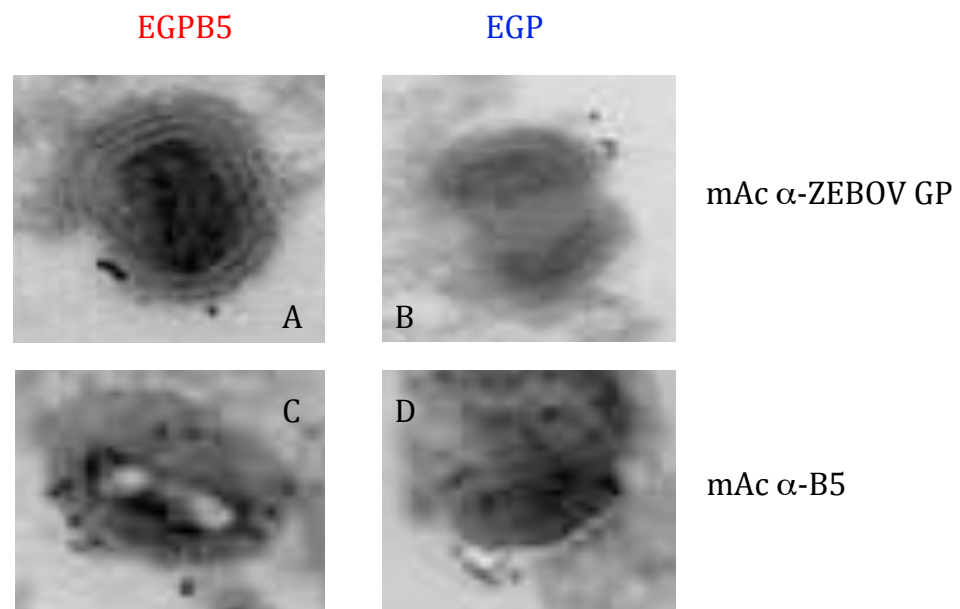


Figure 35 : Les particules EEV de MVL-EGP et de MVL-EGPB5 ont incorporé respectivement EGP et ou EGPB5 dans leur enveloppe. La détection des glycoprotéines EGP et EGPB5 est réalisée par immunomarquage. Des cellules BHK-21 ont été infectées avec MVL-EGP ou MVL-EGPB5 à une moi de 5. 24 heures après infection, les cellules sont fixées puis découpées en fine section avec un cryomicrotome. Les particules sont marquées avec les anticorps indiqués couplés à des particules d'or ultra small. Les glycoprotéines sont marquées (points noirs sur les images) avec l'anticorps indiqué.

présentées aux anticorps (Figure 33 B et D). Nous avons pu aussi observer une fluorescence au niveau périnucléaire, (figure 33 A et C), lorsque les cellules sont perméabilisées par traitement chimique (Triton X100) ce qui correspondrait à une localisation au niveau de l'appareil de Golgi.

2.2.2.2. Analyse par immunohistochimie

Pour réaliser le titrage des virus, des cellules BHK-21 sont infectées avec l'un des (4%) et les virus sont détectés avec l'anticorps mAc α -ZEBOV GP. Cet anticorps est ensuite détecté par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à une peroxydase, la horseradish peroxidase (HRP). En présence du substrat de la HRP, la plage de lyse prend une couleur brune. Cela nous a permis de voir que les constructions MVL-EGP et MVL-EGPB5 étaient stables : 98 à 100% des plages de lyses sont brunes, sur trois passages de virus successifs.

2.2.2.3. Analyse par Western Blot

Des cellules BHK-21 ont été infectées avec l'un des deux virus recombinants à une moi de 0,1. Vingt-quatre heures après infection, les cellules sont arrondies (effet cytopathique). Le surnageant de culture est prélevé afin de récupérer les formes virales extracellulaires enveloppées (EEV). Les particules virales sont concentrées par une ultracentrifugation à 49000 g pendant une heure. Les particules virales sont dénaturées dans du tampon de Laemmli et déposées sur un gel SDS-PAGE, puis les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les protéines sont marquées avec le mAc α -ZEBOV GP et avec un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre B5 (mAc α -B5) pour vérifier la présence des formes EEV (la protéine B5 n'étant naturellement exprimée que sur l'enveloppe des EEV). Après révélation, on peut apercevoir une bande aux environs de 120 kDa sur le film (figure 34) correspondant à la membrane marquée avec le mAc α -GP et une bande aux environs de 35 kDa pour la membrane marquée avec le mAc α -B5. Ces résultats suggèrent que les deux protéines sont incorporées sur l'enveloppe des EEV sans différence significative entre les deux constructions MVL-EGPB5 et MVL-EGP. De plus, EGP et EGPB5 ont un poids moléculaire d'environ 120 kDa, correspondant à la forme glycosylée de la glycoprotéine du virus

Ebola (poids moléculaire de 75 kDa lorsqu'EGP n'est pas glycosylée (Chan & Ward, 2012)).

2.2.2.4. Analyse par microscopie électronique

La présence d'EGP ou d'EGPB5 sur les particules virales enveloppées a aussi été analysée par microscopie électronique après un immunomarquage avec des particules d'or (Dr Danièle Spohner, IGBMC, Illkirch). Des cellules infectées sont fixées et les particules virales EEV à la périphérie des cellules sont marquées avec le mAc α -ZEBOV GP ou avec un anticorps polyclonal dirigé contre B5.

Nous pouvons observer (Figure 35) qu'EGP et EGPB5 sont incorporées dans l'enveloppe des particules virales mais en faible quantité, moins d'une glycoprotéine révélée en moyenne par EEV (0,41 et 0,71 pour respectivement MVL-EGPB5 et MVL-EGP), sans différence significative entre MVL-EGPB5 et MVL-EGP ($P \geq 0,05$; *test de student*). D'autre part, nous observons une diminution du nombre de glycoprotéines B5 détectables sur les particules virales enveloppées des virus recombinants comparé aux particules EEV de MVL (résultats non montrés). D'autre part, il semblerait qu'il y ait plus de protéines B5 détectables sur les virions MVL-EGP que sur les virions MVL-EGPB5 ($8,77 \pm 3,3$ et $6,36 \pm 5,8$ pour MVL-EGP et MVL-EGP B5 ; $P < 0,05$ *test de student*), ce qui signifie que la construction EGPB5 pourrait probablement gêner l'incorporation de la protéine B5 native sur la membrane des particules virales MVL-EGPB5.

En conclusion, les deux virus recombinants possèdent la glycoprotéine d'Ebola à la surface des virions enveloppés mais en faible quantité. La forme fusionnée EGPB5, dans laquelle un signal d'adressage à la surface des virions enveloppés de la vaccine a été ajouté, n'a pas donné le résultat attendu. En effet, les glycoprotéines détectées sur MVL-EGPB5 ne sont pas significativement plus nombreuses que celles détectées sur les virions MVL-EGP.

2.2.3. Evaluation de l'innocuité des virus recombinants

Le virus MVL, vecteur viral utilisé pour la construction des virus recombinants, s'est montré non virulent dans un modèle murin immunodéprimé, la souris Nude (Dimier *et al.*, 2011). Afin de déterminer si l'insertion de la glycoprotéine de l'espèce Zaïre du virus Ebola ne modifie pas l'innocuité de MVL chez le modèle murin, nous avons vacciné des souris Nude avec une dose de 10^5 pfu de MVL-EGP ou de MVL-EGPB5

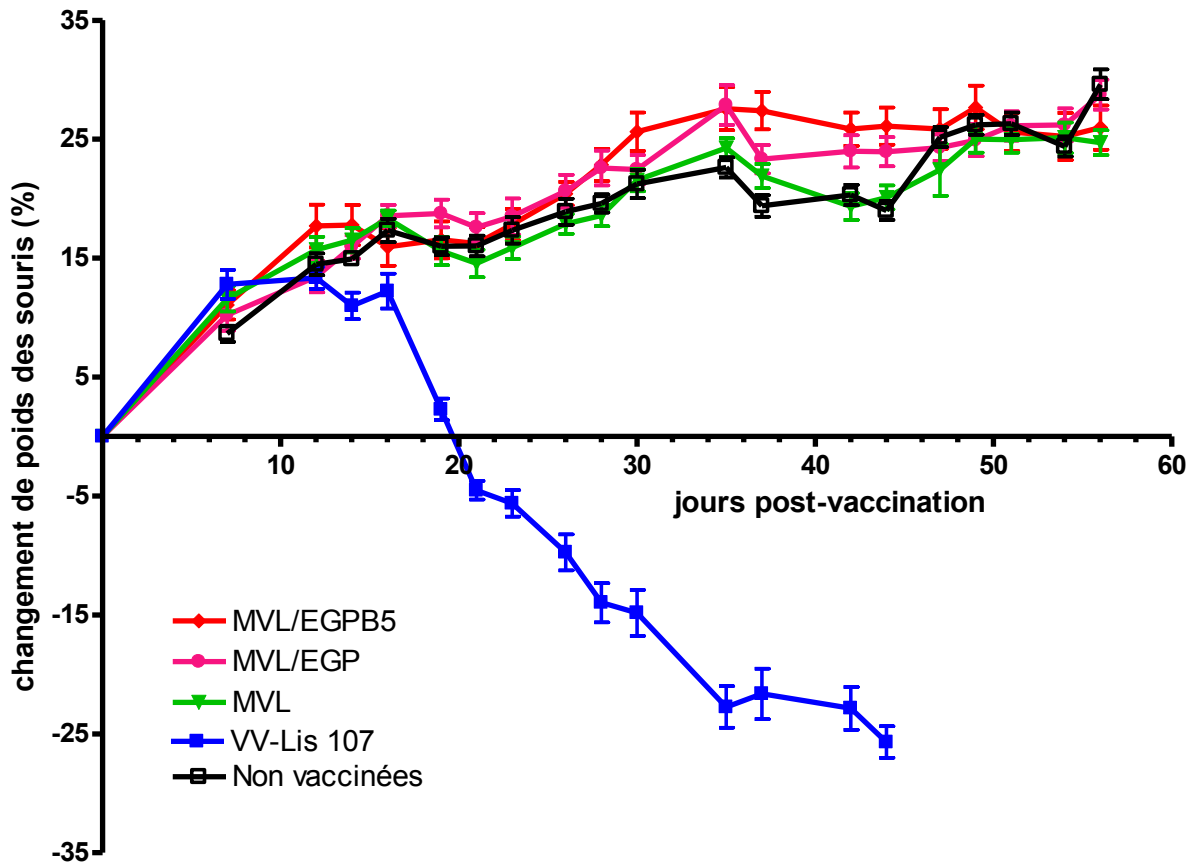


Figure 36 : L'insertion du gène d'EGP ou d'EGPB5 dans le génome de MVL n'altère pas l'innocuité du vecteur viral MVL. Des groupes de 6 souris Nude ont été inoculées avec les candidats vaccins par scarifications à la base de la queue. Les signes cliniques d'infection et le changement du poids ont été observés pendant 56 jours.

(dose vaccinale utilisée chez l'homme pour la vaccination antivariolique) par scarification à la base de la queue. Les souris ont été observées et pesées pendant 56 jours (Figure 36). Aucun signe clinique n'a été observé chez les souris vaccinées avec les candidats vaccins recombinants. De plus, comme pour les souris non vaccinées et les souris vaccinées avec MVL, aucune perte de poids n'est observée chez les souris vaccinées avec MVL-EGP et MVL-EGPB5, contrairement aux souris témoins, vaccinées avec la souche virale parentale à l'origine du vecteur viral, VACV-Lis 107. Tous les animaux vaccinés avec ce dernier sont décédés après 44 jours (Figure 36).

Ces résultats démontrent que l'insertion du gène de la glycoprotéine du virus Ebola dans le génome viral n'a pas modifié l'innocuité du virus de la vaccine MVL, considéré comme un virus de classe 2. Après ces travaux, le Haut Conseil des Biotechnologies a accepté le déclassement de nos candidats vaccins de niveau de sécurité biologique 3 au niveau 2, ce qui nous a permis de réaliser la suite de cette étude en laboratoire P2 et en animalerie A2.

2.2.4. Evaluation des réponses immunitaires humorales anti-vaccine et anti-glycoprotéine du virus Ebola

Afin d'évaluer l'immunogénicité des candidats vaccins bivalents, deux groupes de six souris ont été vaccinées par scarification à la base de la queue avec trois doses différentes de virus recombinant MVL-EGP ou MVL-EGPB5 (3, 4, 5 et 6 log DICT₅₀). Vingt-huit jours après vaccination, le sang des souris a été prélevé par ponction intracardiaque et le sérum isolé, décomplémenté à 56°C et testé pour la présence d'anticorps anti-GP du virus Ebola et anti-virus de la vaccine par un test ELISA (sera dilués au 1/20). Les résultats (figure 37A) indiquent que la vaccination a induit une réponse humorale spécifique anti-GP d'Ebola chez quasiment toutes les souris quelle que soit la dose utilisée (seulement deux souris vaccinées avec 3 log DICT₅₀ de virus MVL-EGPB5 sont séronégatives). De même, toutes les souris vaccinées, quelle que soit la dose inoculée, sont séropositives pour la présence d'anticorps anti-vaccine (figure 37B).

En comparant les titres en anticorps anti-GP d'Ebola des souris vaccinées avec 5 log DICT₅₀ (dose classique du vaccin antivariolique) des deux candidats vaccins bivalents (figure 38A), on peut observer que les deux virus recombinants induisent une réponse humorale spécifique forte anti-GP du virus Ebola et que le titre moyen induit par la vaccination avec MVL-EGP est nettement supérieur à celui induit par MVL-

EGPB5 : 8333 ± 2610 pour MVL-EGP contre 1604 ± 1306 pour MVL-EGPB5 ($P < 0,0001$; *test de student*).

Nous avons aussi mesuré une réponse humorale anti-vaccin forte (figure 38B) induite par les candidats vaccins recombinants. Le titre moyen en anticorps anti-vaccin induit par le candidat MVL-EGPB5 est plus fort que celui des souris vaccinées avec MVL-EGP, respectivement 7019 ± 2863 et 2093 ± 2071 ($P < 0,01$; *test de student*). Le titre IgG anti-VACV pour les souris vaccinées avec le virus VACV-Lis, est en moyenne de 1737 ± 1191 et de 2417 ± 2822 pour les souris vaccinées avec MVL. Ces résultats suggèrent que la réponse humorale anti-vaccin n'est pas altérée par l'insertion de la glycoprotéine hétérologue.

