Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

Toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
École Doctorale BioSE

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy1

en Biologie Moléculaire

par **Tatiana WITTMANN**

Analyse phylogénétique des souches du virus de la fièvre hémorragique Ebola et mise en évidence de souches atypiques

Soutenance publique le 18 décembre 2007

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Xavier de LAMBALLERIE	Professeur, Université de Marseille
	M. Hervé BOURHY	Directeur de recherches Institut Pasteur, Paris
Examinateurs :	M. Sylvain BAIZE	Chargé de recherches, Institut Pasteur, Lyon
	Mme Christiane BRANLANT	Directeur de recherches CNRS, Nancy I
	M. Éric LEROY	Directeur de recherches IRD, Gabon
		Directeur de thèse

À Michel & Fernande JOFFRE, mes grands-parents,

À Jacky & Patricia WITTMANN, mes parents,

À Khalid KETOINE

Qui m'ont forgée et ont fait de moi la personne que je suis.

Remerciements

Je remercie le Centre International de Recherches Médicales de Franceville, par l'intermédiaire de son Directeur Général, le **Professeur Philippe Blot**, d'avoir bien voulu prendre en charge ces travaux de thèse.

J'adresse également mes remerciements au **Docteur Christiane Branlant** qui m'a fait l'honneur de m'accepter au nombre de ses thésards. Je remercie le **Docteur Éric Leroy** pour l'honneur qu'il m'a fait en dirigeant cette thèse, pour son dynamisme et sa patience, son amabilité et sa recherche constante de la perfection.

Merci aux **Docteurs Xavier de Lamballerie et Hervé Bourhy** pour l'honneur qu'ils m'ont témoigné en acceptant d'en être les rapporteurs. Merci au **Docteur Sylvain Baize** pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Cette thèse n'aurait pas lieu d'être sans le **Docteur Maria Makuwa**, qui a accompagné mes premiers pas en virologie et à qui je suis infiniment reconnaissante de m'avoir lancé dans cette aventure.

Un grand merci également au **Docteur Jean-Bernard Lekana-Douki**, qui a pris le temps de relire mes fautes de conjugaison. Ses questions et recherches d'explications ont permis d'améliorer un peu plus la version finale.

Je n'oublie pas non plus les membres de l'**Unité des Maladies Virales Émergentes**, et en particulier André Délicat et Philippe Yaba pour leur bonne humeur et leurs compétences techniques, le Docteur Brice Kumulungui et Ghislain Moussavou pour leur capacité de tout discuter et palabrer pour rien. Une pensée spéciale pour le **Docteur Loïs Allela**, ancien membre de l'équipe, qui a guidé mes premiers pas en Afrique et à Franceville, m'a permis d'exercer ma patience et qui continue à l'éprouver régulièrement.

Je ne peux pas non plus laisser de côté les collègues du **service de rétrovirologie**, entre autres : Sandrine Souquière, Augustin Mouinga Ondémé pour ses éditoriaux du matin, le « bidoc » ya Richard Onanga pour ses discussions et ses conseils avisés, Armel Mintsa Ndong pour ses conseils à ne pas suivre, ya Guy-Roger Ndong Atome, et mon voisin le Docteur Ulrich Bisvigou. J'adresse un merci particulier à Chimène Nze Nkoghe et Sonia Lekana-Douki, membres d'honneur du Club Gastronomique, sans qui les pauses du vendredi 10h n'auraient pas eu le même goût.

J'adresse également mes remerciements aux **travailleurs du CIRMF**, Maman Albertine Nkouyi ; Véronique Ndjougou, documentaliste ; Marguerite Adimina et

Nicole Mvou, réceptionnistes ; les techniciens et techniciennes, ménagères, secrétaires, maintenanciers, chauffeurs, … tous ces travailleurs, trop nombreux pour être cités nommément, qui font vivre le CIRMF et lui apportent leurs joie et bonne humeur.

J'aimerais adresser un merci particulier à **mes grand-frères du Shotokan-Karaté-Municipal de Franceville**, la DreamTeam représentée par Esmentho Otounga Botomo, Christian Chukwuegbo et Wargha Dounda Bamzouzi, qui ont si bien su me supporter et m'épauler quand j'en avais besoin, qui ont accompli le miracle de me faire courir, ainsi que pour leurs empis au chantier et leur plus grande dévotion dans leur rôle de punching-ball !!!

Je n'ai pas de mots pour exprimer la gratitude que j'ai envers notre instructeur, **M. Dominique Mikomba-Liyinda**, ceinture noire 3^{è} dan et Président de la ligue du Haut-Ogooué de Karaté-Do. Il a dépensé sans compter son temps et son énergie à tenter de nous ouvrir les yeux et l'esprit afin de nous faire prendre conscience de ce que sont l'Art et la Voie du Karaté. Son enseignement a été inestimable et j'espère, à force de travail, pouvoir un jour me dire son élève.

Je remercie **ma famille** : mes grands-parents, mes parents et ma sœur Floriane (la seule, l'unique, l'incomparable, qui a été d'une efficacité et d'une aide remarquables dans le dépôt de mon dossier), grandes-tantes, tantes et oncles, cousines et cousins, qui ont été présents malgré les plus de 6 000 km nous séparant. Leurs lettres et mails remplis de diaporamas insolites et d'images marrantes m'ont donné l'impression d'être juste à côté d'eux.

Je remercie également Tantine Marie Christine Mba Ndong qui s'est occupée de moi comme une mère lors de mes séjours à Libreville, Céline Vebert et Fatma Aït-Mesbah, les familles Tounkara, Wague et Doucouré pour leur disponibilité, leur joie de vivre et leur sérénité.

Enfin, merci à toi Khalid pour m'avoir soutenue et poussée dans la dernière ligne droite, m'avoir changé les idées lors de mes retours toujours trop courts et supporté ces longues années de séparation.

Résumé

La fièvre hémorragique à virus Ebola (FHVE) est due à un virus à ARN non segmenté de polarité négative de l'ordre des Mononégavirales. Il compose avec le virus de Marburg la famille des Filoviridae. Il existe 4 espèces Ebolavirus réparties géographiquement : *Zaïre* en Afrique centrale, *Soudan* en Afrique de l'Est, *Côte d'Ivoire* en Afrique de l'Ouest et *Reston* en Asie.

Ebolavirus zaïre, apparu en 1976 en République Démocratique du Congo, est l'espèce la plus létale pour l'homme (jusqu'à 88% de mortalité) et a été à l'origine de plusieurs vagues d'épidémies depuis sa ré-émergence en 1995. Les flambées épidémiques de 2001 à 2005 sont caractérisées par de multiples chaînes épidémiques indépendantes et des épizooties concomitantes dans les populations de grands singes (gorilles et chimpanzés).

L'amplification et le séquençage du gène viral de la glycoprotéine (GP) ont été effectués à partir de prélèvements obtenus lors des deux dernières épidémies humaines de 2003 et 2005, ainsi que sur des échantillons de carcasses animales trouvées à partir de 2001 dans la forêt de la région Gabon-Congo.

