

Ebola et Marburg : les hommes contre-attaquent

Nathalie Alazard-Dany,
Michèle Ottmann Terrangle, Viktor Volchkov

► La fréquence des épidémies de fièvres hémorragiques à virus Ebola ou Marburg constatée en Afrique Centrale est en augmentation depuis une dizaine d'années. Une vigilance accrue permet de détecter très précocement la plupart de ces épidémies, mais une quarantaine stricte reste le seul moyen de lutter contre ces virus : en effet, il n'existe à ce jour ni vaccin, ni traitement utilisable chez l'homme, même si la recherche progresse. Cet article fait le point sur deux résultats récents. Le premier est la découverte du mécanisme par lequel la glycoprotéine de surface du virus Ebola est activée pour réaliser la fusion des membranes virale et cellulaire : il s'agit d'un clivage protéolytique médié par des protéases endosomales, et cette découverte pourrait avoir des applications thérapeutiques. Le second résultat concerne la réussite d'essais vaccinaux chez le singe, un succès encourageant pour le développement de vaccins chez l'homme. ◀



Laboratoire des Filovirus,
Inserm U758, ENS Lyon,
IFR 128 BioSciences

Lyon-Gerland,
Université Claude Bernard
Lyon 1, 21, avenue Tony Garnier,
69365 Lyon Cedex 07, France.
volchkov@cervi-lyon.inserm.fr

cents morts. Adapter au mieux les mesures de quarantaine pour qu'elles soient plus facilement acceptées et améliorer encore les réseaux de veille sani-

taire sont les préoccupations constantes des équipes locales et internationales impliquées dans la lutte contre ces fièvres hémorragiques (<http://www.who.int>).

Le virus Marburg et le virus Ebola (qui comprend quatre espèces différentes) sont des virus enveloppés à ARN négatif simple brin qui forment la famille des *Filoviridae*. Leur réservoir naturel reste mal connu, mais la plupart des épidémies humaines commencent lors d'un contact avec des animaux - eux aussi victimes de ces virus - trouvés morts en forêt [1] (→). La surveillance des épidémies à virus Ebola qui déciment les populations de grands singes a d'ailleurs déjà permis de prévoir avec plusieurs semaines d'avance l'apparition d'épidémies humaines [2, 3]. Ces virus se transmettent à la faveur de contacts avec des fluides corporels infectés, et se propagent principalement dans la population lors d'activités de soins ou de rituels funéraires non protégés. Pour combattre et étudier ces virus, le seul moyen de s'en protéger reste donc le port de tenues de protection prévenant tout contact avec les liquides potentiellement contaminés (Figure 1). Les autorités s'inquiètent de l'augmentation du nombre d'épidémies en Afrique [2, 4], mais aussi de l'utilisation potentielle de ces virus à des fins bioterroristes. Cependant, la recherche

(→) m/s
2006, n° 1,
p. 78

« Ebola 2002 & 2003 » et « O trio contra Marburg » ne sont pas les titres de nouveaux films à sensation mettant en scène les dangereux virus Ebola et Marburg, mais de chansons composées par des musiciens locaux lors de récentes épidémies. À leur façon, ces musiciens ont contribué à l'important effort d'information des populations touchées par ces fièvres hémorragiques virales. En effet, les mesures d'isolement des malades et de suivi de leurs proches imposées lors des épidémies sont très mal acceptées. Cette réaction est compréhensible : en l'absence de vaccin ou de traitement, l'entrée dans le pavillon d'isolement est le plus souvent synonyme de mort. L'application stricte des mesures de quarantaine est pourtant indispensable au contrôle des épidémies. L'identification précoce des premiers cas, qui incombe aux réseaux de surveillance et d'alerte, est elle aussi capitale pour limiter le nombre de victimes. En 2005, une épidémie à virus Ebola en République du Congo, détectée très tôt, n'a fait qu'une dizaine de victimes, alors qu'une épidémie à virus Marburg en Angola, détectée plus tardivement, a fait plus de trois

Article reçu le 30 août 2005, accepté le 25 novembre 2005.

progresses : deux avancées significatives vers le développement d'un traitement [5] et d'un vaccin [6] sont discutées ici.

Inhiber l'activité de la glycoprotéine GP pour bloquer le virus Ebola

La glycoprotéine (GP) du virus Ebola est la seule protéine transmembranaire exprimée, sous forme de trimères, à la surface des



Figure 1. Tenues de protection permettant de travailler avec les filovirus.