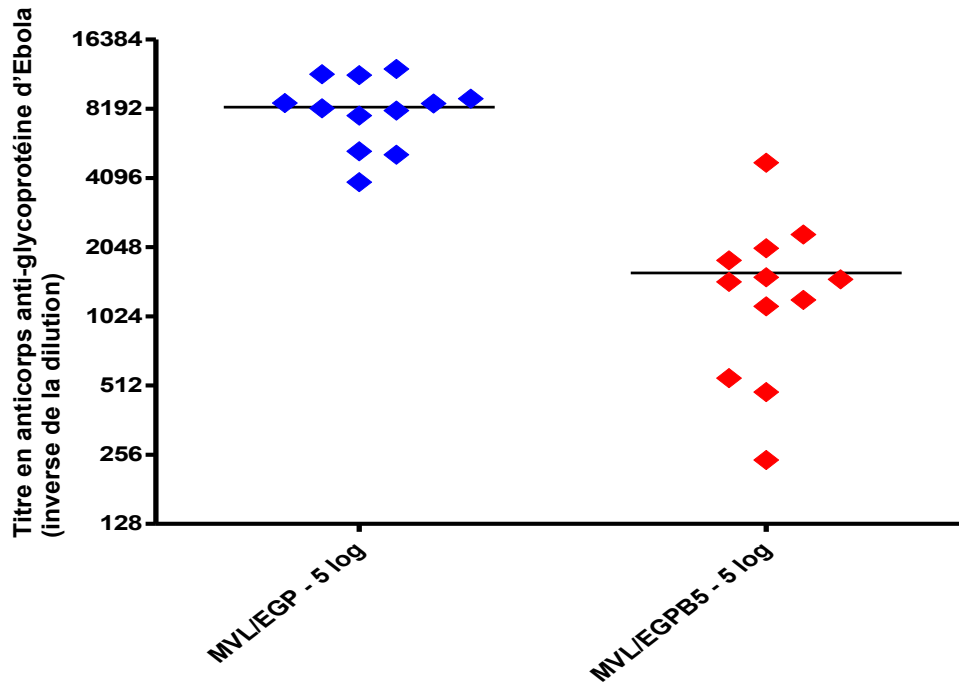
2.2.5. Evaluation des réponses immunitaires cellulaires anti-vaccin et anti-glycoprotéine du virus Ebola

Les rates des souris vaccinées avec 5 log DICT₅₀ de chacun des candidats vaccins bivalents (paragraphe ci-dessus) ont été prélevées et dissociées mécaniquement. Les splénocytes des rates ont été mis en culture avec des peptides synthétiques de la glycoprotéine du virus Ebola (réponse spécifique anti-GP d'Ebola). La sécrétion d'IFN γ est ensuite bloquée avec de la brefeldine A puis les cellules sont marquées en surface (anticorps anti-CD4⁺ et anti-CD8⁺) et au niveau intracellulaire (anticorps anti-IFN γ). L'analyse de la sécrétion spécifique d'IFN γ par les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ est réalisée en cytométrie en flux.

Les résultats obtenus lors de ces expériences n'ont pas pu être interprétés, la sécrétion d'IFN γ était trop faible même avec les cellules témoins stimulées non spécifiquement pour sécréter de l'IFN γ (avec du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et de la ionomycine, sigma®), suggérant un défaut de blocage de la sécrétion d'IFN γ .

Une méthode d'évaluation de la réponse cytotoxique *in vivo* est en cours de développement au laboratoire (Banz *et al.*, 2010), le premier essai réalisé a montré que notre technique d'injection de splénocytes marqués au Carboxylfluorescein diacetate, succinidyl ester (CFSE, invitrogen®) devait être améliorée, le ratio des cellules marquées CFSE^{high} et CFSE^{low} chez les souris témoins n'étant pas de 1 :1, il ne nous a pas été possible d'évaluer la lyse spécifique par les cellules T cytotoxiques.

A



B

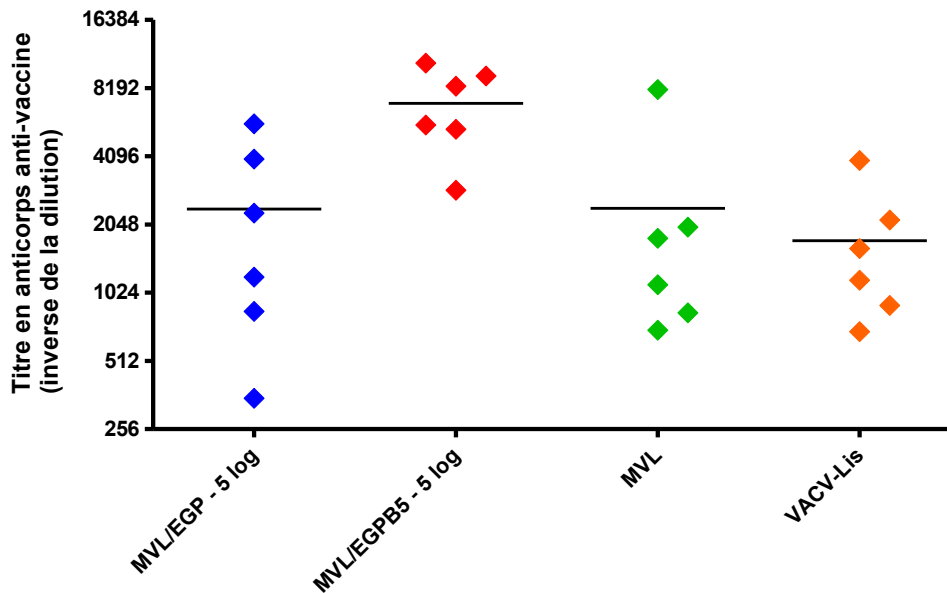


Figure 38 : Les candidats vaccins MVL-EGP et MVL-EGPB5 induisent un titre élevé d'anticorps anti-glycoprotéine du virus Ebola et anti-B5 à la dose de 10^5 pfu. Des souris immunocompétentes ont été inoculées avec 10^5 pfu de chacun des candidats vaccins par scarifications à la base de la queue. Au bout de 28 jours, le sang est prélevé en intracardiaque et les sérums sont analysés par ELISA. (A) titrage des IgG anti-GP du virus Ebola, (B) titrage des IgG anti-vaccine

2.2. Conclusion

Dans ce travail, nous avons développé des candidats vaccins bivalents antivarioliques et anti-Ebola, à partir d'un virus de la vaccine souche Lister atténué, MVL.

Nous avons cloné deux construits synthétiques de la glycoprotéine du virus Ebola dans le vecteur viral MVL : une forme classique EGP et une forme chimérique EGPB5, mutées au niveau du site d'editing de l'ARNm pour ne pas synthétiser la forme soluble sGP. Avec la construction EGPB5, nous pensions pouvoir augmenter le taux de glycoprotéine à la surface des EEV de MVL, et permettre ainsi d'augmenter l'efficacité du candidat vaccin. La trop faible présence de glycoprotéine de virus Ebola incorporée dans l'enveloppe du virus de la vaccine recombinant pouvait être en effet la cause de l'échec des premières tentatives de vaccination contre la fièvre hémorragique à virus Ebola avec un virus de la vaccine recombinant (Gilligan, 1997). Le choix du promoteur utilisé ainsi que du locus d'insertion pouvait aussi être à l'origine d'une biosynthèse insuffisante de la GP du virus Ebola. Nous avons utilisé le locus de la Délétion III et non pas le locus de la thymidine kinase, qui est généralement utilisé pour l'insertion d'un gène hétérologue. Nous avons aussi utilisé un promoteur différent de celui utilisé par Gilligan pour contrôler l'expression d'EGP et d'EGPB5. Nous avons utilisé le promoteur pH5 qui est un promoteur précoce/tardif fort impliqué dans différents stades du cycle de la réplication du virus de la vaccine alors que Gilligan avait utilisé le promoteur p7.5 qui est aussi un promoteur précoce/tardif mais induisant une expression génique plus modérée. Le choix du promoteur p7.5 par Gilligan pourrait s'expliquer par la cytotoxicité de la glycoprotéine du virus Ebola en cas de surexpression dans la cellule. La modification de ces deux éléments (locus et promoteur) pourrait expliquer les titres anticorps forts que nous avons obtenus par rapport à ceux obtenus par l'équipe de Gilligan.

Nous avons cloné les deux inserts EGP et EGPB5 dans le vecteur viral MVL, isolé et purifié ces virus recombinants. En culture cellulaire, nous avons pu démontrer que les virus exprimaient tous les deux la glycoprotéine du virus Ebola. Nous avons détecté EGP et EGPB5 au niveau périnucléaire et à la surface des cellules infectées par les deux virus, par immunofluorescence. En Western Blot, nous avons pu détecter les glycoprotéines

EGP ou EGPB5 glycosylées avec un anticorps monoclonal spécifique de la GP du virus Ebola, sur les particules virales extracellulaires enveloppées des deux virus recombinants. Nous avons aussi pu détecter la GP du virus Ebola par immunohistochimie, ce qui nous a permis de montrer que les constructions étaient stables (analyse faite sur trois passages successifs de virus).

Nous avons ensuite évalué les réponses humorales anti-vaccin et anti-GP du virus Ebola. Nous avons pu mettre en évidence un titre fort en IgG anti-GP du virus Ebola et anti-vaccin induit par les deux virus. Le titre en anticorps mesuré par Gilligan en 1997, chez le cobaye, après vaccination avec son candidat vaccin n'était alors que de 40 (inverse de la dilution) soit 200 fois plus faible que la réponse humorale induite par MVL-EGP chez la souris. La réponse humorale forte anti-GP du virus Ebola nous indique aussi qu'EGP et EGPB5 se replient convenablement à la surface des cellules afin d'être présentées aux anticorps.

Les images de microscopie montrent que le nombre de GP du virus Ebola incorporée dans l'enveloppe des particules de virus recombinants, MVL-EGPB5 et MVL-EGP, reste faible (moins d'une glycoprotéine détectée par particule virale), et le nombre de B5 sur l'enveloppe semble diminué par rapport au vecteur MVL. Ces résultats pourraient être expliqués par au moins deux hypothèses :

- Nous avons utilisé un anticorps monoclonal pour détecter la GP du virus Ebola. Si nous avions pu utiliser un anticorps polyclonal comme pour B5, nous aurions pu fixer plusieurs épitopes et donc détecter plus de molécules d'EGP et d'EGPB5.
- Le gène codant la protéine B5 native de la vaccin n'a pas été délété du virus et donc B5 non modifié peut être incorporé à la surface des particules virales, concomitamment avec la GP du virus Ebola. Il se pourrait qu'il y ait un encombrement stérique ou une compétition qui gênerait l'incorporation des glycoprotéines dans l'enveloppe des EEV.

Contrairement à notre objectif initial, les particules virales MVL-EGPB5 ne possèdent pas plus de GP sur leur enveloppe que les particules MVL-EGP et le titre en

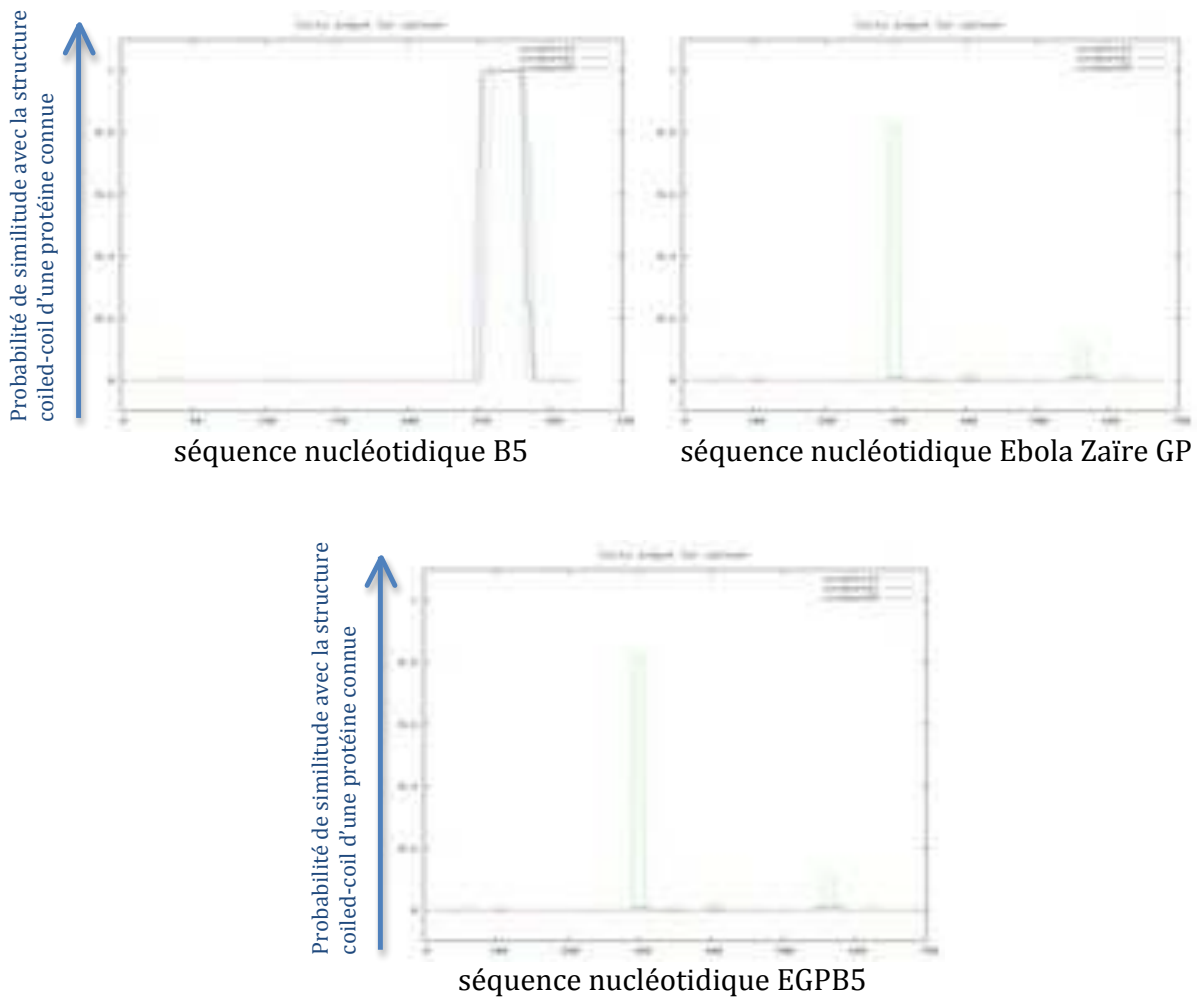


Figure 39 : Prédiction de domaine coiled-coil dans les glycoprotéines B5, EGP et EGPB5. Prédiction de domaine coiled-coil dans les glycoprotéines : B5 du virus de la vaccine, GP du virus Ebola et la protéine chimérique EGPB5, à partir des séquences nucléotidiques d'après le logiciel « **COILS - prediction of coiled coil regions in proteins** » (http://ww.ch.embnet.org/COILS_form.html)

anticorps anti-GP du virus Ebola obtenu après vaccination avec le premier candidat vaccin n'est pas plus élevé que celui obtenus avec MVL-EGP.

Un travail récent sur les glycoprotéines B5 et A33 du virus de la vaccine, montre que l'incorporation de B5 dans l'enveloppe de la particule virale, nécessite une interaction avec la protéine A33 (Chan & Ward, 2010, 2012). En effet, il semblerait d'après cette étude que, le domaine coiled-coil (super-hélice α) de B5 interagisse avec A33 pour que la protéine de surface B5 soit correctement incorporée dans l'enveloppe des particules virales EEV.