Un deuxième gène viral codant la nucléoprotéine (NP) a été amplifié et séquencé à partir de prélèvements obtenus pendant les épidémies humaines survenues depuis 2001 et de prélèvements animaux.

L'analyse phylogénétique basée sur le gène codant la GP montre la séparation des souches virales en deux lignées génétiques fortement soutenues. Cette séparation est confirmée par l'existence de signatures moléculaires spécifiques aux séquences de chaque lignée, ainsi que par le calcul des distances génétiques entre les séquences. Les analyses effectuées sur le gène de la NP donnent les mêmes résultats. Cependant, la topologie des souches humaines obtenues entre 2001 et 2003 diffère entre les arbres basés sur la GP et la NP.

Les résultats indiquent l'existence de deux lignées phylogénétiques et supposent un événement de recombinaison entre les souches des deux lignées.

L'estimation de l'âge des ancêtres communs les plus récents indique que la séparation des deux lignées se serait produite avant la première apparition de la FHVE, vers 1975 (1971 calculé sur la NP). L'événement de recombinaison est daté par cette méthode entre 1998-1999.

Abstract

The virus Ebola, a negative non segmented RNA virus, is responsible for an hemorrhagic fever disease. Together with the Marburg virus, they compose the *Filoviridae* family (order *Mononegavirales*). Ebolavirus is geographically divided into 4 species: *Zaire* in Central Africa, *Sudan* in East Africa, *Ivory Coast* in West Africa, and *Reston* in Asia.

Zaire ebolavirus, first appeared in 1976 in the Democratic Republic of Congo, has the highest mortality rate in humans (up to 88%) and has caused several outbreaks since its re-emergence in 1995. Outbreaks from 2001 to 2005 are characterized by multiple independent epidemic chains and large concomitant outbreaks in chimpanzee and gorillas.

The viral glycoprotein (GP) gene was amplified and sequenced from samples obtained during the two last human outbreaks in 2003 and 2005 and samples from great apes carcasses found in the forest of the Gabon-Congo area since 2001.

A second viral gene coding the nucleoprotein (NP) was amplified and sequenced from animal samples and human outbreaks since 2001.

Phylogenetic analysis based on the GP gene showed the separation of *Zaire ebolavirus* strains into two genetic lineages. This separation is supported by molecular signatures specific to sequences of each lineage, and by genetic distances between sequences. Analysis based on the NP genes give the same results. However, the topology of human strains recovered between 2001 and 2003 is different in both trees.

Results show the existence of two phylogenetic lineages and suggest a recombination event between strains of these lineages.

The estimation of the age of the most recent common ancestor tracks back the separation of the lineages before the first appearance of *Ebolavirus*, up to 1975 (1971 estimated on the NP gene). With this method, the recombination event is dated to 1998-1999.

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Abstract 6
Table des matières 7
Abréviations 11
Avant-propos 13
INTRODUCTION 15
I. Historique 16
I.1. Épizooties dues aux souches asiatiques (Reston) 16
I.2. Épidémies dues aux souches africaines 18
a. Côte d'Ivoire 18
b. Soudan 19
c. Zaïre 20
II. Épidémiologie, cycle du virus 24
II.1.Dimensions spatio-temporelles et médicales (santé publique) 24
a. Aire d'endémicité 24
b. Mortalité et Fréquence 26
c. Impact s'il n'y a pas de contrôle 27
d. Importance du virus aux niveaux culturel, social et économique 28
II.2. Transmission du virus chez l'Homme 30
a. Importance du contact lors des soins, des rites funéraires et de la médecine traditionnelle. 30
b. Infection nosocomiale 33
c. Infection par voie respiratoire 34
d. Autres modes de contamination 36
III.3. Cycle naturel du virus Ebola 37
a. Transmission aux espèces sensibles : Hommes et Primates 37
b. Recherche de l'espèce réservoir 38
III. Les épidémies 44
III.1. Caractéristiques cliniques chez l'homme 44
III.2. Méthodes de diagnostic 46

a. L'examen direct du virus 47
b. Isolement viral 50
c. Détection de la présence virale 53
d. Diagnostic sérologique 55
e. Méthodes diverses 56
III.3. Contrôle, prévention et traitement 57
a. Prévention : mesures sanitaires, vaccin 57
b. Traitement 63
IV. Les mécanismes physiopathologiques 67
IV.1. Physiopathogénèse 67
a. Modèle animal 67
b. Paramètres biochimiques et hématologiques 68
IV.2. Immunologie 70
a. Immunité cellulaire 70
b. Cytokines 72
c. Immunité humorale 76
d. Cas asymptomatiques humains 77
V. Agent pathogène : le virus Ebola 78
V.1. Taxonomie des fièvres hémorragiques tropicales 78
a. Les Arenaviridae 78
b. Les Bunyaviridae 79
c. Les Flaviviridae 80
d. Les Filoviridae 82
V.2. Morphologie et structure 84
a. Morphologie 84
b. Structure 84
c. Inactivation physico-chimique 85
V.3. Organisation du génome 86
V.4. Cycle de réplication 87
a. Entrée dans la cellule 88
b. Transcription et réplication 90
c. Sortie de la cellule 91
V.5. Protéines et leurs fonctions 94
a. Nucléoprotéine 94

b. Protéine virale de 35 kDa (VP35) 95
c. Protéine virale de 40 kDa 96
d. Protéine virale de 30 kDa 98
e. Protéine virale de 24 kDa 98
f. RNA Polymérase 99
g. Glycoprotéines 99
VI. Phylogénie moléculaire des souches virales 108
Problématique 111
MATÉRIEL et MÉTHODES 112
I. Laboratoire P4 113
II. Matériel biologique 114
II.1. Chaîne des évènements : du prélèvement au labo 114
II.2. Prélèvements d'origine humaine 115
II.3. Prélèvements animaux 116
III. Méthodes de diagnostic 119
III.1. Sérologie 119
a. Dosage des antigènes circulants 119
b. Dosage des Immunoglobulines G 120
c. Détection d'antigènes par immunofiltration 121
III.2. Amplification d'un fragment ARN 122
a. Extraction de l'ARN 122
b. Transcription inverse 124
c. Amplification des gènes 124
d. Électrophorèse sur gel d'agarose 127
e. Purification du produit de PCR sur gel 128
III.3. Isolement viral 129
a. Culture de cellules Vero E6 129
b. Infection des cellules par le virus Ebola 130
IV. Caractérisation des souches par PCR 130
IV.1. PCR des gènes GP, NP et L 130
IV.2. Séquençage et analyses phylogénétiques 131
RÉSULTATS 132
I. Réponse internationale à l'épidémie de Mbandza 133
II. Diagnostic 134