A. Personnel soignant se rendant au pavillon d'isolement lors de l'épidémie à virus Ebola à Mekambo, au Gabon, en 2000 (photo, H. Zeller). L'aspect effrayant de ces tenues contribue à alimenter la méfiance des populations vis-à-vis des équipes qui travaillent au contrôle des épidémies (<http://www.who.int>). **B.** Analyse d'échantillons de la faune locale à la recherche du réservoir du virus de Marburg à Durba, République Démocratique du Congo, en 1999 (photo, H. Zeller). Parmi les milliers d'échantillons animaux analysés, seules quelques chauve-souris récemment étudiées ont montré des signes d'infection, ce qui en fait le candidat réservoir le plus probable. **C.** Chercheurs du Laboratoire des Filovirus, Inserm U758, travaillant en scaphandre pressurisé au laboratoire P4 Inserm Jean Mérieux à Lyon, France, en 2005 (photo, laboratoire P4 : <http://www.cervi-lyon.inserm.fr>).

cellules infectées et des virions (Figure 2) ; elle est donc particulièrement exposée au système immunitaire, ce qui en fait une protéine de choix pour le développement de vaccins [6]. La GP est synthétisée sous la forme d'un précurseur clivé par l'endoprotéase furine en deux sous-unités, GP1, extracellulaire, et GP2, transmembranaire, reliées entre elles par des ponts disulfures [7]. L'expression de la GP du virus Ebola nécessite un phénomène d'édition (*RNA editing*) lors de la transcription : l'ajout d'un nucléotide non codé par le génome entraîne un décalage du cadre de lecture lors de la traduction (Figure 2) [8]. Il semble que seule une minorité des ARN messagers (ARNm) (20 %) soient édités et codent pour la GP. Les autres ARNm codent pour une petite glycoprotéine de fonction inconnue, la sGP, qui est sécrétée par les cellules infectées. La principale conséquence du phénomène d'édition est de limiter la quantité de GP produite par les cellules infectées qui produisent le virus ; cette protéine étant connue pour sa forte cytotoxicité, l'édition pourrait ainsi favoriser la production de virus, en réduisant sa toxicité pour les cellules infectées [9]. Une autre propriété de la GP en fait une cible privilégiée dans la recherche d'un traitement contre le virus Ebola. Elle est en effet responsable du tropisme cellulaire et de la fusion des membranes virale et cytoplasmique lors de l'entrée du virus dans la cellule : inhiber cette étape devrait permettre de limiter la propagation du virus au sein des organismes infectés. Cependant, les détails du mécanisme de fusion sont longtemps restés inconnus. En raison de similarités de structure et de séquence, la GP a été rattachée à la famille des glycoprotéines virales de fusion de type I, une famille comprenant également les protéines de fusion des orthomyxovirus (virus de la grippe, par exemple) et des rétrovirus (virus de l'immunodéficience humaine, VIH, par exemple) [10, 11]. Ces protéines possèdent, à l'état inactif, un peptide hydrophobe, le peptide fusion, caché au cœur de leur structure ; ce peptide fusion se retrouve exposé à la faveur d'un changement conformationnel, et peut alors s'insérer dans la membrane cible et déclencher le mécanisme de fusion membranaire [10, 11] : cet événement, postérieur à la liaison au(x) récepteur(s), a lieu lors d'un processus d'activation. Tout comme la glycoprotéine HA du virus de la grippe, l'activité de fusion de la GP du virus Ebola nécessite un pH acide, une propriété caractéristique des protéines réalisant la fusion dans les endosomes [10-13] ; la diminution du pH est d'ailleurs le déclencheur du changement conformationnel activant la protéine HA. La glycoprotéine du VIH est, quant à elle, activée par sa liaison à un corécepteur [10, 11]. En ce qui concerne la GP du virus Ebola, il n'a pu être démontré que de tels mécanismes soient suffisants pour provoquer son activation.