Dans la construction EGPB5 nous avons inséré les 126 derniers nucléotides de la séquence de B5R (42 acides aminés), comme l'a décrit Katz dans son travail (Katz *et al.*, 1997), or cette séquence (de l'acide aminé 275 à 317) ne code pas entièrement pour le domaine coiled-coil de B5 (de l'acide aminé 250 à 280) (figure 39). Ainsi cette construction ne permet vraisemblablement pas l'interaction entre A33 et le domaine transmembranaire de B5 fusionné à la GP d'Ebola ; ce qui pourrait expliquerait la faible incorporation d'EGPB5 à la surface des virions enveloppés.

2.3. Matériels et méthodes

Cellules, protéine et virus.

Le virus MVL est un virus de la vaccine dans lequel les régions I, II, III et V sont délétées (décrit dans l'article (Dimier *et al.*, 2011)) produit sur des cellules BHK-21 (rein de hamster nouveau-né ; ATCC CCL-10) cultivée avec du milieu Glasgow minimum essential medium (GMEM, Gibco) complémenté avec 10 % de tryptose broth phosphate, 25 mM d'hépès, 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 UI/ml de pénicilline + 100 IU/ml streptomycine (ATB). Le virus a été titré sur BHK-21 et sur cellules Vero (ATCC 81) cultivées avec du milieu M199 (Gibco) complémenté avec 5 % de SVF et 1 % d'ATB.

Production et purification de la glycoprotéine du virus Ebola.

La GP du virus Ebola est produite en cellules 293, cultivée en présence de milieu Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) complémenté avec 10% SVF et 1% d'ATB. La transfection des cellules est réalisée lorsque 60% des cellules sont à confluence avec du JetPEI (Polyscience). 120 μ g de plasmide pDisplay-HA-GP- Δ TM (ampicilline résistant, étiquette HA de la grippe ajoutée en N-terminal, plasmide fourni par le Dr Erica Ollmann Saphire, SCRIPPS, La Jolla, Etats-Unis) amplifié en bactérie DH5

alpha et purifié par maxiprep (Qiagen) sont mixés avec le JetPEI, le mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Le surnageant de culture contenant la protéine EGP soluble est récupérée trois jours post-transfection. Le surnageant est ensuite traité avec un cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche) puis filtré et dilué au demi dans du PBS froid. La protéine est purifiée sur colonne d'agarose ayant une affinité pour la HA de la grippe. EGP est éluée avec une solution de PBS 1mg/ml du peptide HA de la grippe. La pureté de l'élution est analysée par western blot avec un anticorps primaire anti-HA dilué au 1/200 (Pierce) et un anticorps secondaire anti-IgG de lapin (Jackson ImmunoResearch).

Clonage des plasmides et PCR pour l'insertion des gènes.

Le protocole est décrit dans l'article (Dimier *et al.*, 2011) (« materials and methods » paragraphe :**Molecular cloning and PCR**). Les inserts sont flanqués des sites de restriction EcoRI et SmaI et sont sous le contrôle du promoteur fort pH5 du virus de la vaccine. Les séquences génomiques des inserts EGP et EGPB5 sont décrites dans l'annexe 3.

Isolement des virus recombinants.

Le protocole de transfection est décrit dans l'article (Dimier *et al.*, 2011). Les transfections sont réalisées avec des cellules BHK-21. Les virus recombinants sont isolés grâce à une pression sélective ajoutée au milieu de culture. Les virus sont répliqués dans du milieu liquide avec une pression sélective. Les lysats cellulaires récupérés nous ont servis à infecter de nouvelles cellules en présence de milieu sélectif liquide. L'amplification du virus est réalisée plusieurs fois en milieu liquide sélectif puis quelques plages de lyses ont été isolées dans du milieu solide, sans pression sélective, après observation au microscope de l'absence de fluorescence. La présence de l'insert est vérifiée par PCR avec des amorces ciblant les régions flanquantes de la Délétion III (protocole et description des amorces dans l'article (Dimier *et al.*, 2011)).

Immunofluorescence.

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées avec des cellules BHK-21 mises en culture sur des chambres Labtek puis infectées à une multiplicité d'infection (moi) d'1 pfu/cellule avec les virus MVL-EGP, MVL-EGPB5 ou MVL sur la nuit à 37°C sous 5 %

de CO₂. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4 % (Formalin solution, sigma) 20 minutes, lavées avec du tampon phosphate (PBS) 2 fois 5 minutes à température ambiante. Pour réaliser un marquage intracellulaire, les cellules ont été incubées avec 0,5 %, triton X-100 pendant 5 minutes puis lavées avec du PBS. Pour limiter les fixations non spécifiques des anticorps, les lames sont préalablement saturées avec du PBS – 2 % albumine sérique bovine (BSA), 5 minutes à température ambiante puis les cellules sont incubées avec l'anticorps mAc α -ZEBOV GP (5A12, fourni par le Pr V. Volchkov) dilué au 1 :500 dans du PBS – 2 % BSA sur la nuit à 4°C ou 30 minutes à 37°C. L'incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 546 (invitrogen) dilué au 1 :1000 dans du PBS – 2 % BSA a été réalisée pendant 30 minutes à 37°C. Le marquage des noyaux a été réalisé avec du DAPI dilué au 1 :100 dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS – 2 % BSA, les lamelles sont montées dans du milieu de montage Eukitt. Les lames ont été observées avec le microscope IX81 (Olympus).

Immunohistochimie.

Le titrage des virus a été réalisé sur des cellules BHK-21 dans des plaques 12 puits. Les cellules sont infectées avec MVL-EGP ou MVL-EGPB5. Après 1h d'infection à 37 °C sous 5 % de CO₂, du milieu de culture pour cellules BHK21 contenant 3,2 % de carbométhylcellulose (CMC, VWR International Ltd) sont ajoutés dans chaque puits. La couche de CMC est éliminée 48h après infection et les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes à température ambiante puis perméabilisées avec du triton X-100 pendant 5 minutes. Les foyers viraux sont marqués avec le mAc α -ZEBOB GP (1 :500) pendant 1h à 37°C puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la HRP (1 :500) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées avec 0,7 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) dilué dans du PBS, pendant 20 minutes à 37°C. Lorsque les plages de lyse deviennent visibles (coloration brune) le DAB est éliminé et les cellules lavées avec de l'eau. Les plages de lyse sont comptées manuellement avec une loupe binoculaire.

Western Blot.

L'incorporation de EGP dans les enveloppes des EEV est analysée par Western Blot, des cellules confluentes infectées avec les virus MVL-EGP, MVL-EGPB5 et MVL à une moi de

0,1 et présentant un effet cytopathique (ECP) de 100 % (cellules arrondies). Les surnageants sont prélevés, centrifugés deux fois à 4500 g puis à 49000 g pendant 2h à 4°C. Les culots de virus sont repris dans du tampon Tris 10 mM à pH 8. Les protéines sont dénaturées dans du tampon Laemmli 6X et chauffées 5 minutes à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel SDS-polyacrylamide 12 % et transférées sur une membrane PVDF. Les membranes sont saturées avec du tampon de blocage (PBS, 0,1 % Tween 20 ; 5% lait) 30 minutes à température ambiante pour limiter les fixations non spécifiques des anticorps. Après trois lavages de 15 minutes avec du PBS, 0,1 % Tween 20, les membranes sont incubées avec le mAC α -ZEBOV GP ou le mAc α -B5 dilué au 1 :1000 dans du tampon de blocage sur la nuit à 4°C, lavées trois fois puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (anti-souris ou anti-lapin, Jackson Immunoresearch) dilué au 1 :10000 dans le tampon de blocage. La présence des protéines est révélée par chimioluminescence en utilisant le kit Novex ECL (Invitrogen).

Expérimentation animale

Les expériences animales ont été réalisées chez des souris en conformité avec les règles nationales sur l'emploi d'animaux de laboratoire pour la recherche et ont reçu une autorisation du comité d'éthique du lieu de l'expérimentation (IRBA).

Evaluation de l'innocuité des candidats vaccins MVL-EGP et MVL-EGPB5. Le protocole est décrit dans l'article (Dimier *et al.*, 2011). L'expérience a été réalisée dans le laboratoire NSB3 de l'unité de virologie, IRBA. Brièvement des souris nude sont anesthésiées puis inoculées avec MVL-EGPB5, MVL-EGP, MVL ou VACV-Lis par scarification à la base de la queue, avec 5 log de chacun des candidats vaccins. Une pustule caractéristique est observée sur le site de scarification, au bout de 8 à 10 jours, témoignant d'une bonne prise vaccinale. Les signes cliniques sont observés et les souris sont pesées pendant 8 semaines.

Evaluation de la réponse humorale anti-GP d'Ebola et anti-VACV.

Le titre en IgG anti-EGP et anti-VACV est déterminé par ELISA. Des souris immunisées sont anesthésiées au pentobarbital, le sang et la rate sont prélevés. Les sérums des souris sont décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes. Des plaques 96 puits (Maxisorb, NUNC) sont recouvertes avec 100 ng de protéine EGP Δ muc / puits (délétée

de leur domaine mucine-like afin que la protéine soit soluble. EGP Δ muc est produite au laboratoire à partir du plasmide fourni par le Dr Erika Ollmann Saphire, SCRIPPS, La Jolla, Etats-Unis (Lee *et al.*, 2009) et) ou avec 10⁶ pfu/puits de virus IHD-J purifié sur gradient de sucrose et inactivé au psoralène + UV (1h à température ambiante) dilué dans un tampon carbonate (Na₂CO₃), sur la nuit à 4°C. Les puits sont saturés avec un tampon de blocage (PBS, 0.1% Tween 20, 2 % BSA, 10% SVF) pendant 1h à température ambiante. Les sérums de souris sont dilués (1 :20 (séroconversion) ou en dilution limite (titrage)) dans le tampon de blocage 0,5 X puis incubés 1h à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS, 0,5 % Tween 20, un anticorps secondaire anti-IgG de souris (1 :5000 dans du tampon de blocage 0,5 X) couplé à la HRP est incubé 1h à 37°C. Le substrat de la HRP le 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) est ensuite ajouté dans les puits (30 minutes à température ambiante) puis la réaction est arrêtée par acidification du TMB (Sigma) avec 0,5M de H₂SO₄, induisant une coloration jaune de la solution lisible au lecteur de plaque EL 800 (BIO-TEK instruments) à la longueur d'onde de 450 nm.

Evaluation de la réponse cellulaire T anti-GP d'Ebola et anti-B5.

Pour mesurer la réponse cellulaire T, le pourcentage de LT CD4⁺ et LT CD8⁺ sécréteur d'IFN γ est déterminé par cytométrie en flux. Les splénocytes prélevés dans les rates de souris immunisées sont incubés avec un mélange de peptides synthétiques d'EGP, composés de 15 acides aminés et se chevauchant (Protéogenix, Illkirch, France) et les anticorps anti-CD28 et anti-CD49d, 2h à 37°C sous 5 % de CO₂.

Pour la réponse cellulaire anti-VACV, le protocole est décrit dans l'article (Dimier *et al.*, 2011). Brièvement, des DC immatures obtenues à partir de moelle osseuse de fémur de souris (fournies par Yannick Trescos) sont infectées avec du virus de la vaccine puis incubées avec les splénocytes des animaux vaccinés pendant 2h à 37°C. La sécrétion d'IFN γ est bloquée avec de la Brefeldine A (BFA, Sigma) pendant 4h à 37°C. Les splénocytes sont ensuite marqués avec des anticorps monoclonaux anti-CD8b2 couplé à la fluoroscein isothiocyanate (FITC, BD Biosciences), anti-CD4 couplé à l'allophycocyanine (APC, BD Biosciences), fixés et perméabilisés avec le kit BD cytofix/cytoperm (BD biosciences). L'IFN γ intracellulaire est marqué avec un anticorps monoclonal anti-IFN γ couplé à la phycoerythrine (PE, BD Biosciences). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 2 % dilué dans du PBS. L'analyse est réalisée

avec le cytomètre FC500 (Beckman Coulters, Miami, FL) et les données sont analysées avec le logiciel Cytomics RXP (Beckman Coulters).

Evaluation de la réponse cytotoxique anti-GP d'Ebola.

Des splénocytes de souris naïves pour le virus Ebola sont séparés en deux populations : P1 et P2. La population P1 est incubée avec un mélange de peptides synthétiques d'EGP à 10 µg/ml. P1 est ensuite marquée avec une concentration faible de Carboxylfluorescein diacetate, succinidyl ester (CFSE, Invitrogen) : 0,4 µM (CFSE^{low}). La population P2 est marquée avec une concentration élevée de CFSE : 4 µM (CFSE^{high}), pendant 15 minutes à température ambiante. Les populations P1 et P2 sont mixées à un ratio 1 :1 et injectées aux souris vaccinées. Les rates des souris sont prélevées 16h après injection et les cellules sont analysées au cytomètre FC500 (Beckman Coulters). Le pourcentage de lyse spécifique correspond au ratio : **1-(P1 CFSE^{low} / P2 CFSE^{high} des souris immunisées) / (P1 CFSE^{low} / P2 CFSE^{high} des souris témoins non vaccinées) x 100.**

Analyses statistiques.

L'analyse statistique des données de microscopie et des titrages d'anticorps a été réalisée avec le test de student et l'analyse des données de la perte de poids a été réalisée avec le test de comparaison multiple des variances de Dunnett (ANOVA).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de cette étude était de développer un candidat vaccin antivariolique et un candidat vaccin bivalent antivariolique et anti-virus Ebola, répliatif et atténué, à partir d'un clone du virus de la vaccine souche Lister (VACV-Lis 107), souche vaccinale antivariolique ayant fait ses preuves lors de la campagne d'éradication de la variole menée par l'OMS.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les candidats vaccins antivarioliques atténués, obtenus à partir de délétions ciblées dans le génome de VACV-Lis 107, selon le schéma de délétion de la souche atténuée non répliatif MVA. Les candidats vaccins sélectionnés sont répliatifs et atténués. Leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité vaccinale ont été évaluées dans des modèles murins. Seulement deux candidats se sont montrés aussi efficaces et immunogènes que le vaccin traditionnel et ne sont pas pathogènes pour la souris immunodéficiente, à une dose de 10^5 pfu de virus, qui était la dose administrée à l'homme dans le cadre de la vaccination antivariolique. Nous avons choisi le meilleur des deux candidats vaccins (le plus atténué en culture cellulaire humaine) et nous l'avons nommé Modified Vaccinia Lister (MVL). Ce candidat vaccin pourrait compléter la gamme des vaccins antivarioliques atténués de troisième génération. Il semble aussi efficace que les vaccins de 1^{ère} génération mais ne devrait pas induire autant de complications post-vaccinales. Pour son développement, il est nécessaire d'évaluer son efficacité à long terme, dans le modèle murin dans un premier temps afin de caractériser le protocole de vaccination antivariolique (une seule vaccination ou nécessité d'un ou plusieurs rappels, comme c'est le cas de la souche MVA, dont l'efficacité décroît avec le temps.). Le système immunitaire murin étant différent de celui de l'homme, il est nécessaire de se rapprocher du modèle humain avant de passer aux essais cliniques, et de tester l'innocuité et l'efficacité du candidat vaccin MVL chez des modèles PNH, qui est le modèle animal le plus proche génétiquement et immunitairement de l'homme.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un candidat vaccin bivalent antivariolique et anti-fièvre hémorragique à virus Ebola, à partir du candidat vaccin MVL. Nous avons construit deux candidats vaccins bivalents exprimant d'une part, le gène entier de la glycoprotéine du virus Ebola et d'autre part, un gène chimérique exprimant l'ectodomaine de la glycoprotéine du virus Ebola fusionné aux domaines

transmembranaire et intracytoplasmique de la glycoprotéine B5 du virus de la vaccine (respectivement nommés MVL-EGP et MVL-EGPB5). Ces deux virus recombinants ont été caractérisés en culture cellulaire. Ils sont capables d'induire la synthèse de la glycoprotéine du virus Ebola ; celle-ci semble fortement glycosylée, signifiant qu'elle suivrait la voie de maturation de la glycoprotéine du virus Ebola et migrerait à travers le Golgi. Ils sont aussi capables d'incorporer cette protéine dans l'enveloppe de leurs formes EEV bien qu'en faible quantité. Cependant, des études pour caractériser la production d'EGP et EGPB5 sont encore nécessaires afin de déterminer les quantités de production des glycoprotéines ou encore le ration GP cytoplasmique / GP membranaire.