II.1. Diagnostic par immunofiltration 134
II.2. Diagnostic par ELISA 135
II.3. Diagnostic par RT-PCR 137
II.4. Infection des cellules Vero 138
II.5. Mise en évidence de souches atypiques 139
III. Séquençage de gènes de protéines virales 139
III.1. Séquences du gène codant la glycoprotéine 139
a. Comparaison des souches d'origine humaine et animale 140
b. Cas des gorilles de Lossi 150
III.2. Séquences du gène codant la nucléoprotéine 154
IV. Analyses phylogénétiques 160
V. Etude de la variabilité 163
VI. Datation de la séparation des groupes 164
DISCUSSION 166
I. Mise au point d'un outil diagnostic 167
II. Caractérisation de nouvelles souches virales 169
III. Les souches de ZEBOV sont divisées en deux lignées génétiques 170
III.1. Évolution des virus à ARN responsables de fièvres hémorragiques 171
III.2. Plusieurs lignées suggérées par les données épidémiologiques sans pouvoir être démontrées 172
III.3. Composition de la lignée B 173
III.4. Pourquoi la lignée B n'est-elle détectée qu'après 2001 ? 174
IV. Évènement de recombinaison entre les lignées 176
V. Multi-émergence ou propagation ? 179
V. Perspectives 182
ANNEXE 185
PUBLICATIONS 195
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 236

Abréviations

ARNnns	ARN négatif non-segmenté
CIEBOV	*Ebolavirus côte d'ivoire*
EBOV	*Ebolavirus*
FHV	Fièvre Hémorragique Virale
FHVE	Fièvre Hémorragique à Virus Ebola
GP	Glycoprotéine membranaire
ICAM	Inter Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
MARV	Marburg virus
MCP	Macrophage Chemoattractant Protein
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	millilitre
NP	Nucléoprotéine
nt	Nucléotide
PBMC	Peripheric Blood Monocytic Cells, cellules monocytiques du sang périphérique
RANTES	Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
RDC	République Démocratique du Congo
RC	République du Congo
RCA	République de Centre Afrique
REBOV	*Ebolavirus reston*
SEBOV	*Ebolavirus soudan*
TNF	Tumor Necrosis Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP	Protéine Virale (Viral Protein)

ZEBOV	*Ebolavirus zaïre*

Symboles des aminoacides

A	Ala	Alanine	M	Met	Méthionine
C	Cys	Cystéine	N	Asn	Asparagine
D	Asp	Aspartate	P	Pro	Proline
E	Glu	Glutamate	Q	Gln	Glutamine
F	Phe	Phénylalanine	R	Arg	Arginine
G	Gly	Glycine	S	Ser	Sérine
H	His	Histidine	T	Thr	Thréonine
I	Ile	Isoleucine	V	Val	Valine
K	Lys	Lysine	W	Trp	Tryptophane
L	Leu	Leucine	Y	Tyr	Tyrosine



Avant-propos

Le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) a été créé en 1974 à l'instigation de son excellence El Hadj Omar Bongo Ondimba, président de la République Gabonaise, et du président d'Elf Aquitaine de l'époque, Monsieur Pierre Guillaumat. Inauguré le 5 décembre 1979, son financement est assuré conjointement par Total-Elf, l'État gabonais et la Coopération française. Initialement orienté sur les pathologies parasitaires et notamment leurs conséquences sur la fécondité humaine, les thématiques de recherche se sont au cours des années élargies aux études fondamentales et épidémiologiques concernant les problématiques majeures d'Afrique Centrale, notamment le paludisme (neuropaludisme), les rétrovirus (VIH, SIV) et les fièvres hémorragiques virales (Ebola). Le CIRMF est divisé en trois sections : la division de recherche basée sur le SIDA, le paludisme, l'étude des écosystèmes tropicaux, et les maladies virales émergentes ; la division de santé publique représentée par le laboratoire d'analyses médicales au service de la population ; et la divison de primatologie regroupant près de 400 primates pour la plupart originaires du Gabon (chimpanzés, gorilles , mandrills, cercopithèques à queue de soleil, mangabeys à collier blanc, hocheurs) maintenus captifs en cage individuelle, dans de grandes « volières » ou encore dans des enclos de semi-liberté de plusieurs hectares.

Sa localisation au sud-est du Gabon, à une centaine de kilomètres de la frontière avec la République du Congo, et sa proximité de la zone d'endémie est un atout que le CIRMF a su utiliser dans la lutte contre la fièvre hémorragique à virus Ebola. Dès la ré-émergence du virus Ebola et les trois épidémies successives qui touchèrent le Gabon en 1995-96, le CIRMF a évolué en collaboration avec le Ministère gabonais de la santé publique et les

représentants de l'OMS. Grâce à la Coopération française, le CIRMF possède une bulle hermétique en pression négative permettant la manipulation du virus Ebola pour diagnostiquer les cas suspects, isoler le virus et effectuer les travaux de recherche dans des conditions de biosécurité maximales.

Depuis 2000, le CIRMF a reçu l'homologation « centre collaborateur de l'OMS de référence et de recherche pour les fièvres hémorragiques virales africaines ». C'est la deuxième infrastructure P4 du continent africain, avec le laboratoire qui existe déjà en Afrique du Sud.

INTRODUCTION

I. Historique

Depuis la première apparition de la fièvre hémorragique à virus Ebola (FHVE), de nombreuses épidémies ont touché l'Afrique et l'Asie. Ces épidémies, causées par les 4 espèces du virus, sont sporadiques et réparties géographiquement selon l'espèce virale. Ainsi, des pays d'Afrique Centrale, de l'Ouest et de l'Est ont été touchés par 3 espèces virales (Zaïre, Soudan et Côte d'Ivoire) ; et les États-Unis d'Amérique et les Philippines ont été touchés par la quatrième espèce (*Reston*).

I.1. Épizooties dues aux souches asiatiques (Reston)

Les premières épizooties dues aux souches asiatiques du virus Ebola éclatèrent entre 1989 et 1990 dans des colonies de macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) mis en quarantaine dans 3 laboratoires américains : à Reston en Virginie, à Austin au Texas et à Philadelphie en Pennsylvanie. Les singes importés provenaient tous du même centre d'exportation situé à Manille, aux Philippines [1] (figure 1). Les mesures sanitaires ayant consisté à euthanasier les animaux lorsque l'infection par EBOV fut confirmée, les données épidémiologiques disponibles sont peu nombreuses et difficilement exploitables. Au même moment, une épizootie dans le centre d'exportation de Manille causa 383 décès sur un total de 1 404 animaux. Parmi les animaux décédés, 85 avaient des anticorps dirigés contre *Ebolavirus* (EBOV) [2].

La forte ressemblance de ce virus, nommé espèce *reston* (REBOV), avec les souches africaines d'EBOV, responsables d'un grand nombre de décès au Soudan et au Zaïre, conduisirent le département de la santé philippin à enquêter sur le risque de transmission des animaux à l'homme et la répercussion de ce virus sur la Santé Publique. Cette enquête montra que 22% des travailleurs au contact d'animaux infectés présentaient des anticorps dirigés contre REBOV, bien qu'aucun symptôme de fièvre hémorragique ne fut enregistré [3].