Sans exclure un effet direct du pH sur la conformation de la sous-unité GP2, qui contient le peptide fusion, Chandran et ses collaborateurs viennent de montrer que l'acidité des endosomes est également indispensable au fonctionnement de protéines cellulaires nécessaires à l'activation de la GP. En travaillant sur une souche

recombinante (VSV-EboGP) du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), dont la glycoprotéine a été remplacée par celle du virus Ebola, espèce Zaïre [6, 14], ils ont découvert que l'utilisation de quantités croissantes d'inhibiteurs des cathepsines B et L (CatB et L), protéases endosomiques actives uniquement à pH acide, diminuait spécifiquement l'infectiosité des pseudovirus VSV-EboGP [5]. Ils ont ensuite confirmé le rôle de ces protéases dans l'entrée du virus Ebola en montrant que les particules VSV-EboGP sont incapables d'infecter des cellules de souris transgéniques dépourvues de ces deux protéines ; l'infection de ces cellules peut être restaurée partiellement en exprimant CatB, et complètement en exprimant à la fois CatB et L. Les auteurs ont ensuite traité des particules VSV-EboGP avec les protéases CatL et B purifiées : les particules traitées par CatL sont capables d'infecter des cellules dépourvues d'activité CatL, mais nécessitent l'activité de CatB, qui agirait donc en aval. Leurs résultats montrent que la sous-unité GP1 serait clivée par CatL et/ou CatB en un premier fragment, ensuite dégradé par CatB. Le mécanisme d'activation de la GP du virus Ebola par ces clivages protéolytiques serait donc tout à fait original pour une protéine de type I (Figure 3) : même si le mécanisme exact reste encore à préciser, il semble que ces deux protéases coopèrent pour dévoiler le peptide fusion et permettre le déclenchement de l'entrée du virus dans les cellules.

Les stratégies antivirales classiques s'étant révélées inefficaces, différentes approches thérapeutiques novatrices sont à l'étude (pour revue, voir [15]). La découverte du rôle des cathepsines lors de l'entrée du virus Ebola dans les cellules ouvre une nouvelle perspective : l'utilisation d'inhibiteurs de ces protéases, qui ont déjà été employés *in vivo* chez la souris à d'autres fins. Chandran et collaborateurs ont d'ailleurs montré que la propagation du virus en culture cellulaire était significativement réduite en présence de tels inhibiteurs [5]. Cependant, ces molécules étant connues pour leur capacité à altérer la réponse immunitaire, on peut se demander si leur action antivirale sera réellement efficace chez des personnes aux défenses immunitaires déjà affaiblies par le virus (→) [16, 17].

Vers la mise au point d'un vaccin contre les virus Ebola et Marburg

Si les progrès de la recherche ont déjà permis la réalisation de tests diagnostiques de plus en plus précis et rapides [18], un vaccin n'est, en revanche, toujours pas disponible. De nombreuses stratégies vaccinales ont été testées avec succès chez les petits rongeurs depuis les années 80, mais ces résultats