Leur innocuité à ensuite été testée dans un modèle murin immunodéprimé, montrant que MVL-EGP et MVL-EGPB5 sont aussi sûrs que MVL : pas d'apparition de pathogénicité par l'insertion de la glycoprotéine hétérologue d'un virus de classe 4. La réponse anticorps a ensuite été évaluée par un test ELISA, montrant que MVL-EGPB5 et MVL-EGP sont capables d'induire un fort titre en anticorps anti-GP du virus Ebola et anti-vaccine.

Nous avons aussi prévu d'évaluer prochainement au P4 Jean Mérieux de Lyon, le titre en anticorps neutralisants anti-GP dans les sérums de souris prélevés après vaccination avec 5log pfu de MVL-EGP et MVL-EGPB5.

La construction chimérique EGPB5 supposée améliorer l'incorporation d'EGP dans la membrane des EEV de MVL, n'a pas permis d'obtenir un candidat vaccin plus efficace. Une étude récente a mis en évidence une région superenroulée (région coiled-coil) dans le domaine transmembranaire de la glycoprotéine B5 du virus de la vaccine (Chan & Ward, 2012) qui joue un rôle primordial dans l'incorporation de la glycoprotéine dans l'enveloppe virale. Dans la construction EGPB5, nous avons tronqué ce domaine, inhibant ainsi l'interaction de B5 avec une autre glycoprotéine du virus de la vaccine (A33) et par conséquent réduisant l'incorporation de la protéine chimérique EGPB5 dans la membrane des EEV. Dans la suite de ces travaux, nous avons prévu de restaurer cette région superenroulée dans la protéine chimérique (EGPB5⁺) et d'isoler un nouveau virus recombinant exprimant cette protéine chimérique (MVL-EGPB5⁺). Nous avons ensuite prévu de caractériser la synthèse d'EGPB5⁺ du nouveau candidat vaccin bivalent en culture cellulaire puis d'évaluer l'innocuité et l'immunogénicité de MVL-EGPB5⁺ (réponse humorale et réponse cellulaire CD4⁺, CD8⁺ et CTL). Ces

expérimentations se feront directement chez le cobaye (et non plus chez la souris) qui est le modèle animal du P4 Jean Mérieux pour une infection avec le virus Ebola. Nous prévoyons en effet de tester l'efficacité de la protection vaccinale induite par nos deux candidats vaccins recombinants MVL-EGPB5⁺ et MVL-EGP contre une infection létale avec un virus Ebola espèce Zaïre souche Mayinga, adaptée au cobaye développée au P4 Jean Mérieux. Si nous obtenons de bons résultats chez le cobaye, nous pourrions alors envisager des expérimentations chez le modèle primate qui est le modèle animal le plus proche de l'homme.

En conclusion, il existe des candidats vaccins antivarioliques pour remplacer les vaccins historiques efficaces mais responsables de complications post-vaccinales et qui aujourd'hui, ne pourraient pas être administrés aux sujets présentant une contre-indication. Ces candidats vaccins comme la souche MVA sont sûrs à cause de leur caractère non répliquatif en cellules humaines. Ils restent cependant nettement moins immunogènes que les vaccins de 1^{ère} génération et devraient nécessiter plusieurs injections à des doses très élevées (essais cliniques en cours) pour induire une immunité similaire à celle induite par les souches NYCBH (Vaccin Dryvax) et Lister et obtenir leur AMM. Leur évaluation au cours des derniers essais cliniques montre qu'il pourrait être nécessaire de développer de nouveaux vaccins antivarioliques. Notre candidat vaccin MVL pourrait être une alternative à une trop faible immunogénicité de ces vaccins de 3^{ème} génération. Contrairement à MVA, MVL protège l'animal contre une épreuve létale de cowpox virus avec une dose similaire à celle du vaccin historique. En outre, il n'entraîne qu'une faible morbidité chez la souris immunodéprimée et pourrait avoir une forte atténuation chez l'homme. Il pourrait donc compléter effectivement la gamme des vaccins antivarioliques de 3^{ème} génération.

Les virus de la vaccine sont aussi de bons outils de génie génétique. L'insertion de gènes hétérologues dans leur génome se fait aisément par recombinaison homologe. Ces virus peuvent ainsi être facilement utilisés dans le domaine de la vaccinologie. Les souches de vaccins MVA et NYVAC constituent des vecteurs viraux utilisés actuellement dans le développement de candidats vaccins pour la protection contre plusieurs maladies infectieuses et différents types de cancer (Gomez *et al.*, 2011). Des résultats encourageants ont été obtenus dans certains cas avec une protection partielle contre la

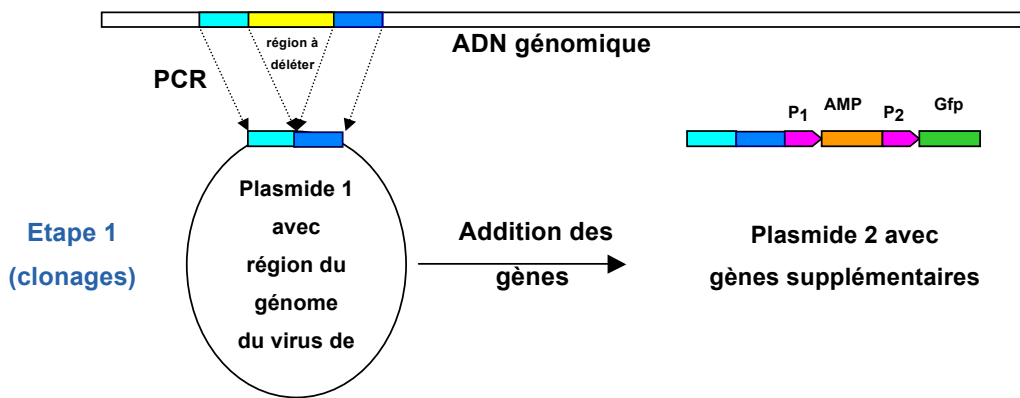
maladie. L'utilisation du virus recombinant MVL pourrait permettre d'obtenir une meilleure efficacité grâce à une meilleure immunogénicité en raison de sa capacité à se répliquer.

Au cours de ce travail, nous avons développé un vecteur MVL-EGP qui induit une forte réponse immunitaire humorale contre la glycoprotéine du virus Ebola. Ce résultat encourageant permet d'espérer que ce type de candidat vaccin pourrait être efficace pour protéger l'animal contre une infection à virus Ebola. Ainsi, ce candidat vaccin pourrait compléter les quelques vecteurs viraux anti-Ebola qui sont actuellement en développement. Le virus de la vaccine qui a été longuement utilisé chez l'homme pour l'éradication de la variole pourrait en effet être mieux toléré que l'adénovirus, le virus de la stomatite vésiculaire et le paramyxovirus qui constituent ces vecteurs.

ANNEXES

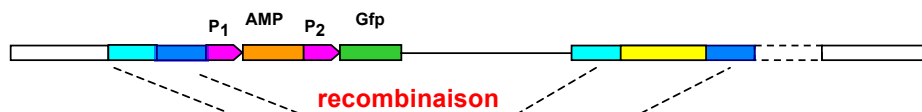
Annexe n°1 : Stratégie employée pour créer les délétions génomiques ciblées dans le génome du clone viral VV-Lis 107

VV-Lis
107



Etape 2 (1^{ière} sélection)

Transfection du plasmide dans cellules infectées et sélection de virus résistants à l'acide mycophénolique

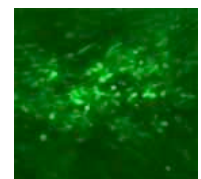


Etape 3 (2^{ième} sélection)

sélection de virus Gfp⁻ et criblage des virus déléteés par PCR

virus déléte

virus sauvage



Plaque de lyse : virus recombinant Gfp⁺

Annexe n°2 : Liste des différents essais précliniques et cliniques en cours sur des vaccins utilisant un vecteur viral de type virus de la vaccine (Gomez *et al.*, 2011).

A: Preclinical Studies						
Target Disease	Animal Model	Vaccine	Antigen	Immune Response	Efficacy	References
Viral Infections						
Rabies	Mice	MVA-RG	RG (rabies glycoprotein)	Neutralizing Ab	Protection	[171]
	Mice	NYVAC-RG	RG	ND	Protection	[32]
HCV	HLA-I transgenic mice	MVA-HCV TG4040	NS3, NS4, NS5B	Potent and long-lasting CD4+ and CD8+ T cell responses	Cross-protection	[172]
	Chimpanzees	P: DNA-CE1E2 + DNA-NS3 B: MVA-CE1E2 + MVA-NS3	C (core), E1, E2, NS3	Robust HCV-specific immune responses	Protection during the acute period but not in the chronic phase	[173]
	HLA.A2.1 mice	MVA-E1E2	Native and modified E1 and E2	Th1 response	ND	[174]
SARS	Mice and rabbits	P: MVA-S B: Ad-S	S (spike glycoprotein)	Neutralizing Ab	ND	[175]
	Rhesus monkeys	MVA-S	S	Neutralizing Ab	Protection	[176]
	Ferrets	MVA-S or MVA-N	S or N (nucleocapsid protein)	Neutralizing Ab	No protection	[177]
	Mice	MVA-S	S	Neutralizing Ab	Protection	[178]
Measles	Mice and rat	MVA-H	H (hemagglutinin glycoprotein)	Th1 and neutralizing Ab	Protection	[179]
	Newborn macaques	MVA-FH	F (fusion protein) and H	CTL and neutralizing Ab	Protection	[180]
	Macaques	MVA-FH	F and H	CTL and neutralizing Ab	Protection	[181]
Dengue	Rhesus monkeys	MVA-DEN2 or MVA-DEN4	C-terminally truncated envelope protein from dengue type 2 (DEN2) or type 4 (DEN4) virus	Neutralizing Ab (MVA-DEN2)	Protection (MVA-DEN2)	[182]
EIV	Horses	MVA-HA or NP	HA (hemagglutinin), NP (nucleoprotein)	Ab and cellular responses	Protection	[183]
	Horses	MVA-HA or NP	HA, NP	Ab and cellular responses	ND	[184]
CMV	HLA.A2.1 mice	pp65-IE1-MVA	pp65 (tegument protein) and IE1 (immediate early gene product)	Robust primary CMI	ND	[185]
	Mice Tx recipient	MVA-CMV	UL55 (surface glycoprotein), UL83 (tegument protein) and UL123/e4 (nuclear protein)	Humoral and cellular responses	ND	[186]
	Mice	MVA-gB680	gB (soluble glycoprotein B)	Neutralizing Ab and CTLs	ND	[187]

A: Preclinical Studies						
Target Disease	Animal Model	Vaccine	Antigen	Immune Response	Efficacy	References
Viral Infections						
CDV	Ferrets	NYVAC-CDV	F and HA	Neutralizing Ab	Protection	[188]
EHV	Horses	NYVAC-64	gene 64	CMI	No protection	[189]
	Hamsters	MVA-gC	Complement receptor glycoprotein C	Humoral and cellular responses	ND	[190]
	Ponies	MVA-IE	Immediate early (IE) gene	CMI	Protection	[191]
RSV	Mice	MVA-F and MVA-G	F (fusion protein) and G (attachment protein)	Humoral and Th1 responses	No protection	[192]
	Infant macaques	MVA-F and MVA-G	F and G	Low Ab levels	No protection	[193]
	Mice	MVA-RSV	F and G	Humoral response	Protection	[194]
	Calves	MVA-bRSV	F and G	Humoral and cellular responses	Protection	[195]
JEV	Mice	MVA-JEV + (DNA-B7.1 or DNA-B7.2)	prM (precursor of the membrane) and E (envelope protein)	Specific JEV-immune responses	ND	[196]
	Swine	MVA-JEV	prM and E	Neutralizing Ab	Protection	[197]
	Mice	MVA-JEV	prM and E	Neutralizing Ab	Protection	[198]
	Rhesus monkeys	NYVAC-JEV	prM, E, NS1	Neutralizing Ab	Protection	[199]
	Swine	NYVAC-JEV	prM, E, NS1	Neutralizing Ab	Protection	[200]
Influenza	Mice	MVA-HA	HA (H5N1)	Ab and CTL responses	Protection	[201]
	Mice	MVA-HA-NP	HA and NP (H1N1)	Ab and CTL responses	Protection	[202]
	Mice	MVA-HA, NP	HA, NP	Ab and CTL responses	Protection	[203]
	Cynomolgus macaque	MVA-HA-VN/04	HA (H5N1)	Cross-reactive Ab response	Protection	[204, 205]
	Pigs	NYVAC-HA	HA (H5N1)	Ab response	Partial protection (19/21)	[206]
	Mice	MVA-H1-Ca MVA-N1-Ca	HA and NA (H1N1)	Ab and CTL responses	Protection	[207]
	Ferrets	MVA-HA	HA (H1N1)	Robust Ab response	Protection	[208]
Bacterial Diseases						
Tuberculosis	Guinea pigs	P: BCG B: MVA-85A	Mycobacterial myco-lytransferase antigen 85A	Cellular response	Protection	[209]
	Cattle	P: BCG B: MVA-85A	85A	Cellular response	ND	[210]
	Mice	P: BCG B: MVA-85A	85A	Specific CD4+ and CD8+ T cell responses	Protection	[211]