Parce que le centre d'exportation de Manille ne respecta que partiellement les mesures sanitaires prises à l'encontre de l'épidémie [4], le virus Ebola fut retrouvé chez 4 singes provenant de ce centre, à Sienne, en Italie en 1992 [5]. Afin d'éviter une flambée

épidémique, tous les singes du lot importé furent euthanasiés. Aucun contact humain ne présenta de signe clinique ou sérologique d'infection [6].

De même, en 1996 à Alice, Texas, un singe importé de Manille, aux Philippines, mourru après 3 jours de maladie. Quelques jours avant la mise en évidence d'une infection par EBOV, un autre singe détenu dans la même pièce présenta les mêmes symptômes. Lorsque l'infection par EBOV fut confirmée, les singes détenus dans cette pièce furent euthanasiés et une étude épidémiologique fut menée à partir des prélèvements de singes sacrifiés. Parmi les animaux asymptomatiques, 2 étaient infectés par EBOV, bien que leurs cages ne soient pas adjacentes à celles des animaux malades. Dans ces cas d'infection, il semblerait que le mode de transmission fut les aérosols créés lors du nettoyage des cages par des jets haute-pression [7].

Suite à ces nouvelles infections aux U.S.A., une enquête épidémiologique fut menée aux Philippines. Pendant toute la durée de l'investigation, des animaux fortement infectés furent trouvés dans un seul des 3 centres de primatologie exportateurs. Aucun des employés en contact avec les singes ne présenta de signes d'infection [8].

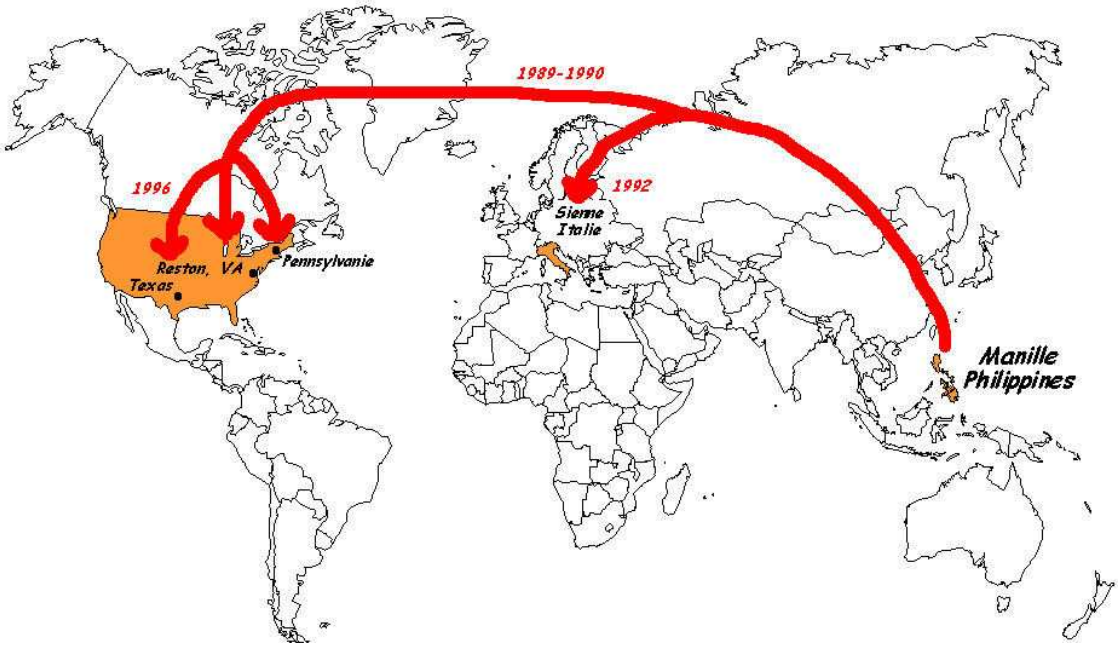


Figure 1 : Localisation des épizooties dues à REBOV dans les populations de macaques importés des Philippines à destination de laboratoires américains et italien.

I.2. Épidémies dues aux souches africaines

a. Côte d'Ivoire

En novembre 1994, une éthologue suisse tomba malade quelques jours après avoir autopsié un chimpanzé (*Pan troglodytes*) trouvé mort dans le parc national de Taï, au sud-ouest de la Côte d'Ivoire à proximité de la frontière avec le Libéria (figure 2). Après 15 jours de maladie, caractérisée entre autres par de la fièvre, des céphalées, douleurs musculaires et abdominales, diarrhées et vomissements, la patiente guéri sans séquelles [9]. Une nouvelle espèce d'*Ebolavirus*, nommée *Côte d'Ivoire* (CIEBOV), fut identifiée à partir des prélèvements du chimpanzé et de la patiente. Ce virus est apparenté sérologiquement à l'espèce *Zaïre* (ZEBOV), cependant le séquençage montra jusqu'à 40% de divergence entre les 2 espèces [10, 11].

Le groupe auquel appartenait le chimpanzé trouvé mort et autopsié était suivi depuis plusieurs années par une équipe d'éthologues. Cette équipe pu étudier l'épizootie de FHVE dans le groupe de chimpanzés, observer les comportements à risque, et déterminer un taux de mortalité d'environ 25% [12].

Cette épizootie touchant les chimpanzés et un unique cas humain non létal due à l'espèce CIEBOV est la seule observée à ce jour en Afrique de l'Ouest.

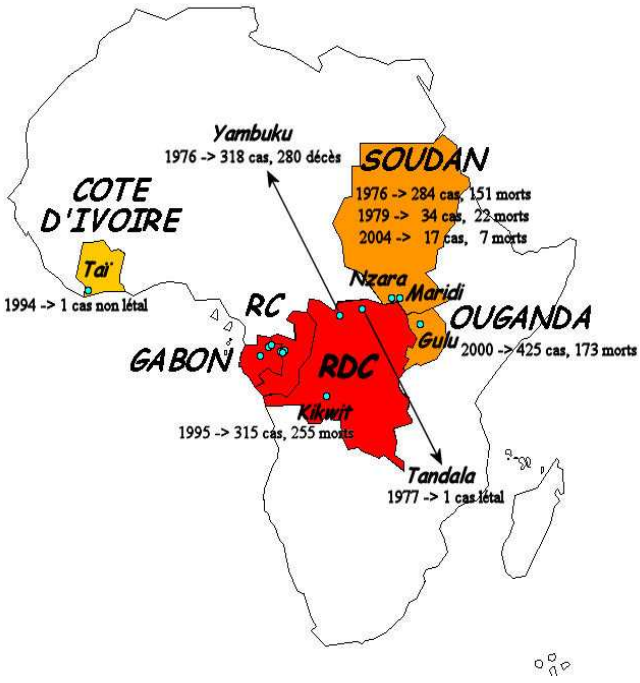


Figure 2 : Localisation des épidémies dues aux souches africaines d'*Ebolavirus*. Espèce *Côte d'Ivoire* (jaune) en 1994 dans le Parc National de Taï (1 cas, 0 décès). Espèce *Soudan* (orange) dans le Sud du Soudan (1976 : 284 cas, 151 morts ; 1979 34 cas, 22 morts ; 2004 : 17 cas, 7 morts) et le Nord de l'Ouganda (2000 : 425 cas, 173 morts). Espèce *Zaïre* (rouge), en République Démocratique du Congo (1976 : 315 cas, 280 décès ; 1977 : 1 cas, 1 mort ; 1995 : 315 cas, 255 décès), en République du Congo (RC) et au Gabon.