(→) m/s
1999, n° 10,
p. 1168

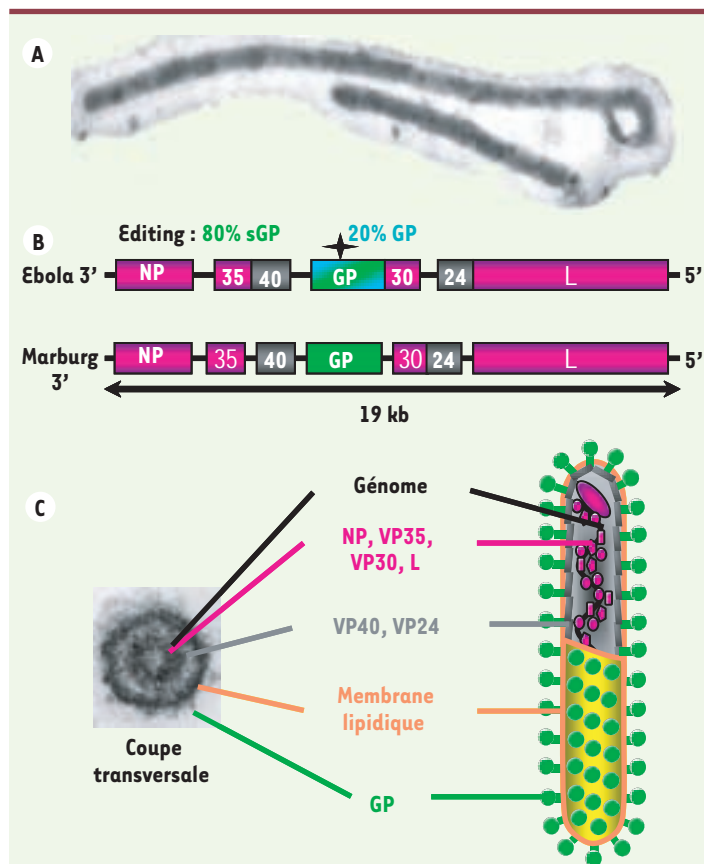


Figure 2. Organisation des virions et du génome des filovirus. Les filovirus (Ebola et Marburg) sont des virus enveloppés de l'ordre des *Mononegavirales*. **A.** Microscopie électronique d'une particule virale. Les filovirus doivent leur nom à l'aspect filiforme des virions, qui peuvent mesurer plus d'un micromètre de longueur pour 80 nanomètres de diamètre. **B.** Le génome des filovirus est un ARN simple brin non segmenté, de polarité négative, qui code pour sept protéines structurales. Le virus Ebola produit deux protéines à partir du gène de la GP : la glycoprotéine de surface GP, et la petite glycoprotéine non structurale sécrétée, la sGP. Les protéines de nucléocapside (la nucléoprotéine NP, les protéines virales de 35 kDa et 30 kDa (VP35, VP30) et la polymérase virale L) transcrivent et répliquent l'ARN génomique. La protéine VP40, qui joue un rôle essentiel dans le bourgeonnement viral, et la protéine VP24 sont des protéines de matrice. **C.** Agencement des protéines dans une particule virale Ebola. Les protéines de nucléocapside entourent l'ARN viral pour former une ribonucléoparticule. Les protéines de matrice sont associées à la membrane. La GP est la seule protéine transmembranaire présente à la surface des virions : elle déclenche la fusion des membranes virale et cellulaire, qui permet l'entrée du virion dans la cellule. Ces différentes protéines sont localisées sur une coupe transversale de virion observée au microscope électronique à transmission.

prometteurs n'ont, dans la plupart des cas, pas été confirmés chez les singes (Tableau I). Il est donc maintenant admis que les rongeurs, qui développent d'ailleurs des symptômes assez différents des primates, ne constituent pas de bons modèles pour tester l'efficacité de vaccins contre ces virus.

Une première approche de vaccin en dose unique à base d'adénovirus recombinant avait déjà permis de vacciner des primates contre le virus Ebola (Tableau I) [28-30] (→). L'utilité d'un tel vaccin a cependant été remise en question : de nombreuses personnes ont déjà été en contact avec des adénovirus et présentent donc une immunité préexistante contre le vecteur, ce qui limiterait probablement l'efficacité du vaccin [4]. Cela a d'ailleurs été récemment démontré chez la souris [29]. Ce type de stratégie vaccinale présente cependant l'avantage de stimuler l'apparition d'une réponse immunitaire non seulement humorale (à base d'anticorps qui neutralisent le virus circulant), mais aussi cellulaire (impliquant les cellules T cytotoxiques qui détruisent les cellules infectées). Avec ce type de vecteur, en effet, l'antigène viral est produit par les cellules de l'individu vacciné, et donc présenté au système immunitaire d'une façon stimulant la réponse à médiation cellulaire. L'analyse de la réponse immunitaire de patients lors d'épidémies à virus Ebola

(→) m/s
2003, n° 19,
p. 1183

avait justement permis de montrer une corrélation entre leur survie et l'apparition précoce d'anticorps et de lymphocytes T cytotoxiques (→)[16, 17].

Des vecteurs VSV, dont la glycoprotéine a été remplacée par celle du virus Ebola Zaïre ou du virus Marburg, ont récemment été testés avec succès comme vaccins chez les primates [4, 6]. Contrairement aux adénovirus, la prévalence de l'immunité anti-VSV est négligeable chez l'homme.

Le vecteur VSV, déjà très utilisé en recherche fondamentale [5], est également employé à des fins vaccinales chez l'animal, et considéré comme un outil prometteur pour le développement de nouveaux vaccins pour l'homme. De nombreux essais vaccinaux utilisant le VSV ont d'ailleurs été réalisés chez l'animal, par exemple contre le VIH et le virus de l'hépatite C [31] ou encore celui de Lassa [32]. Les résultats obtenus sont encourageants : le vaccin ne semble pas provoquer d'effets secondaires chez les primates, ni déclencher d'immunité contre les protéines du vecteur après vaccination [6]. Il reste toutefois à valider l'innocuité d'un tel vaccin chez l'homme : l'effort de recherche