A: Preclinical Studies						
Target Disease	Animal Model	Vaccine	Antigen	Immune Response	Efficacy	References
Bacterial Diseases						
Tuberculosis	Mice	MVA-64	Early secreted protein MPT64	Ab and CTL responses	ND	[212]
	Rhesus macaques	P: BCG B: MVA-85A	85A	Cellular response	Protection	[213]
	Cattle	P: BCG B: MVA-85A	85A	Long lasting cellular response	Protection	[214]
	Mice	P : ESAT6-85B fusion protein B : MVA/IL15/5Mtb	85A, 85B, ESAT6, HSP60 and Mtb39	Long lasting cellular immune response	Protection	[215]
Parasitic Diseases						
Toxoplasmosis	Mice	MVA-ROP2	ROP2 (transmembrane protein of PVM)	Ab response	ND	[216]
	Mice	P: DNA-GRA4 B: MVA-GRA4	GRA4 (dense granule antigen 4)	Ab and cellular responses	Protection	[217]
Leishmaniosis	Mice	P: DNA-TRYP B: MVA-TRYP	TRYP (trypanothione peroxidase)	Cellular response	Protection	[218]
	Mice	P: DNA-LACK B: MVA-LACK	LACK (p36)	Cellular response	Protection against <i>Leishmania major</i>	[219]
	Mice	P: DNA-LACK B: MVA-LACK	LACK (p36)	Cellular response	Protection against <i>Leishmania infantum</i>	[220]
	Dogs	P: DNA-LACK B: MVA-LACK	LACK (p36)	Cellular response	Protection against <i>Leishmania infantum</i>	[221]
	Dogs	P: DNA-TRYP B: MVA-TRYP	TRYP (trypanothione peroxidase)	Th1 and memory cellular immune responses	Protection	[222]
B: Clinical Studies						
Target Disease	Clinical Trials	Vaccine	Antigen	Immune Response	Efficacy	References
HIV-1	Phase I	MVA-HIVA +/- DNA-HIVA prime	HIV-1 clade A gag p24 and p17 fused to 25 overlapping CD8+ T cell epitopes	Safe and well tolerated. Infrequent immune response	-	[223, 224]
	Phase I	P: DNA-HIVA B: MVA-HIVA	HIV-1 clade A gag p24 and p17 fused to 25 overlapping CD8+ T cell epitopes	Multifunctional cellular responses	-	[225, 226]
	Phase I	NYVAC-C	Env, Gag-Pol-Nef (clade C)	Anti-HIV T cell response (5/12)	-	[227]
	Phase I	P: DNA-C B: NYVAC-C	Env, Gag-Pol-Nef (clade C)	Specific HIV-immune responses (19/20)	-	[149, 150]
	Phase I/II	P: DNA HIVIS B: MVA-CMDR	P:Env, Gag, Rev, RT (clade A, B) B: Env, Gag, Pol (clade C, A, E)	Specific HIV immune response (37/38)	-	[148, 228]

B: Clinical Studies						
HIV-1	Phase I	MVA-CMRD	Env, Gag and Pol (CRF01-AE)	Durable cell mediated and humoral immune responses	-	[229]
	Phase I	ADMVA	Env, Gag, Pol, Nef and Tat (clade B'/C)	Neutralizing Ab and specific HIV immune response depending on the dose: LD (3/12), MD (6/12) and HD (8/13)	-	[147]
	Phase I	MVA (TBC-M4)	Env, Gag, Tat-Rev, Nef-RT (Clade C)	HIV immune response depending on the dose: LD (9/11) and HD (12/12). Ab response	-	[230]
Influenza	Phase I	MVA-NP+M1	NP (Nucleoprotein) and M1 (Matrix protein 1)	High specific T cell responses	-	[152]
HCV	Phase I	MVA-HCV (TG4040)	NS3, NS4, NS5B	Safe and well tolerated	-	www.clinicaltrials.org
Smallpox	Phase I/IIb	MVA-BN	-	Cellular and humoral responses	Protection	[231-233]
JEV	Phase I	NYVAC-JEV	prM, E, NS1	Humoral and CTL responses	-	[234, 235]
Malaria	Phase IIb	P: FP9 B: MVA-ME-TRAP	ME.TRAP	Cellular response	No protection	[236]
	Phase II	P: FP9 B: MVA-CS	CS	Low cellular response	No protection	[237]
	Phase II	P: RTS,S/AS02A B: MVA-CS	CS	High Ab levels but low cellular response	Partial efficacy (33%)	[238]
	Phase II	P: DNA B: MVA	ME.TRAP CS	Cellular and humoral responses	Protection	[239]
	Phase II	P: FP9 B: MVA	ME.TRAP	Cellular response	Protection	[144]
	Phase II	P: DNA B: MVA + FP9	ME.TRAP	Cellular response	No protection	[144]
	Phase II	P: DNA B: MVA	ME.TRAP	Cellular response	No protection	[240]
	Phase II	P: DNA B: MVA	ME.TRAP	Cellular response	No protection	[241]
	Phase I/IIa	NYVAC-Pf7	7 Ag from P. falciparum (CS, SSP2, LSA1, MSP1, SERA, AMA1, Pfs25)	Poor Ab levels and cellular response	No protection	[242]
Tuberculosis	Phase I	P: BCG B: MVA-85A	Mycobacterial mycolyltransferase antigen 85A	Excellent safety profile and highly immunogenic	ND	[243, 244]
	Phase I	MVA-85A	Mycobacterial mycolyltransferase antigen 85A	Potent and durable T cell responses	ND	[153-155]

Les références citées sont celles de l'article ; se référer à celui-ci pour plus de renseignements (Gomez *et al.*, 2011).

Annexe n°3 : Séquences de la glycoprotéine d’Ebola (EGPB) et de la glycoprotéine chimérique (EGPB5) vaccinisées.

EGP :

GAATTCATGGGAGTAACTGGAATTTTACAATTACCAAGAGATAGATTTAAAAGAACTTCTTTCTTCTTATGGGT
EcoRI
 AATTATTTTATTTCAAAGAACTTTCTCTATTCCATTAGGAGTAATTCATAATTCTACTTTACAAGTATCTGATGT
 AGATAAGTTAGTATGTAGAGATAAGTTATCTTCTACTAATCAATTAAGATCTGTAGGATTAACCTTAGAAGGAA
 ATGGAGTAGCTACTGATGTACCATCTGCTACTAAAAGATGGGGATTTAGATCTGGAGTACCACAAAAGTAGTCA
 ATTATGAAGCTGGAGAATGGGCTGAAAATTGTTATAATTTAGAAATTAAAAAACCAGATGGATCTGAATGTTTA
 CCAGCTGCTCCAGATGGAATTAGAGGATTTCCAAGATGTAGATATGTACATAAAGTATCTGGAAGTGGACCATGT
 GCTGGAGATTTTGCTTTTCATAAAGAAGGAGCTTTCTTCTTATATGATAGATTAGCTTCTACTGTAATTTATAGA
 GGAAGTACTTTTGCTGAAGGAGTAGTAGCTTTCTTAATTTTACCACAAGCTAAAAAAGATTTCTTCTTCTCAT
 CCATTAAGAGAACCAGTCAATGCTACTGAAGATCCATCTTCTGGATATTATTCTACTACTATTAGATATCAAGCT
 ACTGGATTTGGAAGTAACTGAACTGAATATTTATTTGAAGTAGATAATTTAACTTATGTACAATTAGAATCTAG
 ATTTACTCCACAATTTATTACAATTGAATGAACTATTTATACTTCTGGAAAAAGATCTAATACTACTGGAAA
 ATTAATTTGGAAAGTCAATCCAGAAATTGATACTACTATTGGAGAATGGGCTTTCTGGGAACTAAAAAAATT
 TAACTAGAAAAATTAGATCTGAAGAATTATCTTTTACTGTAGTATCTAATGGAGCTAAAAATATTTCTGGACAAT
 CTCCAGCTAGAACTTCTTCTGATCCAGGAACATACTACTACTGAAGATCATAAAATTATGGCTTCTGAAAATT
 CTTCTGCTATGGTACAAGTACATTCTCAAGGAAGAGAAGCTGCTGTATCTCATTTAACTACTTTAGCTACTATTT
 CTACTTCTCCACAATCTTTAACTACTAAACCAGGACCAGATAATTCTACTCATAATACTCCAGTATACAAATTAG
 ATATTTCTGAAGCTACTCAAGTAGAACACATCATAGAAGAACTGATAATGATTCTACTGCTTCTGATACTCCAT
 CTGCTACTACTGCTGCTGGACCACAAAAGCTGAAAATACTAATACTTCCAAATCTACTGATTTCTTAGATCCAGC
 TACTACTACTTCTCCACAAAATCATTCTGAACTGCTGGAAATAATAATACTCATCATCAAGATACTGGAGAAGA
 ATCTGCTTCTTCTGGAAAATTAGGATTAATTACTAATACTATTGCTGGAGTAGCTGGATTAATTACTGGAGGAAG
 AAGAAGTAGAAGAGAAGCTATTGTCAATGCTCAACCAAAATGTAATCCAAATTTACATTATTGGACTACTCAAGA
 TGAAGGAGCTGCTATTGGATTAGCTTGGATTCCATATTTTGGACCAGCTGCTGAAGGAATTTATATTGAAGGATT
 AATGCATAATCAAGATGGATTAATTTGTGGATTAAGACAATTAGCTAATGAACTACTCAAGCTTTACAATTATT
 CTTAAGAGCTACTACTGAATTAAGAACTTTCTCTATTTTGAATAGAAAAGCTATTGATTTCTTATTACAAAGATG
 GGGAGGAACCTGTGCATATTTTAGGACCAGATTGTTGTATTGAACCACATGATTGGACTAAAAATATTACTGATAA
 AATTGATCAAATTATTCATGATTTTGTAGATAAACTTTACCAGATCAAGGAGATAATGATAATTGGTGGACTG
 GATGGAGACAATGGATTCCAGCAGGAATCGGTGTTACTGGTGTTATTATTGCTGTGATTGCACTGTTTTGC
ATTTGCAAGTTCGTTTTCTGACCCGGG
SmaI
GP_{TM}

EGPB5 :

GAATTC**ATG**GGAGTAACTGGAATTTTACAATTACCAAGAGATAGATTTAAAAGAACTTCTTTCTTCTTATGGGT
 EcoRI
 AATTATTTTATTTCAAAGAACTTTCTCTATTCCATTAGGAGTAATTCATAATTCTACTTTACAAGTATCTGATGT
 AGATAAGTTAGTATGTAGAGATAAGTTATCTTCTACTAATCAATTAAGATCTGTAGGATTAACCTTAGAAGGAA
 ATGGAGTAGCTACTGATGTACCATCTGCTACTAAAAGATGGGGATTAGATCTGGAGTACCACCAAAGTAGTCA
 ATTATGAAGCTGGAGAATGGGCTGAAAATTGTTATAATTTAGAAATTAAAAAACCAGATGGATCTGAATGTTTA
 CCAGCTGCTCCAGATGGAATTAGAGGATTTCCAAGATGTAGATATGTACATAAAGTATCTGGAAGTGGACCATGT
 GCTGGAGATTTTGCTTTTCATAAAGAAGGAGCTTTCTTCTTATATGATAGATTAGCTTCTACTGTAATTTATAGA
 GGAAGTACTTTTGCTGAAGGAGTAGTAGCTTTCTTAATTTTACCACAAGCTAAAAAAGATTTCTTCTTCTCAT
 CCATTAAGAGAACCAGTCAATGCTACTGAAGATCCATCTTCTGGATATTATTCTACTACTATTAGATATCAAGCT
 ACTGGATTTGGAAGTAACTGAACTGAATATTTATTTGAAGTAGATAATTTAACTTATGTACAATTAGAATCTAG
 ATTTACTCCACAATTTATTACAATTGAATGAACTATTTATACTTCTGGAAAAAGATCTAATACTACTGGAAA
 ATTAATTTGGAAAGTCAATCCAGAAATTTGATACTACTATTGGAGAATGGGCTTTCTGGGAACTAAAAAAATTT
 TAACTAGAAAAATTAGATCTGAAGAATTATCTTTTACTGTAGTATCTAATGGAGCTAAAAATATTTCTGGACAAT
 CTCCAGCTAGAAGTCTTCTGATCCAGGAAGTAACTACTACTGAAGATCATAAAATTTATGGCTTCTGAAAATTT
 CTTCTGCTATGGTACAAGTACATTCTCAAGGAAGAGAAGCTGCTGTATCTCATTTAACTACTTTAGCTACTATTT
 CTACTTCTCCACAATCTTTAACTACTAAACCAGGACCAGATAATTCTACTCATAAATACTCCAGTATACAAATTAG
 ATATTTCTGAAGTACTCAAGTAGAACAACATCATAGAAGAACTGATAATGATTCTACTGCTTCTGATACTCCAT
 CTGCTACTACTGCTGCTGGACCACCAAAGCTGAAAATACTAATACTTCCAAATCTACTGATTTCTTAGATCCAGC
 TACTACTACTTCTCCACAAAATCATTCTGAAACTGCTGGAAATAATAATACTCATCATCAAGATACTGGAGAAGA
 ATCTGCTTCTTCTGGAAAATTAGGATTAATTAATACTATTGCTGGAGTAGCTGGATTAATTACTGGAGGAAG
 AAGAACTAGAAGAGAAGCTATTGTCAATGCTCAACCAAATGTAATCCAAATTTACATTATTGGACTACTCAAGA
 TGAAGGAGCTGCTATTGGATTAGCTTGGATTCCATATTTTGGACCAGCTGCTGAAGGAATTTATATTGAAGGATT
 AATGCATAATCAAGATGGATTAATTTGTGGATTAAGACAATTAGCTAATGAACTACTCAAGCTTTACAATTATT
 CTTAAGAGCTACTACTGAATTAAGAAGCTTTCTCTATTTTGAATAGAAAAGCTATTGATTTCTTATTACAAAGATG
 GGGAGGAACTTGTATATTTTAGGACCAGATTGTTGTATTGAACCACATGATTGGACTAAAAATATTACTGATAA
 AATTGATCAAATTATTCATGATTTTGTAGATAAAACTTTACCAGATCAAGGAGATAATGATAATTGGTGGACTG
 GATGGAGACAA**GCTACTTATCATATTATTATTGTAGCTTTAACTATTATGGGAGTAATTTCTTAATTTCT**
GTAATTGTATTAGTATGTTCTTGTGATAAAAAATAATGATCAATACAAATTTACAAATTATTACCATAGCC
 CGGG
 Smal
B5™

Protéine EGP :

MGVGTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATD
 VPSATKRWGFRRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAF
 HKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETE
 YLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSF
 TVVSNAGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPD
 NSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAG
 NNNTHHQDTGEESASSGKGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFG
 PAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHD
 WTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVIALFCICKFVF

Protéine EGPB5 :

MGVGTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATD
 VPSATKRWGFRRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAF
 HKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETE
 YLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSF
 TVVSNAGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPD
 NSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAG
 NNNTHHQDTGEESASSGKGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFG
 PAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHD
 WTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTGWRQATYHIIIVALTIMGVIFLISVIVLVCSCDKNNDQYKFHKL
 LP

COMMUNICATIONS

Publication :

Deletion of Major Nonessential Genomic Regions in the Vaccinia Virus Lister Strain Enhances Attenuation without Altering Vaccine Efficacy in Mice.