b. Soudan

Entre juin et novembre 1976, une maladie hémorragique inconnue toucha les villes de Nzara et Maridi au sud du Soudan, proches de la frontière avec la République Démocratique du Congo (RDC) (figure 2). Les premiers cas furent des employés d'une usine de coton de Nzara qui contaminèrent les membres de leurs familles. Un de ces patients déplaça l'épidémie à Maridi, à environ 180 km à l'est de Nzara, où il parti se faire soigner. Alors que l'épidémie semblait contenue à Nzara, l'hôpital de Maridi agit comme un amplificateur et devint la source principale d'infection. Pendant les 5 mois que dura l'épidémie, on recensa 284 cas et 151 décès (53% de mortalité). L'enquête virologique à partir de prélèvements de patients malades mit en évidence un nouveau virus, qui fut nommé *Ebolavirus soudan* (SEBOV) [13].

Fin août 1979, cette région fut de nouveau touchée par une épidémie de fièvre hémorragique. L'hospitalisation d'un employé de l'usine de coton de Nzara, l'absence de précautions sanitaires à l'hôpital ainsi que l'aide aux soins apportée par les membres des familles propagèrent l'infection. L'épidémie fut transportée à Yambio, à 25 km de Nzara, par un malade venu s'y faire soigner. Cette flambée épidémique causa 22 décès parmi les 34 cas (65% de mortalité) [14].

Après une longue période de latence, SEBOV ré-emergea entre août 2000 et janvier 2001 en Ouganda, touchant principalement la ville de Gulu et son district, dans le Nord du pays.

Dès la confirmation en laboratoire de la présence de SEBOV, une unité d'isolement a été mise en place afin d'éviter toute transmission. Cependant, cette épidémie causa le plus de victimes à ce jour, avec 425 cas présumés (dont 218 confirmés en laboratoire) et 173 décès (40,7% de mortalité). Les causes de la propagation furent :

- la présence aux obsèques de cas probables, où les contacts rituels avec le défunt sont coutumiers ;
- l'aide aux soins des nombreux membres de la famille ;
- la transmission nosocomiale due au respect seulement partiel des mesures sanitaires.

Deux flambées locales éloignées furent déclenchées par le déplacement de personnes infectées qui se sont rendues dans le district de Mbarara, au sud du pays, proche de la frontière avec la République Unie de Tanzanie, et le district de Masindi, à mi-chemin entre Gulu et Mbarara. Lorsque des mesures de dépistage, de protection et d'isolement des cas furent mises en place et appliquées, la transmission cessa, entraînant la fin de l'épidémie [15].

La dernière apparition de SEBOV eut lieu en 2004 au Soudan, dans le district de Yambio, déjà touché en 1979. Entre mai et juin 2004, 17 cas furent recensés entraînant la mort dans 41% des cas (7 décès) [16].

c. Zaïre

Quelques mois après l'apparition des premiers cas de fièvre hémorragique au Soudan, des cas de maladie identiques apparurent dans la région de Bumba, au Nord-ouest de la RDC (figure 2). La principale source de soins pour les habitants de cette région est l'hôpital de la Mission Catholique de Yambuku. Cette ville se situe à environ 100 km au nord de Bumba et est baignée par la rivière Ebola, qui donna son nom aux virus isolés lors de cette épidémie et celle voisine au Soudan. L'hôpital de la Mission Catholique joua le rôle d'un amplificateur de l'épidémie, essentiellement à cause de la réutilisation d'aiguilles et seringues non stérilisées et du manque de précautions sanitaires lors des soins. De septembre à novembre 1976, cette épidémie causa 280 décès sur les 318 cas enregistrés (soit 88% de mortalité) [17].

La même année, un technicien de laboratoire anglais se contamina accidentellement alors qu'il manipulait un échantillon biologique d'un patient décédé d'une maladie non identifiée au Kenya. Le technicien développa des symptômes caractéristiques d'une fièvre hémorragique mais il survécu et ne causa aucun cas secondaire [18].

En 1977, un cas isolé apparu à Tandala, ville du Zaïre, proche de la frontière avec le Cameroun et à environ 325 km de Yambuku. Une fillette de 9 ans décéda des suites d'une maladie dont les manifestations cliniques étaient typiques d'une FHVE. L'analyse biologique permi l'isolement de ZEBOV [19].

En 1995, après une longue période de silence, *Ebolavirus*, espèce *Zaïre* (ZEBOV), refit son apparition à Kikwit, en République Démocratique du Congo (RDC), à 475 km à l'est de la capitale Kinshasa. En avril, quelques cas de FHVE apparurent dans l'équipe d'infirmiers de la maternité de Kikwit, mais ces cas furent diagnostiqués comme une épidémie de dysenterie. La présence du virus Ebola fut suspectée et confirmée lorsque l'équipe chirurgicale qui a opéré un patient et les infirmières qui l'ont soigné développèrent les symptômes caractéristiques d'une FHVE [20]. L'enquête épidémiologique rétrospective montra que le premier cas survint au début de l'année. Cet homme se serait infecté dans son travail à la mine, ou dans sa plantation aux environs de Kikwit. Au moins 3 membres de sa famille proche et 10 personnes de sa famille étendue auraient été contaminées.

Entre janvier et juillet 1995, cette épidémie provoqua 255 décès parmi les 315 victimes (81% mortalité). Le délai dans l'identification de ZEBOV lors de cette épidémie est dû à un mauvais diagnostic [21].