(→) m/s
1999, n° 10,
p. 1168

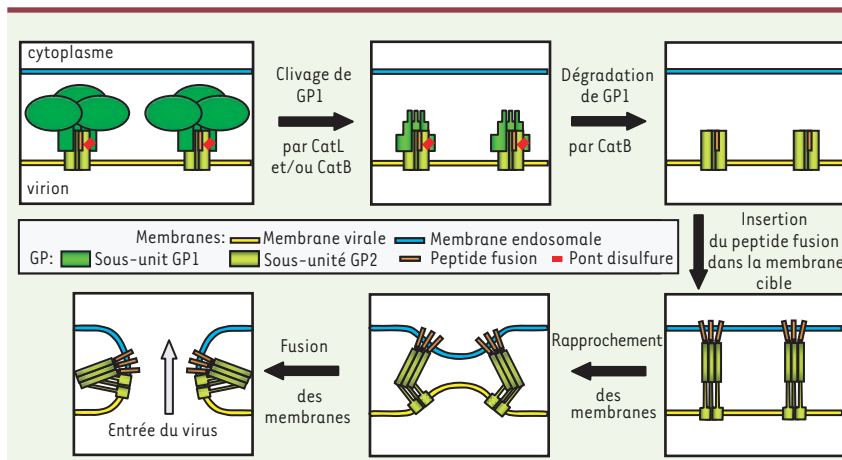


Figure 3. Modèle de fusion membranaire médiée par la glycoprotéine GP du virus Ebola. La GP est produite dans les cellules infectées sous forme d'un précurseur, qui est ensuite clivé par la protéase furine en deux sous-unités, GP1 et GP2 [7]. Ces deux sous-unités sont reliées par des ponts disulfures et s'assemblent pour former des trimères. La GP, protéine exprimée à la surface des particules virales Ebola, est responsable de la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire, qui permet l'entrée du virus dans la cellule. Elle est rattachée à la famille des glycoprotéines de fusion de type I en raison de similarités de séquence et de structure. Ces protéines, après la liaison à leur(s) récepteur(s), subissent un changement conformationnel activateur qui peut être induit par une baisse de pH ou par leur liaison à un corécepteur. Chandran *et al.* viennent de démontrer que l'activation de la GP serait quant à elle provoquée par des clivages de la sous-unité GP1 opérés par les cathepsines L et B (CatL et B), des protéases endosomales actives uniquement à pH acide. Par analogie avec d'autres glycoprotéines de fusion de type I, le pH acide des endosomes pourrait aussi jouer un rôle direct dans le changement conformationnel de la sous-unité GP2 qui insère le peptide fusion dans la membrane cible. La suite du modèle proposé est dérivé de celui décrit pour les autres glycoprotéines de cette famille (pour revue, voir [10, 11]).

nécessaire sera important, mais porté par l'espoir de pouvoir vacciner les gens contre de nombreux virus connus, et de développer plus rapidement des vaccins en cas d'émergence de nouveaux virus.

Concernant les filovirus, après des résultats préliminaires intéressants obtenus chez les rongeurs [14], Jones et ses collaborateurs ont entrepris la vaccination de six macaques avec une dose de vaccin Ebola Zaïre et de six autres avec une dose de vaccin Marburg [6]. Quatre semaines plus tard, quatre animaux du groupe Ebola ont été infectés par une dose létale de virus Ebola Zaïre et ont survécu, tandis que les deux autres animaux, infectés par une dose létale de virus Marburg, sont rapidement décédés. De la même façon, les quatre animaux vaccinés contre Marburg infectés par ce même virus ont survécu, tandis que les deux infectés par Ebola Zaïre sont morts. Les auteurs ont confirmé que la protection contre le virus Ebola était corrélée au développement précoce d'une forte réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire. En revanche, la protection contre le virus Marburg était essentiellement accompagnée par la production de grandes quantités d'anticorps non neutralisants, un résultat cohérent avec des données obtenues précédemment pour ce virus [21]. Neuf mois plus tard, les singes vaccinés contre le virus Marburg étaient



toujours protégés, même contre une souche très proche de celle dont était issue la GP du vaccin ; ces singes avaient cependant déjà subi une épreuve avec le virus Marburg, ce qui a certainement renforcé leurs défenses immunitaires, à la manière d'un rappel vaccinal. En revanche, le vaccin Ebola espèce Zaïre n'a pas protégé les singes contre une dose létale de virus Ebola espèce Soudan, dont la GP diffère de 50 %, en termes d'acides aminés, de celle utilisée pour le vaccin [6].