Julie Dimier, Audrey Ferrier-Rembert, Karine Pradeau-Aubreton, Matthias Hebben, Danièle Spehner, Anne-Laure Favier, Danielle Gratier, Daniel Garin, Jean-Marc Crance and Robert Drillien, J. Virol. ; May 2011 vol. 85 no. 10 ; 5016-5026

Communications orales :

Development of a replicative and attenuated bivalent vaccine candidate against smallpox and Ebola, XIX International Poxviruses, Asfarviruses and Iridoviruses Conference, 24-28 Juin 2012, Salamanca (Espagne)

Développement d'un nouveau vecteur vaccinia virus atténué et répliatif anti-Varirole et anti-Ebola virus, XIV^{èmes} Journées Francophones de Virologie, 29-30 mars 2012 – Institut PASTEUR (France)

Développement de nouveaux candidats vaccins antivarioliques répliatifs et atténués, XII^{èmes} Journées Francophones de Virologie, 18-19 mars 2010 – Institut PASTEUR (France)

Communications affichées :

Deleting major non essential regions in Vaccinia virus Lister enhances attenuation without altering vaccine potency, 21st ECCMID and 27th ICC, 7-10 Mai 2010 – Milan (Italie)

Développement d'un nouveau vecteur vaccinia virus atténué et répliatif anti-Variole et anti-Ebola virus, XIII^{èmes} Journées Francophones de Virologie, 28-29 avril 2011– Institut PASTEUR, Paris (France)

Deleting major non essential regions in vaccinia virus Lister enhances attenuation without altering vaccine potency, International symposium on gene-based vaccine 8-10 Novembre 2010 – Cannes (France)

Deleting major non essential regions in vaccinia virus Lister enhances attenuation without altering vaccine potency, XVIII International Poxviruses, Asfarviruses and Iridoviruses Conference, 5-9 juin 2010 – Sedona (Etats-Unis)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alibek, K. (1999).** The Soviet Union's anti-agricultural biological weapons. *Ann N Y Acad Sci* **894**, 18-19.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. & Falkner, F. G. (1998).** The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**, 365-396.
- Artenstein, A. W., Johnson, C., Marbury, T. C., Morrison, D., Blum, P. S., Kemp, T., Nichols, R., Balser, J. P., Currie, M. & other authors (2005).** A novel, cell culture-derived smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults. *Vaccine* **23**, 3301-3309.
- Bailly, J. E., McAuliffe, J. M., Durbin, A. P., Elkins, W. R., Collins, P. L. & Murphy, B. R. (2000).** A recombinant human parainfluenza virus type 3 (PIV3) in which the nucleocapsid N protein has been replaced by that of bovine PIV3 is attenuated in primates. *J Virol* **74**, 3188-3195.
- Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M. C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debre, P., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B. & Georges, A. J. (1999).** Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* **5**, 423-426.
- Banz, A., Cremel, M., Rembert, A. & Godfrin, Y. (2010).** In situ targeting of dendritic cells by antigen-loaded red blood cells: A novel approach to cancer immunotherapy. *Vaccine* **28**, 2965-2972.
- Barchichat, S. & Katz, E. (2002).** Immunization of rabbits with a modified vaccinia Ankara recombinant virus bearing the HIV envelope antigen on its outer membrane. *Virus Res* **90**, 243-251.
- Barrette, R. W., Metwally, S. A., Rowland, J. M., Xu, L., Zaki, S. R., Nichol, S. T., Rollin, P. E., Towner, J. S., Shieh, W. J. & other authors (2009).** Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science* **325**, 204-206.
- Belyakov, I. M., Earl, P., Dzutsev, A., Kuznetsov, V. A., Lemon, M., Wyatt, L. S., Snyder, J. T., Ahlers, J. D., Franchini, G. & other authors (2003).** Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9458-9463.
- Beniac, D. R., Melito, P. L., Devareennes, S. L., Hiebert, S. L., Rabb, M. J., Lamboo, L. L., Jones, S. M. & Booth, T. F. (2012).** The organisation of ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* **7**, e29608.
- Blanchard, T. J., Alcami, A., Andrea, P. & Smith, G. L. (1998).** Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* **79**, 1159-1167.
- Blaney, J. E., Wirblich, C., Papaneri, A. B., Johnson, R. F., Myers, C. J., Juelich, T. L., Holbrook, M. R., Freiberg, A. N., Bernbaum, J. G. & other authors (2011).** Inactivated or Live-Attenuated Bivalent Vaccines that Confer Protection against Rabies and Ebola Viruses. *J Virol.* **20**, 10605-10616.
- Bradfute, S. B. & Bavari, S. (2011).** Correlates of immunity to filovirus infection. *Viruses* **3**, 982-1000.
- Bradfute, S. B., Warfield, K. L. & Bavari, S. (2008).** Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **180**, 4058-4066.

- Bradfute, S. B., Swanson, P. E., Smith, M. A., Watanabe, E., McDunn, J. E., Hotchkiss, R. S. & Bavari, S. (2010).** Mechanisms and consequences of ebolavirus-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* **184**, 327-335.
- Bradfute, S. B., Braun, D. R., Shamblin, J. D., Geisbert, J. B., Paragas, J., Garrison, A., Hensley, L. E. & Geisbert, T. W. (2007).** Lymphocyte death in a mouse model of Ebola virus infection. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S296-304.
- Bray, M. (2005).** Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Curr Opin Immunol* **17**, 399-403.
- Bray, M. & Geisbert, T. W. (2005).** Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1560-1566.
- Bray, M., Davis, K., Geisbert, T., Schmaljohn, C. & Huggins, J. (1998).** A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **178**, 651-661.
- Breman, J. G. & Henderson, D. A. (2002).** Diagnosis and Management of Smallpox. *N Engl J Med* **346**, 1300-1308.
- Brooks, M. A., Ali, A. N., Turner, P. C. & Moyer, R. W. (1995).** A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J Virol* **69**, 7688-7698.
- Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W. J., Rollin, P. E., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Sanchez, A. (2006).** A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol* **80**, 2267-2279.
- Bukreyev, A., Rollin, P. E., Tate, M. K., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W. J., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Sanchez, A. (2007).** Successful Topical Respiratory Tract Immunization of Primates against Ebola Virus. *J Virol*. **81 (12)**, 6379-6388
- Bukreyev, A., Marzi, A., Feldmann, F., Zhang, L., Yang, L., Ward, J. M., Dorward, D. W., Pickles, R. J., Murphy, B. R. & other authors (2009).** Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. *Virology* **383**, 348-361.
- Bukreyev, A. A., Dinapoli, J. M., Yang, L., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2010).** Mucosal parainfluenza virus-vectored vaccine against Ebola virus replicates in the respiratory tract of vector-immune monkeys and is immunogenic. *Virology* **399**, 290-298.
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A. I., Kranzusch, P. J., Griffin, A. M. & other authors (2011).** Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**, 340-343.
- Carter, G. C., Rodger, G., Murphy, B. J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2003).** Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J Gen Virol* **84**, 2443-2458.
- CDC (2009a).** Progressive vaccinia in a military smallpox vaccinee - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 532-536.
- CDC (2009b).** Human vaccinia infection after contact with a raccoon rabies vaccine bait - Pennsylvania, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 1204-1207.
- CDC (2010).** Vaccinia virus infection after sexual contact with a military smallpox vaccinee -Washington, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **59**, 773-775.

- Chan, W. M. & Ward, B. M. (2010).** There is an A33-dependent mechanism for the incorporation of B5-GFP into vaccinia virus extracellular enveloped virions. *Virology* **402** (1), 83-93.
- Chan, W. M. & Ward, B. M. (2012).** The A33-Dependent Incorporation of B5 into Extracellular Enveloped Vaccinia Virions is Mediated Through an Interaction Between Their Luminal Domains. *J Virol* **86** (15), 8232-8244.
- Chaudhri, G., Panchanathan, V., Bluethmann, H. & Karupiah, G. (2006).** Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *J Virol* **80**, 6339-6344.
- Cherry, J. D., Connor, J. D., McIntosh, K., Benenson, A. S., Alling, D. W., Rolfe, U. T., Schanberger, J. E. & Mattheis, M. J. (1977).** Clinical and serologic study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administration. Standard percutaneous revaccination of children who receive primary subcutaneous vaccination. *J Infect Dis* **135**, 176-182.
- Cote, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C. M., Hensley, L., Li, Q., Ory, D. & other authors (2011).** Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **477** (7364), 344-348.
- Crance, J. M., Lamarque, D., Scaramozzino, N., Ferrier-Rembert, A., Agay, D. & Garin, D. (2002).** Variole : la menace fantôme. *Médecine et armées* **30**, 495-502.
- Crotty, S., Felgner, P., Davies, H., Glidewell, J., Villarreal, L. & Ahmed, R. (2003).** Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* **171**, 4969-4973.
- Croyle, M. A., Patel, A., Tran, K. N., Gray, M., Zhang, Y., Strong, J. E., Feldmann, H. & Kobinger, G. P. (2008).** Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. *PLoS One* **3**, e3548.
- D'Costa, S. M., Bainbridge, T. W., Kato, S. E., Prins, C., Kelley, K. & Condit, R. C. (2010).** Vaccinia H5 is a multifunctional protein involved in viral DNA replication, postreplicative gene transcription, and virion morphogenesis. *Virology* **401** (1), 49-60.
- Davies, D. H., McCausland, M. M., Valdez, C., Huynh, D., Hernandez, J. E., Mu, Y., Hirst, S., Villarreal, L., Felgner, P. L. & other authors (2005a).** Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. *J Virol* **79**, 11724-11733.
- Davies, D. H., Liang, X., Hernandez, J. E., Randall, A., Hirst, S., Mu, Y., Romero, K. M., Nguyen, T. T., Kalantari-Dehaghi, M. & other authors (2005b).** Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: High-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 547-552.
- Dimier, J., Ferrier-Rembert, A., Pradeau-Aubreton, K., Hebben, M., Spehner, D., Favier, A. L., Gratier, D., Garin, D., Crance, J. M. & other authors (2011).** Deletion of major non essential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. *J Virol* **85** (10), 5016-5026.
- Dolnik, O., Kolesnikova, L. & Becker, S. (2008).** Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci* **65**, 756-776.

- Dolnik, O., Volchkova, V., Garten, W., Carbonnelle, C., Becker, S., Kahnt, J., Stroher, U., Klenk, H. D. & Volchkov, V. (2004).** Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J* **23**, 2175-2184.
- Downie. (1939).** The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus. *Br J Exp Pathol* **20**, 158-176.
- Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V. & Sutter, G. (1998).** Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* **79**, 347-352.
- Dye, J. M., Herbert, A. S., Kuehne, A. I., Barth, J. F., Muhammad, M. A., Zak, S. E., Ortiz, R. A., Prugar, L. I. & Pratt, W. D. (2012).** Postexposure antibody prophylaxis protects nonhuman primates from filovirus disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5034-5039.
- Earl, P. L., Americo, J. L., Wyatt, L. S., Eller, L. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Hartmann, C. J., Jackson, D. L. & other authors (2004).** Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature* **428**, 182-185.
- Ebihara, H., Theriault, S., Neumann, G., Alimonti, J. B., Geisbert, J. B., Hensley, L. E., Groseth, A., Jones, S. M., Geisbert, T. W. & other authors (2007).** In vitro and in vivo characterization of recombinant Ebola viruses expressing enhanced green fluorescent protein. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S313-322.
- Edghill-Smith, Y., Bray, M., Whitehouse, C. A., Miller, D., Mucker, E., Manischewitz, J., King, L. R., Robert-Guroff, M., Hryniewicz, A. & other authors (2005).** Smallpox vaccine does not protect macaques with AIDS from a lethal monkeypox virus challenge. *J Infect Dis* **191**, 372-381.
- EMA (2002).** Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccine against smallpox.
- Empig, C., Kenner, J. R., Perret-Gentil, M., Youree, B. E., Bell, E., Chen, A., Gurwith, M., Higgins, K., Lock, M. & other authors (2006).** Highly attenuated smallpox vaccine protects rabbits and mice against pathogenic orthopoxvirus challenge. *Vaccine* **24 (17)**, 3686-3694.
- Falzarano, D., Geisbert, T. W. & Feldmann, H. (2011).** Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert Rev Vaccines* **10**, 63-77.
- Fang, M. & Sigal, L. J. (2005).** Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *J Immunol* **175**, 6829-6836.
- Favier, A. L., Flusin, O., Lepreux, S., Fleury, H., Labreze, C., Georges, A., Crance, J. M. & Boralevi, F. (2011).** Necrotic Ulcerated Lesion in a Young Boy Caused by Cowpox Virus Infection. *Case Rep Dermatol* **3**, 186-194.
- Feldmann, H. & Geisbert, T. W. (2011).** Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* **377**, 849-862.
- Feldmann, H., Jones, S. M., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Stroher, U., Grolla, A., Bray, M., Fritz, E. A., Fernando, L. & other authors (2007).** Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog* **3**, e2.
- Fenner, F. (1980).** The global eradication of smallpox. *Med J Aust* **1**, 455-455.

- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988).** *Smallpox and its eradication*. Geneva: WHO.
- Ferrier-Rembert, A., Drillien, R., Tournier, J. N., Garin, D. & Crance, J. M. (2007).** Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine* **25**, 4809-4817.
- Ferrier-Rembert, A., Drillien, R., Tournier, J. N., Garin, D. & Crance, J. M. (2008).** Short- and long-term immunogenicity and protection induced by non-replicating smallpox vaccine candidates in mice and comparison with the traditional 1st generation vaccine. *Vaccine* **26**, 1794-1804.
- Foster, S. O., Brink, E. W., Hutchins, D. L., Pifer, J. M., Lourie, B., Moser, C. R., Cummings, E. C., Kuteyi, O. E., Eke, R. E. & other authors (1972).** Human monkeypox. *Bull World Health Organ* **46**, 569-576.
- Freitas, M. S., Follmer, C., Costa, L. T., Vilani, C., Bianconi, M. L., Achete, C. A. & Silva, J. L. (2011).** Measuring the strength of interaction between the Ebola fusion peptide and lipid rafts: implications for membrane fusion and virus infection. *PLoS One* **6**, e15756.
- Frey, S. E., Newman, F. K., Kennedy, J. S., Ennis, F., Abate, G., Hoft, D. F. & Monath, T. P. (2009).** Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax in healthy vaccinia-naïve adults. *Vaccine* **27**, 1637-1644.
- Gaidamovich, S., Uvarov, V. N. & Alekseeva, A. A. (1966).** [Isolation of vesicular stomatitis virus from a patient]. *Vopr Virusol* **11**, 77-80.
- Garcel, A., Crance, J. M., Drillien, R., Garin, D. & Favier, A. L. (2007).** Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1906-1916.
- Garcel, A., Perino, J., Crance, J. M., Drillien, R., Garin, D. & Favier, A. L. (2008).** Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine* **88**, 1906-1916.
- Garin, D., Crance, J. M., Fuchs, F., Autran, B. & Drillien, R. (2004).** Actualités sur la vaccination antivariolique. Update on smallpox vaccines. *Médecine et maladies infectieuses* **34**, 20-27.
- Geisbert, T. W., Bausch, D. G. & Feldmann, H. (2010).** Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Rev Med Virol* **20** (6), 344-357.
- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Geisbert, J. B. & Jahrling, P. B. (2002a).** Evidence against an important role for infectivity-enhancing antibodies in Ebola virus infections. *Virology* **293**, 15-19.
- Geisbert, T. W., Pushko, P., Anderson, K., Smith, J., Davis, K. J. & Jahrling, P. B. (2002b).** Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **8**, 503-507.
- Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Leung, A., Daddario-DiCaprio, K. M., Hensley, L. E., Grolla, A. & Feldmann, H. (2009).** Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus. *J Virol* **83**, 7296-7304.
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Reed, D. S., Feldmann, F., Grolla, A., Stroher, U., Fritz, E. A., Hensley, L. E. & other authors (2008).** Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine* **26**, 6894-6900.