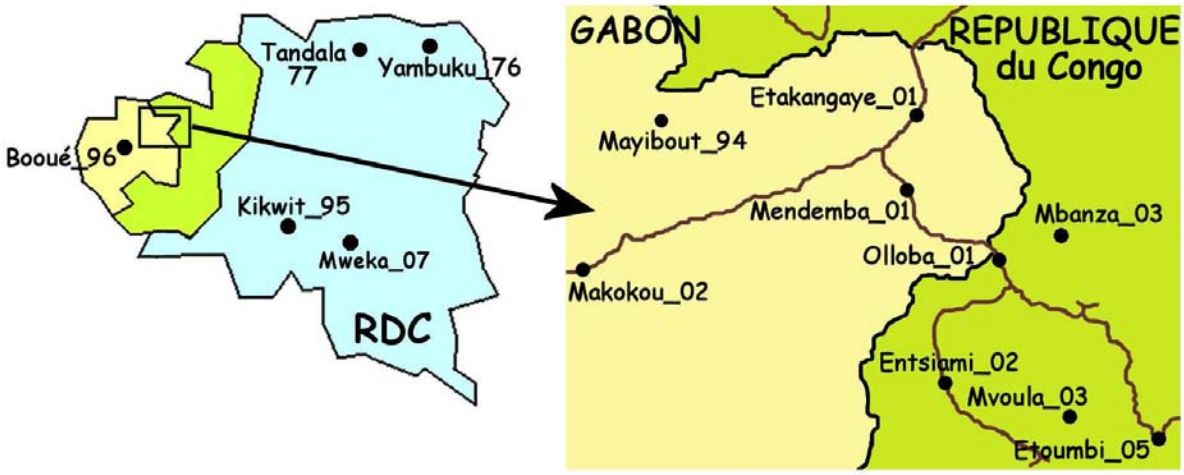


Figure 3 : Localisation des épidémies dues à *Ebolavirus*, espèce *Zaïre*, en RDC et dans la région frontalière du Gabon-Congo.

La première épidémie due à ZEBOV fut déclarée en 1994 et deux autres survinrent en 1996 (figure 3).

La première épidémie s'est déroulée en 2 vagues. La première, début décembre 1994, affecta 3 camps d'orpailleurs avec 32 cas cliniques. Certaines victimes se sont déplacées par pirogue vers l'hôpital de Makokou, dans le Nord-Est du Gabon, où ils provoquèrent des cas secondaires. La deuxième vague, fin janvier début février 1995, commença avec un

patient ayant quitté l'hôpital de Makokou contre avis médical pour se faire soigner par le tradipraticien (« nganga ») d'un village voisin. Le voisin du *nganga* s'infecta probablement au contact de ce patient et ramena l'épidémie à Makokou lorsqu'il y fut hospitalisé. Cette flambée épidémique causa 49 cas et 29 décès (59% mortalité). Certains symptômes biologiques et cliniques suggéraient une épidémie de fièvre jaune. Lors de cette première épidémie, la coexistence des virus Ebola et de la fièvre jaune fut mise en évidence.

La deuxième épidémie toucha le village de Mayibout 2, à 6h de pirogue au sud de Mekouka et 7h au nord de Makokou, au début de février 1996. L'épidémie débuta lorsque 18 adolescents dépouillèrent et découpèrent le cadavre d'un chimpanzé trouvé mort en forêt. Tombés malades, ils furent évacués sur Makokou. Il y eu 31 cas et 21 décès (67,7% mortalité).

La troisième épidémie toucha la ville de Booué et les villages environnants. Booué est situé au centre du Gabon, à 200 km au Sud-ouest de Mekouka et 120 km de Makokou. La première vague débuta par les décès successifs de 3 chasseurs, puis du *nganga* et de son neveu qui soignèrent le dernier chasseur, et transmirent la maladie à leurs patients des villages voisins. Un docteur gabonais qui avait pratiqué une endoscopie sur un patient malade dans une clinique privée de Libreville parti se faire soigner en Afrique du Sud, à Johannesburg, dès qu'il commença à développer des symptômes de fièvre hémorragique. Il y contamina l'infirmière sud-africaine chargée des soins, qui mourut sans provoquer d'autres cas. Une deuxième vague toucha les villages entourant Booué fin novembre 1996, avec un cas confirmé à Lastourville (130 km au sud) et 11 décès parmi 15 cas dans un hôpital de Libreville. Cette troisième épidémie provoqua 45 décès parmi les 60 victimes [22].

Entre octobre 2001 et mai 2002, le Nord-Est du Gabon fut de nouveau frappé par une épidémie composée de plusieurs foyers isolés résultant de plusieurs introductions du virus dans la population humaine.

Cette épidémie commence en octobre 2001, quand des chasseurs du village de Mendemba tombèrent malades après avoir été au contact d'une carcasse de Céphalophe (*Cephalophus monticola*) trouvée morte en forêt. Ces patients générèrent plusieurs cas secondaires dans les villages voisins, dont Mekambo. L'épidémie a été transportée jusqu'à Makokou suite à l'évacuation sanitaire de patients de Mekambo.

Deux épidémies débutèrent presque simultanément. Fin novembre 2001 à Ekata, dernier village gabonais sur l'axe Mekambo-République du Congo (RC), l'épidémie

toucha d'abord des personnes ayant touché une carcasse d'antilope (*Cephalophus dorsalis*). Début décembre à Olloba, premier village congolais de cet axe, l'épidémie suivit le contact avec une carcasse de gorille (*Gorilla gorilla*).

Fin décembre 2001, 2 épidémies indépendantes frappèrent le Gabon, de nouveau à Ekata sur l'axe Est et à Etakangaye, sur l'axe Nord, suite à la « manipulation » d'une carcasse de chimpanzé. Pendant cette épidémie, un cas isolé apparut à Franceville, à près de 600 km de l'épicentre. La patiente survécut, et l'enquête épidémiologique rétrospective n'identifia aucune source de contamination [23].

Le village d'Entsiami, en RC, situé à 200 km d'Olloba, fut touché par une épidémie mi-janvier 2003. L'épidémie se répandit jusqu'à Kelle, 65 km au sud-est.

Enfin, une épidémie due au dépeçage et à la consommation d'une carcasse de gorille trouvée en forêt frappa, fin mars 2002, le village de Grand Etoumbi, sur l'axe Nord reliant Makokou au Cameroun.

Les épidémies qui ont frappé l'axe Mekambo-Olloba se répandirent jusqu'à Mbomo, en RC, à 80 km à l'est d'Olloba. Ces épidémies causèrent 53 décès parmi les 65 victimes, soit un taux de mortalité de 81% [15, 24, 25].

Mbomo et Kelle, en RC, furent de nouveau touchées entre décembre 2002 et mai 2003 par 2 épidémies indépendantes. L'enquête épidémiologique suggèra 3 introductions par contact avec des carcasses d'antilope ou de gorille. Les cas index (premières victimes de l'épidémie) qui apportèrent l'épidémie à Mbomo et Kelle provenaient, respectivement, des villages de Mvoula et Yembelengoye. Il y eut 89% de mortalité (143 cas et 128 décès) [26].

D'octobre à décembre 2003, Mbomo connu une nouvelle épidémie de FHVE, suite à une partie de chasse dans le village voisin, Mbandza, à 30 km au Nord. Vingt-neuf des 35 cas décédèrent, soit 83% des victimes [27, 28] [29].

D'avril à juin 2005, le village d'Etoumbi, en RC, subit une flambée occasionnant 12 cas et 9 décès, soit 75% de mortalité [30].