Les vaccins VSV semblent prometteurs car ils ont protégé des singes du virus Ebola ou du virus Marburg en une seule injection. Ils sont cependant très spécifiques : l'absence de protection croisée entre les virus Ebola et Marburg ou entre les différentes espèces de virus Ebola ne permettra pas la réalisation de campagnes de vaccination préventive à grande échelle chez l'homme ou les grands singes. En revanche, ces vaccins pourront être utiles pour contrôler ponctuellement les épidémies, s'ils confèrent suffisamment rapidement une protection efficace.

Conclusions

Une meilleure compréhension des particularités du fonctionnement du virus Ebola, en particulier de sa glycoprotéine, ouvre la voie à un nouveau type d'approche thérapeutique, et des résultats prometteurs en termes de vaccin viennent d'être obtenus. Cependant, il est certain que ces résultats ne seront pas applicables à l'homme avant plusieurs années. En attendant, il faudra continuer à renforcer les réseaux d'alerte et de prévention en Afrique. En plus de leur mission strictement médicale lors des épidémies, les équipes d'in-

tervention devront continuer à prendre autant que possible en compte les appréhensions des populations locales. C'est grâce à des mesures mieux adaptées que les dernières épidémies à virus Ebola au Congo et au Soudan ont fait relativement peu de victimes (<http://www.who.int>). ♦

SUMMARY

Ebola and Marburg viruses: the humans strike back

Ebola and Marburg viruses are the causative agents of rapidly progressive hemorrhagic fevers with high mortality rates. Pre- or post-exposure treatments against the diseases are currently not available for human use. In the field, establishment of strict quarantine measures preventing further virus transmission are still the only way to fight the infections. However, our knowledge of Ebola and Marburg viruses has markedly increased as a result of two recent discoveries discussed in this review. Chandran et al. have elucidated the mechanism by which Ebola GP is converted to a fusion-active form. Infectivity of Ebola virus was shown to be dependent on the cleavage of GP by cellular endosomal proteases, cathepsin B and L, thus opening new therapeutic approaches options. As for Jones SM et al., they have successfully vaccinated monkeys with recombinant vesicular stoma-

Stratégie vaccinale	Protection		
	Souris	Cobaye	Primate
Virus inactivé	Non décrit	Oui [19] (1980)	Non [20] (2002)
Particules de réplicon VEEV exprimant la GP et/ou la NP de Marburg ou d'Ebola	Oui [21] (1998)	Oui [21] (1998)	Oui (Marburg) [21] (1998) Non (Ebola) [20] (2002)
Virus de la vaccine recombinant exprimant la GP et la NP d'Ebola	Oui [22] (1997)	Oui [22] (1997)	Non [20] (2002)
Pseudoparticules produites en coexprimant les protéines VP40 et GP d'Ebola et de Marburg	Oui [23] (2003)	Oui [24, 25] (2004, 2005)	Non décrit
Plasmide codant pour la GP et/ou la NP d'Ebola	Oui [26] (1998)	Oui [27] (1998)	Oui, mais rappel adénoviral [28] (2000)
Adénovirus exprimant la GP et/ou la NP d'Ebola	Oui [29] (2006)	Oui [29] (2006)	Oui [30] (2003)
VSV recombinant exprimant la GP d'Ebola	Oui [14] (2005)	Oui - Données non publiées [6] (2005)	Oui [6] (2005)

Tableau 1. Principaux essais de vaccination contre les filovirus chez l'animal. Ces résultats indiquent clairement que les rongeurs ne sont pas un bon modèle pour anticiper l'efficacité d'un vaccin chez les primates, plus proches de l'homme. Le modèle primate est donc maintenant utilisé en priorité, malgré son coût et les difficultés posées par son utilisation. Un premier vaccin à dose unique efficace chez le primate a été mis au point en 2003 [30]. Un nouveau vaccin utilisant un vecteur dérivé du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) vient d'être testé avec succès chez le singe [6]. Ce dernier résultat est particulièrement intéressant, puisque l'utilisation du VSV chez l'homme comme plate-forme privilégiée pour le développement de vaccins contre les maladies émergentes est fortement envisagée. VEEV : virus de l'encéphalite équine du Venezuela ; GP : glycoprotéine ; NP : nucléoprotéine.