- Geisbert, T. W., Bailey, M., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, J., Stanley, D., Honko, A., Johnson, J., Mulangu, S. & other authors (2011).** Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J Virol* **85**, 4222-4233.
- Gilligan (1997).** *Assessment of protective immunity conferred by recombinant vaccinia virus to guinea pigs challenged with Ebola virus Vaccines.* Cold Spring Harbor Laboratory press, 87-92.
- Glatz, M., Richter, S., Ginter-Hanselmayer, G., Aberer, W. & Mullegger, R. R. (2010).** Human cowpox in a veterinary student. *Lancet Infect Dis* **10**, 288.
- Gnirss, K., Kuhl, A., Karsten, C., Glowacka, I., Bertram, S., Kaup, F., Hofmann, H. & Pohlmann, S. (2012).** Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of Tmprss2 expression. *Virology* **424**, 3-10.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Krupa, M., Perdiguero, B. & Esteban, M. (2011).** MVA and NYVAC as Vaccines Against Emergent Infectious Diseases and Cancer. *Curr Gene Ther* **11** (3), 189-217.
- Gordon, S. N., Cecchinato, V., Andresen, V., Heraud, J. M., Hryniewicz, A., Parks, R. W., Venzon, D., Chung, H. K., Karpova, T. & other authors (2011).** Smallpox vaccine safety is dependent on T cells and not B cells. *J Infect Dis* **203**, 1043-1053.
- Greenberg, R. N., Kennedy, J. S., Clanton, D. J., Plummer, E. A., Hague, L., Cruz, J., Ennis, F. A., Blackwelder, W. C. & Hopkins, R. J. (2005).** Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* **365**, 398-409.
- Gunther, S., Feldmann, H., Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Rollin, P. E., Nichol, S. T., Stroher, U., Artsob, H., Peters, C. J. & other authors (2011).** Management of accidental exposure to ebola virus in the biosafety level 4 laboratory, hamburg, Germany. *J Infect Dis* **204 Suppl 3**, S785-790.
- Gupta, M., Macneil, A., Reed, Z. D., Rollin, P. E. & Spiropoulou, C. F. (2012).** Serology and cytokine profiles in patients infected with the newly discovered Bundibugyo ebolavirus. *Virology* **423**, 119-124.
- Gupta, M., Mahanty, S., Greer, P., Towner, J. S., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Ahmed, R. & Rollin, P. E. (2004).** Persistent infection with ebola virus under conditions of partial immunity. *J Virol* **78**, 958-967.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M. & Slifka, M. K. (2003).** Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* **9**, 1131-1137.
- Hartman, A. L., Bird, B. H., Towner, J. S., Antoniadou, Z. A., Zaki, S. R. & Nichol, S. T. (2008).** Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus. *J Virol* **82**, 2699-2704.
- Hashizume, S., Morita, M. & Takahashi, F. (1987).** [New technology of vaccine production--international prospect of the development. Method and theory of production of vaccines by genetic engineering. a. Vaccinia vector vaccine]. *Nippon Rinsho* **45**, 2333-2341.
- Hayman, D. T., Yu, M., Crameri, G., Wang, L. F., Suu-Ire, R., Wood, J. L. & Cunningham, A. A. (2012).** Ebola virus antibodies in fruit bats, ghana, west Africa. *Emerg Infect Dis* **18**, 1207-1209.

- Hemmer, C. J., Littmann, M., Lobermann, M., Meyer, H., Petschaelis, A. & Reisinger, E. C. (2010).** Human cowpox virus infection acquired from a circus elephant in Germany. *Int J Infect Dis* **14 Suppl 3**, e338-40.
- Henderson, D. A. & Moss, B. (1999).** Chapter 6 : Smallpox and Vaccinia. In *Vaccines 3rd edition*. Edited by Plotkin S.A. & Orenstein W.A.
- Henderson, D. A., Inglesby, T. V., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Jahrling, P. B., Hauer, J., Layton, M., McDade, J. & other authors (1999).** Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama* **281**, 2127-2137.
- Hensley, L. E., Mulangu, S., Asiedu, C., Johnson, J., Honko, A. N., Stanley, D., Fabozzi, G., Nichol, S. T., Ksiazek, T. G. & other authors (2010).** Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog* **6**, e1000904.
- Hitt, M. M. & Gauldie, J. (2000).** Gene vectors for cytokine expression in vivo. *Curr Pharm Des* **6**, 613-632.
- Hoenen, T., Groseth, A. & Feldmann, H. (2012).** Current ebola vaccines. *Expert Opin Biol Ther* **12 (7)**, 859-872.
- Hood, C. L., Abraham, J., Boyington, J. C., Leung, K., Kwong, P. D. & Nabel, G. J. (2010).** Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity. *J Virol* **84**, 2972-2982.
- Hooper, J. W., Custer, D. M. & Thompson, E. (2003).** Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology* **306**, 181-195.
- Hooper, J. W., Thompson, E., Wilhelmsen, C., Zimmerman, M., Ichou, M. A., Steffen, S. E., Schmaljohn, C. S., Schmaljohn, A. L. & Jahrling, P. B. (2004).** Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *J Virol* **78**, 4433-4443.
- Hutchinson, K. L. & Rollin, P. E. (2007).** Cytokine and chemokine expression in humans infected with Sudan Ebola virus. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S357-363.
- Jahrling, P. B., Zaucha, G. M. & Huggins, J. W. (2000).** Chapter 13 : Countermeasures to the reemergence of Smallpox virus as an agent of bioterrorism. *Emerging infections 4*, 187-200.
- Johnson, E., Jaax, N., White, J. & Jahrling, P. (1995).** Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int J Exp Pathol* **76**, 227-236.
- Jones, S. M., Feldmann, H., Stroher, U., Geisbert, J. B., Fernando, L., Grolla, A., Klenk, H. D., Sullivan, N. J., Volchkov, V. E. & other authors (2005).** Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* **11**, 786-790.
- Kantoff, P. W., Schuetz, T. J., Blumenstein, B. A., Glode, L. M., Bilhartz, D. L., Wyand, M., Manson, K., Panicali, D. L., Laus, R. & other authors (2010).** Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* **28 (7)**, 1099-1105.
- Karupiah, G., Buller, R. M., Van Rooijen, N., Duarte, C. J. & Chen, J. (1996).** Different roles for CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *J Virol* **70**, 8301-8309.

- Katz, E., Wolffe, E. J. & Moss, B. (1997).** The cytoplasmic and transmembrane domains of the vaccinia virus B5R protein target a chimeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein to the outer envelope of nascent vaccinia virions. *J Virol* **71**, 3178-3187.
- Kennedy, J. S., Gurwith, M., Dekker, C. L., Frey, S. E., Edwards, K. M., Kenner, J., Lock, M., Empig, C., Morikawa, S. & other authors (2011).** Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Infect Dis* **204** (9), 1395-1402.
- Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Jacobson, R. M. & Poland, G. A. (2009).** The immunology of smallpox vaccines. *Curr Opin Immunol* **21**, 314-320.
- Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Pankratz, V. S., Haralambieva, I. H., Vierkant, R. A., Jacobson, R. M. & Poland, G. A. (2012).** Genome-wide genetic associations with IFN γ response to smallpox vaccine. *Hum Genet* **131** (9), 1433-1451.
- Kenner, J., Cameron, F., Empig, C., Jobs, D. V. & Gurwith, M. (2006).** LC16m8: An attenuated smallpox vaccine. *Vaccine* **24** (47-48), 7009-7022.
- Kidokoro, M., Tashiro, M. & Shida, H. (2005).** Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4152-4157.
- Kobinger, G. P., Feldmann, H., Zhi, Y., Schumer, G., Gao, G., Feldmann, F., Jones, S. & Wilson, J. M. (2006).** Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* **346**, 394-401.
- Kortepeter, M. G., Bausch, D. G. & Bray, M. (2011).** Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* **204** Suppl 3, S810-816.
- Kuhn, J. H. (2008).** Filoviruses. A compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Arch Virol Suppl* **20**, 13-360.
- Kuhn, J. H., Becker, S., Ebihara, H., Geisbert, T. W., Johnson, K. M., Kawaoka, Y., Lipkin, W. I., Negredo, A. I., Netesov, S. V. & other authors (2010).** Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol* **155**, 2083-2103.
- Lane, J. M. (1969).** Vaccination and Henoch-Schoenlein purpura. *N Engl J Med* **280**, 781.
- Ledgerwood, J. E., Costner, P., Desai, N., Holman, L., Enama, M. E., Yamshchikov, G., Mulangu, S., Hu, Z., Andrews, C. A. & other authors (2010).** A replication defective recombinant Ad5 vaccine expressing Ebola virus GP is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* **29**, 304-313.
- Lee, J. E., Fusco, M. L., Hessel, A. J., Oswald, W. B., Burton, D. R. & Saphire, E. O. (2008).** Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* **454**, 177-182.
- Lee, J. E., Fusco, M. L., Abelson, D. M., Hessel, A. J., Burton, D. R. & Saphire, E. O. (2009).** Techniques and tactics used in determining the structure of the trimeric ebolavirus glycoprotein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 1162-1180.
- Leroy, E., Baize, S. & Gonzalez, J. P. (2011a).** [Ebola and Marburg hemorrhagic fever viruses: update on filoviruses]. *Med Trop (Mars)* **71**, 111-121.
- Leroy, E. M., Gonzalez, J. P. & Baize, S. (2011b).** Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin Microbiol Infect* **17**, 964-976.
- Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Delicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J. P. & other authors (2005).** Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**, 575-576.

- Lupton, H. W., Lambert, R. D., Bumgardner, D. L., Moe, J. B. & Eddy, G. A. (1980).** Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model. *Lancet* **2**, 1294-1295.
- Mack, T. M., Noble, J., Jr. & Thomas, D. B. (1972).** A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *Am J Trop Med Hyg* **21**, 214-218.
- Martinez, O., Leung, L. W. & Basler, C. F. (2012).** The role of antigen-presenting cells in filoviral hemorrhagic fever: Gaps in current knowledge. *Antiviral Res* **93** (3), 416-428.
- Maruyama, T., Rodriguez, L. L., Jahrling, P. B., Sanchez, A., Khan, A. S., Nichol, S. T., Peters, C. J., Parren, P. W. & Burton, D. R. (1999).** Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J Virol* **73**, 6024-6030.
- Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K. & Singer, H. (1978).** [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* **167**, 375-390.
- Meisinger-Henschel, C., Spath, M., Lukassen, S., Wolferstatter, M., Kachelriess, H., Baur, K., Dirmeier, U., Wagner, M., Chaplin, P. & other authors (2010).** Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice. *J Virol* **84**, 9907-9919.
- Mercer, J. & Helenius, A. (2008).** Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535.
- Meseda, C. A., Mayer, A. E., Kumar, A., Garcia, A. D., Campbell, J., Listrani, P., Manischewitz, J., King, L. R., Golding, H. & other authors (2009).** Comparative evaluation of the immune response and protection engendered by LC16m8 and Dryvax smallpox vaccines in a mouse model. *Clin Vaccine Immunol* **16** (9), 1261-1271.
- Meyer, H., Sutter, G. & Mayr, A. (1991).** Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* **72**, 1031-1038.
- Mire, C. E., Miller, A. D., Carville, A., Westmoreland, S. V., Geisbert, J. B., Mansfield, K. G., Feldmann, H., Hensley, L. E. & Geisbert, T. W. (2012).** Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1567.
- Mohamadzadeh, M., Chen, L. & Schmaljohn, A. L. (2007).** How Ebola and Marburg viruses battle the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**, 556-567.
- Monath, T. P., Caldwell, J. R., Mundt, W., Fusco, J., Johnson, C. S., Buller, M., Liu, J., Gardner, B., Downing, G. & other authors (2004).** ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) - a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int J Infect Dis* **8 Suppl 2**, 31-44.
- Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., Saijo, M., Maeda, A., Kurane, I., Maeno, G., Kimura, J., Hiram, C. & other authors (2005).** An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* **79**, 11873-11891.
- Moss, B. (2006).** Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**, 48-54.

- Moss, B., Rosenblum, E. N. & Garon, C. F. (1973).** Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus. 3. Purification and biosynthesis of the virion glycoprotein. *Virology* **55**, 143-156.
- MSJS (2003).** Le plan national de réponse à une menace de variole.
- Mupapa, K., Massamba, M., Kibadi, K., Kuvula, K., Bwaka, A., Kipasa, M., Colebunders, R. & Muyembe-Tamfum, J. J. (1999).** Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S18-23.
- NIH Clinical Trials.
- Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., Meyer, H., Capek, I., Zandotti, C. & other authors (2009).** Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis* **15**, 781-784.
- Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U. & other authors (1998).** Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* **177**, 1664-1673.
- Olejník, J., Ryabchikova, E., Corley, R. B. & Muhlberger, E. (2011).** Intracellular Events and Cell Fate in Filovirus Infection. *Viruses* **3**, 1501-1531.
- Olinger, G. G., Bailey, M. A., Dye, J. M., Bakken, R., Kuehne, A., Kondig, J., Wilson, J., Hogan, R. J. & Hart, M. K. (2005).** Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. *J Virol* **79**, 14189-14196.
- Oswald, W. B., Geisbert, T. W., Davis, K. J., Geisbert, J. B., Sullivan, N. J., Jahrling, P. B., Parren, P. W. & Burton, D. R. (2007).** Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog* **3**, e9.
- Panchal, R. G., Bradfute, S. B., Peyser, B. D., Warfield, K. L., Ruthel, G., Lane, D., Kenny, T. A., Anderson, A. O., Raschke, W. C. & other authors (2009).** Reduced levels of protein tyrosine phosphatase CD45 protect mice from the lethal effects of Ebola virus infection. *Cell Host Microbe* **6**, 162-173.
- Papaneri, A. B., Christophwirthlich, Cooper, K., Jahrling, P. B., Schnell, M. J. & Blaney, J. E. (2012).** Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine*. **30 (43)**, 6136-6141
- Parren, P. W., Geisbert, T. W., Maruyama, T., Jahrling, P. B. & Burton, D. R. (2002).** Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *J Virol* **76**, 6408-6412.
- Pastoret, P. P. & Brochier, B. (1996).** The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol Infect* **116**, 235-240.
- Pratt, W. D., Wang, D., Nichols, D. K., Luo, M., Woraratanadharm, J., Dye, J. M., Holman, D. H. & Dong, J. Y. (2010).** Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 572-581.