La dernière épidémie en date fut déclarée le 11 septembre 2007 dans le Kassaï occidental, en RDC. L'épicentre est localisé à Mweka, à environ 300 km de Kikwit, touchée en 1995. La particularité de cette flambée réside dans une épidémie concomitante

de dysenterie à Shigella. Peu d'informations sur le nombre de cas sont disponibles à l'heure actuelle.

A partir de 2001, simultanément aux épidémies humaines, de grandes épizooties de FHVE affectèrent les populations animales, notamment les chimpanzés, gorilles et antilopes, provoquant un fort déclin de ces populations [26, 31-33].

II. Épidémiologie, cycle du virus

II.1.Dimensions spatio-temporelles et médicales (santé publique)

a. Aire d'endémicité

L'aire d'endémicité est la région dans laquelle le virus circule librement, de manière permanente ou selon un rythme saisonnier, au sein de la population animale lui servant de réservoir. Les apparitions sporadiques et mortelles d'EBOV représentant un marqueur de sa présence, l'aire d'endémicité est donc délimitée par les cas de contamination humaine recensés. Cependant, le virus peut circuler d'une manière « invisible » à l'extérieur de cette aire lorsqu'il circule dans la population réservoir sans provoquer de cas clinique.

L'aire d'endémicité déterminée par les flambées épidémiques comprend donc les régions de forêts denses et humides peu accessibles à l'homme : forêt tropicale du Bassin du Congo et forêt de Taï pour la Côte d'Ivoire (figure 2). Ce milieu correspond à la niche écologique de l'espèce réservoir, donc l'aire dans laquelle le virus est conservé. Les transmissions aux espèces sensibles (singes, hommes) y sont rares.

Cette aire est comprise entre les 5è parallèles Nord et Sud autour de l'équateur. Cette zone possède, d'une part, une végétation dense et un climat de type tropical, avec 2 pics de précipitations séparés par 2 saisons sèches. Cette aire a été confirmée par modélisation de niche écologique. D'autre part, les conditions écologiques appropriées à la circulation d'EBOV sont également présentes en Asie du Sud-Est et aux Philippines, où l'espèce *Reston* circule [34].

A l'intérieur de cette aire d'endémicité se trouve la zone d'émergence, zone dans laquelle la contamination humaine est possible, bien que les contaminations des hommes par EBOV soient rares et accidentelles. De nombreuses raisons peuvent expliquer cette difficulté de contamination humaine (faible démographie de l'espèce animale réservoir, transmission difficile lors du contact, différents vecteurs, …). Cependant, la non-compatibilité des habitats et/ou des modes de vie semble plus plausible [35]. En effet, la plupart des villages sont situés dans des clairières de déforestation dans lesquelles le réservoir animal ne peut évoluer. De plus, la construction de nouvelles maisons en bordure du village, la création de plantations ou d'espaces divers créent des zones tampons qui renforcent la « barrière écologique » séparant l'habitat humain de celui du réservoir animal. La contamination a donc lieu soit dans une zone d'interpénétration des 2 habitats, soit lors de la pénétration inhabituelle de l'homme dans la zone d'habitat du réservoir animal (forêt).

Des études de séroprévalence menées dans différents pays supposés non infectés, c'est-à-dire sans passé épidémique, de l'aire d'endémicité ont mis en évidence la présence d'anticorps dirigés contre EBOV tant par les méthodes d'immunofluorescence indirecte que par ELISA ou Western Blot.

En 1982, une enquête de séroprévalence des anticorps anti-fièvre hémorragiques a montré que 15% de la population de la région du Pool, en RC, présentent des anticorps dirigés contre Ebola [36].

En RDC, les taux d'individus porteurs d'anticorps anti-EBOV de Kikwit, ville touchée par une épidémie en 1995 a été comparé à celui des habitants des villages avoisinant où aucun cas de FHVE ne fut enregistré. Cette étude voulait également comparer les risques, entre les activités forestières et les activités fermières. Un taux de séroprévalence de 9,3% en anticorps anti-Ebola a été observé dans les villages sans passé épidémique, alors que 2,2% des résidents de Kikwit et des environs proches, qu'ils travaillent en ville ou en forêt, présentent des anticorps, confirmant que les villageois au contact fréquent de la forêt sont plus exposés à EBOV [37].

Au Cameroun, une étude menée sur des personnes saines dans 5 régions différentes a montré que 9,7% de la population étaient porteurs d'anticorps anti-EBOV. Le taux le plus élevé a été trouvé dans la population Pygmée [38].

Enfin, en République Centre Africaine (RCA), l'étude de la séroprévalence a été menée en fonction de l'environnement, dans 5 zones écologiquement distinctes, et en fonction de

l'ethnie. Dans les zones explorées, un taux moyen de 21,3% de la population étaient séropositifs pour les anticorps anti-Ebola [39]. Par contre, des fortes disparités ont été relevées entre les groupes ethniques. La séroprévalence trouvée chez les hommes adultes Pygmées Aka, ethnie vivant en forêt et dont l'activité est principalement la chasse et la cueillette, est 3 fois supérieure (37,5%) à la séroprévalence trouvée chez les hommes adultes des ethnies Monzombo et Mbati, qui sont planteurs (13,2%) [40]. Ce résultat a été confirmé par une enquête de séroprévalence utilisant la méthode ELISA dans des zones forestières de RCA. La présence d'anticorps dirigés contre Ebola était près de 2 fois plus importante chez les populations Pygmées vivant en forêt comparée aux populations des villages [41].

Le virus Ebola circule donc dans des régions sans passé épidémique appartenant à l'aire d'endémicité. L'étude des facteurs de risque montre que les populations dont les activités sont fortement liées à la forêt sont plus exposées. Ceci souligne l'importance du franchissement de la barrière écologique, lors d'un déplacement de l'homme dans le milieu forestier par exemple.

b. Mortalité et Fréquence

Les 4 espèces d'*Ebolavirus* sont différemment pathogènes pour l'Homme. Si les espèces *Reston* et *Côte d'Ivoire* sont non pathogènes pour l'Homme ou n'entraînent pas de décès, respectivement [3, 8, 11], les autres espèces, *Soudan* et *Zaïre*, ont décimé des familles et des villages.

Les épidémies dues à SEBOV ont causé environ 50% de mortalité parmi les victimes [13, 15, 16].

Les épidémies dues à ZEBOV sont les plus meurtrières, avec des taux de mortalité pouvant aller jusqu'à près de 90% [17, 21, 22, 24, 28].