- Qiu, X., Fernando, L., Alimonti, J. B., Melito, P. L., Feldmann, F., Dick, D., Stroher, U., Feldmann, H. & Jones, S. M. (2009).** Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSVDeltaG/ZEBOVGP vaccine stimulates strong ebola GP-specific immune responses. *PLoS One* **4**, e5547.
- Quiroz, E., Moreno, N., Peralta, P. H. & Tesh, R. B. (1988).** A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am J Trop Med Hyg* **39**, 312-314.
- Ramanan, P., Shabman, R. S., Brown, C. S., Amarasinghe, G. K., Basler, C. F. & Leung, D. W. (2011).** Filoviral immune evasion mechanisms. *Viruses* **3**, 1634-1649.
- Rao, M., Bray, M., Alving, C. R., Jahrling, P. & Matyas, G. R. (2002).** Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J Virol* **76**, 9176-9185.
- Raoult, D. (2003).** [The concept of emerging and infectious diseases in the 21st century]. *Rev Med Interne* **24 Suppl 1**, 27s-29s.
- Reed, D. S., Lackemeyer, M. G., Garza, N. L., Sullivan, L. J. & Nichols, D. K. (2011).** Aerosol exposure to Zaire ebolavirus in three nonhuman primate species: differences in disease course and clinical pathology. *Microbes Infect* **13 (11)**, 930-936.
- Reif, J. S., Webb, P. A., Monath, T. P., Emerson, J. K., Poland, J. D., Kemp, G. E. & Cholas, G. (1987).** Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: infection in occupational risk groups. *Am J Trop Med Hyg* **36**, 177-182.
- Reynard, O., Borowiak, M., Volchkova, V. A., Delpeut, S., Mateo, M. & Volchkov, V. E. (2009).** Ebola virus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. *J Virol* **83 (18)**, 9596-9601.
- Reynolds, M. G. & Damon, I. K. (2012).** Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. *Trends Microbiol* **20 (2)**, 80-87.
- Richardson, J. S., Yao, M. K., Tran, K. N., Croyle, M. A., Strong, J. E., Feldmann, H. & Kobinger, G. P. (2009).** Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One* **4**, e5308.
- Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J. & Rose, J. K. (1999).** Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**, 3723-3732.
- Rupprecht, C. E., Blass, L., Smith, K., Orciari, L. A., Niezgod, M., Whitfield, S. G., Gibbons, R. V., Guerra, M. & Hanlon, C. A. (2001).** Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* **345**, 582-586.
- Sanchez, A., Geisbert, T. W. & Feldmann, H. (2006).** Chapitre 40 Filoviridae : Marburg and Ebola viruses. In *Fields Virology* vol. 1, pp. 1409-1448. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus: Lippincott Williams and Wilkins.
- Sanchez, A., Lukwiya, M., Bausch, D., Mahanty, S., Sanchez, A. J., Wagoner, K. D. & Rollin, P. E. (2004).** Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol* **78**, 10370-10377.
- Sayama, Y., Demetria, C., Saito, M., Azul, R. R., Taniguchi, S., Fukushi, S., Yoshikawa, T., Iizuka, I., Mizutani, T. & other authors (2012).** A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res* **8**, 82.
- Schmidt, A. C., McAuliffe, J. M., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2001).** Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory

- syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J Virol* **75**, 4594-4603.
- Schornerberg, K., Matsuyama, S., Kabsch, K., Delos, S., Bouton, A. & White, J. (2006).** Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **80**, 4174-4178.
- Seaman, M. S., Wilck, M. B., Baden, L. R., Walsh, S. R., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A., Noble, L. C., Kleinjan, J. A. & other authors (2010).** Effect of vaccination with modified vaccinia Ankara (ACAM3000) on subsequent challenge with Dryvax. *J Infect Dis* **201**, 1353-1360.
- Senkevich, T. G., Ward, B. M. & Moss, B. (2004).** Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* **78**, 2357-2366.
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. (2005).** Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18572-18577.
- Shisler, J. L., Isaacs, S. N. & Moss, B. (1999).** Vaccinia virus serpin-1 deletion mutant exhibits a host range defect characterized by low levels of intermediate and late mRNAs. *Virology* **262**, 298-311.
- Simmons, G., Wool-Lewis, R. J., Baribaud, F., Netter, R. C. & Bates, P. (2002).** Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence. *J Virol* **76**, 2518-2528.
- Simmons, G., Lee, A., Rennekamp, A. J., Fan, X., Bates, P. & Shen, H. (2004).** Identification of murine T-cell epitopes in Ebola virus nucleoprotein. *Virology* **318**, 224-230.
- Skiadopoulos, M. H., Surman, S. R., Riggs, J. M., Collins, P. L. & Murphy, B. R. (2001).** A chimeric human-bovine parainfluenza virus type 3 expressing measles virus hemagglutinin is attenuated for replication but is still immunogenic in rhesus monkeys. *J Virol* **75**, 10498-10504.
- Smith, G. L. (2007).** Genus Orthopoxvirus: Vaccinia Virus. In *Poxviruses* 1-45. Edited by Mercer A., Schmidt A. & Weber O: Birkhäuser Basel.
- Smith, G. L. & Law, M. (2004).** The exit of Vaccinia virus from infected cells. *Virus Res* **106**, 189-197.
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A. & Law, M. (2002).** The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* **83**, 2915-2931.
- Sugimoto, M. & Yamanouchi, K. (1994).** Characteristics of an attenuated vaccinia virus strain, LC16m0, and its recombinant virus vaccines. *Vaccine* **12**, 675-681.
- Sullivan, N. J., Martin, J. E., Graham, B. S. & Nabel, G. J. (2009).** Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule. *Nat Rev Microbiol* **7**, 393-400.
- Sullivan, N. J., Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Shedlock, D. J., Xu, L., Lamoreaux, L., Custers, J. H., Popernack, P. M., Yang, Z. Y. & other authors (2006).** Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* **3**, e177.
- Sun, Y., Carrion, R., Jr., Ye, L., Wen, Z., Ro, Y. T., Brasky, K., Ticer, A. E., Schwegler, E. E., Patterson, J. L. & other authors (2009).** Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology* **383**, 12-21.
- Sundar, K., Boesen, A. & Coico, R. (2007).** Computational prediction and identification of HLA-A2.1-specific Ebola virus CTL epitopes. *Virology* **360**, 257-263.

- Takada, A. (2012).** Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Front Microbiol* **3**, 34.
- Takada, A., Feldmann, H., Stroehrer, U., Bray, M., Watanabe, S., Ito, H., McGregor, M. & Kawaoka, Y. (2003).** Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol* **77**, 1069-1074.
- Tang, J., Murtadha, M., Schnell, M., Eisenlohr, L. C., Hooper, J. & Flomenberg, P. (2006).** Human T-cell responses to vaccinia virus envelope proteins. *J Virol* **80**, 10010-10020.
- Taniguchi, S., Watanabe, S., Masangkay, J. S., Omatsu, T., Ikegami, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Fujii, H. & other authors (2011).** Reston ebolavirus antibodies in bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis* **17**, 1559-1560.
- Tao, T., Skiadopoulos, M. H., Davoodi, F., Surman, S. R., Collins, P. L. & Murphy, B. R. (2001).** Construction of a live-attenuated bivalent vaccine virus against human parainfluenza virus (PIV) types 1 and 2 using a recombinant PIV3 backbone. *Vaccine* **19**, 3620-3631.
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B. & other authors (1992).** NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**, 217-232.
- Towner, J. S., Pourrut, X., Albarino, C. G., Nkogwe, C. N., Bird, B. H., Grard, G., Ksiazek, T. G., Gonzalez, J. P., Nichol, S. T. & other authors (2007).** Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One* **2**, e764.
- Towner, J. S., Sealy, T. K., Khristova, M. L., Albarino, C. G., Conlan, S., Reeder, S. A., Quan, P. L., Lipkin, W. I., Downing, R. & other authors (2008).** Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* **4**, e1000212.
- Tscharke, D. C., Karupiah, G., Zhou, J., Palmore, T., Irvine, K. R., Haeryfar, S. M., Williams, S., Sidney, J., Sette, A. & other authors (2005).** Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J Exp Med* **201**, 95-104.
- Verheust, C., Goossens, M., Pauwels, K. & Breyer, D. (2012).** Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine* **30** (16), 2623-2632.
- Vogel, S., Sardy, M., Glos, K., Korting, H. C., Ruzicka, T. & Wollenberg, A. (2012).** The munich outbreak of cutaneous cowpox infection: transmission by infected pet rats. *Acta Derm Venereol* **92**, 126-131.
- Volchkov, V. E., Blinov, V. M. & Netesov, S. V. (1992).** The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS Lett* **305**, 181-184.
- Volchkov, V. E., Becker, S., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., Kotov, A. N., Netesov, S. V. & Klenk, H. D. (1995).** GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* **214**, 421-430.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O. & Klenk, H. D. (2001).** Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**, 1965-1969.
- Vollmar, J., Arndtz, N., Eckl, K. M., Thomsen, T., Petzold, B., Mateo, L., Schlereth, B., Handley, A., King, L. & other authors (2006).** Safety and immunogenicity of

- IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine* **24**, 2065-2070.
- von Krempelhuber, A., Vollmar, J., Pokorny, R., Rapp, P., Wulff, N., Petzold, B., Handley, A., Mateo, L., Siersbol, H. & other authors (2010).** A randomized, double-blind, dose-finding Phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE. *Vaccine* **28**, 1209-1216.
- Von Magnus, P., Andersen, E. K., Petersen, K. B. & Birchandersen, A. (1959).** A poxlike disease in cynomolgus monkeys. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica* **46**, 156-177.
- Walsh, S. R. & Dolin, R. (2011).** Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vaccines* **10**, 1221-1240.
- Warfield, K. L. & Olinger, G. G. (2011).** Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic Fever. *J Biomed Biotechnol* **2011** Article 984241.
- Warfield, K. L., Swenson, D. L., Olinger, G. G., Kalina, W. V., Aman, M. J. & Bavari, S. (2007).** Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S430-437.
- Warfield, K. L., Bosio, C. M., Welcher, B. C., Deal, E. M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., Aman, M. J. & Bavari, S. (2003).** Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15889-15894.
- Warfield, K. L., Olinger, G., Deal, E. M., Swenson, D. L., Bailey, M., Negley, D. L., Hart, M. K. & Bavari, S. (2005).** Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol* **175**, 1184-1191.
- Wauquier, N., Becquart, P., Gasquet, C. & Leroy, E. M. (2009).** Immunoglobulin G in Ebola outbreak survivors, Gabon. *Emerg Infect Dis* **15**, 1136-1137.
- White, J. M. & Schornberg, K. L. (2012).** A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat Rev Microbiol* **10**, 317-322.
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P. & other authors (1984).** Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7194-7198.
- Wilck, M. B., Seaman, M. S., Baden, L. R., Walsh, S. R., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A., Kleinjan, J. A., Noble, L. C. & other authors (2010).** Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara (ACAM3000): effect of dose and route of administration. *J Infect Dis* **201**, 1361-1370.
- Wilson, J. A. & Hart, M. K. (2001).** Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* **75**, 2660-2664.
- Wilson, J. A., Hevey, M., Bakken, R., Guest, S., Bray, M., Schmaljohn, A. L. & Hart, M. K. (2000).** Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* **287**, 1664-1666.
- Wu, S., Yu, T., Song, X., Yi, S., Hou, L. & Chen, W. (2012).** Prediction and identification of mouse cytotoxic T lymphocyte epitopes in Ebola virus glycoproteins. *Virol J* **9**, 111.
- Wyatt, L. S., Earl, P. L., Eller, L. A. & Moss, B. (2004).** Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 (13)**, 4590-4595.

- Xu, R., Johnson, A. J., Liggitt, D. & Bevan, M. J. (2004).** Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J Immunol* **172**, 6265-6271.
- Yamaguchi, M., Kimura, M., and Hirayama, M (1975).** Report of committee on smallpox vaccination. Investigation of treatment of complications caused by smallpox vaccination, pp. 269-278. Edited by J. m. o. health: Clin Virol

RESUME

Le virus Ebola, responsable d'une fièvre hémorragique virale létale et le virus de la variole, agent étiologique de la variole, sont des armes biologiques potentielles. Il n'existe pas de traitement ou de prophylaxie autorisés contre le virus Ebola, quelques candidats vaccins étant en cours de développement. Concernant la variole, des vaccins dits de première génération (virus de la vaccine) ont permis l'éradication de la maladie cependant ils sont à l'origine de complications post-vaccinales parfois sévères alors que des vaccins plus récents dits de troisième génération, non-réplicatifs, ont été développés pour leur innocuité mais restent faiblement immunogènes.

Nous avons récemment développé plusieurs vecteurs viraux de type virus de la vaccine (VACV) par délétion d'un certain nombre de facteurs de virulence. Nous avons évalué leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité en tant que candidats vaccins antivarioliques chez la souris puis utilisé l'un de ces vecteurs pour développer un candidat vaccin bivalent antivariolique et anti-virus Ebola.

Ces virus de la vaccine délétés sont réplicatifs mais fortement atténués. Ils induisent une réponse en anticorps neutralisants spécifiques anti-vaccine similaire à celle induite par le vaccin antivariolique de première génération et induisent des réponses immunitaires cellulaires CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques suffisantes pour protéger l'animal d'une épreuve létale de cowpoxvirus en intranasal, simulant une infection par le virus de la variole. Le virus délété le plus immunogène et le plus sûr, nommé MVL, a été utilisé pour construire un vecteur viral codant pour la glycoprotéine du virus Ebola (GP). Le gène entier de la GP ou une forme chimérique de la GP (fusion entre l'ectodomaine de la GP et le domaine transmembranaire de la glycoprotéine B5 du VACV) ont été clonés dans le génome du vecteur viral. Ces deux vecteurs produisent des virus ayant incorporé EGP dans leur enveloppe. Ces deux candidats vaccins recombinants induisent de fortes réponses humorales spécifiques anti-GP d'Ebola et anti-vaccine chez la souris immunocompétente. En conclusion, nous avons développé plusieurs candidats vaccins antivarioliques aussi immunogènes et efficaces que le vaccin historique et avec une atténuation similaire aux vaccins de troisième génération. L'un de ces candidats (MVL) a été utilisé comme vecteur viral pour exprimer la glycoprotéine hétérologue, contre laquelle il induit une réponse immunitaire humorale forte.

ABSTRACT

Ebola virus, causing a lethal haemorrhagic fever and variola virus, the agent of smallpox are potential biological weapons. There is no treatment and no prophylaxis authorised against Ebola, although some vaccine viral vectors were developed over the last few years. Concerning smallpox, several types of vaccines exist against smallpox (based on vaccinia virus), the first generation vaccines that allowed disease eradication but were responsible for some post-vaccination complications and non-replicative 3rd generation vaccines which are safe but not very immunogenic.

We have recently developed several vaccinia virus (VACV) mutants by deletion of selected virulence genes, and we have evaluated their safety, immunogenicity and efficacy as smallpox vaccines in mice and used one of them as a bivalent vaccine against Ebola and smallpox.

These viral vectors are highly attenuated and replication competent. They induce a neutralizing specific-VACV antibody response similar to that of the historical vaccine and induce VACV-specific CD8⁺ and CD4⁺ immune responses sufficient to protect immunocompetent mice challenged intranasally by cowpox virus, simulating variola virus infection. The safest and most immunogenic vaccinia virus mutant, named MVL, has been used to construct a vector encoding the Ebola glycoprotein (GP) for immunization against Ebola. The native GP gene or a chimeric GP gene (fusion between the GP ectodomain and the transmembrane domain of the VACV B5 glycoprotein) have been cloned into the viral vector genome. These two recombinant vaccine candidates induce specific humoral immune responses against Ebola GP and vaccinia virus in immunocompetent mice.

In conclusion, we have developed several vaccine candidates against smallpox that are as immunogenic and protective as the historical vaccine and as safe as 3rd generation vaccines. One of these candidates, MVL, has been used as a viral vector to express the heterologous glycoprotein, against which it induces a strong humoral immune response.