Les épidémies de FHVE causées par différentes espèces dans des régions géographiques distinctes sont apparues simultanément : 1976 (SEBOV au Soudan et ZEBOV en RDC) et en 1994-1996 (CIEBOV en Afrique de l'Ouest et ZEBOV en Afrique centrale). Ces coïncidences suggèrent que le cycle de transmission pourrait faire intervenir des conditions écologiques et environnementales, telles que les précipitations ou les changements cycliques au sein de la population réservoir. En Afrique Centrale, les

épidémies de FHVE se sont produites lors de la saison des pluies ou de la petite saison sèche.

c. Impact s'il n'y a pas de contrôle

Aucun vaccin et aucun traitement n'est disponible à ce jour pour lutter contre la FHVE. La maîtrise des épidémies consiste dans l'isolement des cas, la mise en place et le respect des mesures de précautions sanitaires lors des soins ou rites funéraires et la reconnaissance précoce de l'épidémie.

Cependant, même en zone d'endémie, les symptômes en phase primaires ne sont pas spécifiques et peuvent être associés à d'autres pathologies. En effet, cette première phase est pseudo grippale, et certains symptômes, comme la fièvre et la diarrhée, sont aussi caractéristiques de dysenterie et d'autres pathologies tropicales. Cette non-spécificité des symptômes risque de conduire à des erreurs de diagnostic, comme ce fut le cas à Kikwit, RDC, en 1995, où les décès par FHVE ont été confondus avec une épidémie de dysenterie nosocomiale [20]. Les mesures de précaution sanitaires étant plus drastiques dans le cadre d'une épidémie de FHVE, plusieurs décès et contacts se sont produits avant que ZEBOV ne soit identifié. Ce retard de diagnostic a causé un grand nombre de victimes et a été à l'origine de la plus grande épidémie.

Lors de l'épidémie de Gulu, Ouganda, en 2000-2001, bien que l'épidémie de FHVE ait été reconnue rapidement, la transmission ne s'est interrompue que lorsque les mesures de dépistage et d'isolement ont été mises en place. Toutefois, malgré les mesures sanitaires, le personnel soignant fut durement touché par cette épidémie : sur les 29 travailleurs infectés, 14 l'ont été après la mise en place des mesures sanitaires. De plus, des foyers secondaires se sont déclarés dans 2 villes du sud du pays, suite au déplacement non contrôlé des populations [15]. Cette épidémie fut la plus vaste flambée jamais enregistrée due à l'espèce SEBOV.

La reconnaissance précoce et l'isolement des malades restent à ce jour les seules armes à notre disposition pour lutter contre le virus Ebola et les épidémies qu'il provoque. Afin de répliquer rapidement à toute nouvelle flambée épidémique, qu'elle soit due au virus Ebola ou à d'autres agents pathogènes, un réseau global d'alerte et de réponse aux épidémies (GOARN : Global Outbreak Alert and Response Network) a été mis en place en 2000 par l'OMS et ses centres collaborateurs. Désormais, tout cas clinique suspect est

isolé, et un prélèvement est envoyé au centre de référence le plus proche pour diagnostic du cas en laboratoire. Ainsi, la mise en place de dispositifs de lutte contre la maladie devient plus rapide, permettant de diminuer significativement le nombre de victimes.

d. Importance du virus aux niveaux culturel, social et économique

- **Perception de l'épidémie**

Une épidémie est l'apparition et la propagation d'une maladie contagieuse qui atteint dans une même région un grand nombre d'individus. Depuis toujours, les épidémies ont bouleversé les sociétés. Elles furent et sont une cause majeure de mortalité et de changements démographiques.

L'homme, par ses activités économiques ou son comportement, a été le point d'origine ou l'élément de diffusion de nombreuses épidémies passées ou récentes. Bien que l'aspect biologique de ces épidémies soit essentiel à leur compréhension, le volet culturel est tout aussi important, puisqu'il permet de mieux cerner les modes d'appréhension socioculturels, psychologiques et religieux par lesquels l'homme explique les épidémies qui le touchent [42].

Les réactions provoquées par une épidémie sont universelles, bien que certaines réactions soient spécifiques de la culture locale et de la maladie qui sévit.

La mort causée par ce mal et la peur exacerbée par son origine inconnue entraînent une modification des structures sociales et des liens familiaux. Les relations humaines sont affectées par l'absence de contact, la société peut être déstabilisée par les fuites ou réclusions, la peur de la maladie peut éloigner les membres d'une famille.

La peur de l'inconnu amène les individus à trouver une origine spirituelle à cette épidémie. Toutes les grandes épidémies passées ont vu la désignation de boucs émissaires, accusés de propager ou d'avoir créé la contagion, chargés des péchés de la collectivité. Très souvent, la population attribue à l'épidémie une origine divine, où Dieu serait en colère et punirait les hommes à cause de leurs mauvaises mœurs.

Sur le point de la religion, la société africaine est duale, avec d'un côté la culture ancestrale, basée sur l'animisme et la médecine « traditionnelle », et de l'autre, la culture importé par la colonisation, basée sur le christianisme et la médecine « moderne ». La culture ancestrale africaine est basée sur la notion de force. Chaque être naît avec un

certain potentiel de force, qu'il est possible d'entretenir au cours de sa vie. L'animiste croit en plusieurs divinités dont l'une est supérieure aux autres. Cette croyance a facilité l'intégration des religions monothéistes en Afrique. De même, la maladie et l'infortune n'existent pas [43]. Les décès ne sont pas dus à la maladie, mais plutôt à une diminution de la force ou à une élimination spirituelle causée par un ennemi, c'est donc un phénomène naturel et normal.

Cette notion spirituelle encourage le déni de l'existence du virus Ebola. Les personnes refusent de reconnaître qu'un virus invisible et inconnu les menace.

De multiples explications sont trouvées pour justifier une épidémie. Elle peut être due à la colère divine, à cause du mauvais comportement des fidèles, ou à la colère d'un esprit suite à un rituel mal exécuté. Elle peut également trouver son origine dans un sort jeté par un sorcier, un jaloux ou un envieux, par un individu à la recherche de profit financier ou de pouvoir politique. L'explication par le sort perdure tout au long de l'épidémie voire même après. Dans la région Gabon-Congo, une épidémie circonscrite à 1 ou 2 familles est considérée comme un sort collectif jeté sur ces dernières. La multitude d'explications possibles implique une multitude de recours [44, 45]. En effet, lorsqu'un cas clinique apparaît, il peut soit aller consulter un tradipraticien et/ou un sorcier et/ou aller à l'église pour l'imposition des mains et/ou aller à l'hôpital et/ou à la gendarmerie. Foi et superstition se mêlent alors pour donner naissance à des micro-croyances locales combinant le divin et l'attachement à un guérisseur. Au Congo, de nouvelles églises, fondées sur le modèle d'un cabinet médical par un guérisseur-prophète, proposent un traitement à base de plantes associé à un exorcisme, traitement spirituel. L'exorcisme est destiné à chasser le démon du corps du patient malade, démon entré dans ce corps à cause d'une action répréhensible, ou par l'action d'hommes qui cherchent à nuire et dont la force spirituelle est supérieure [43].

- **Survivants**

Une étude succincte sur la stigmatisation des survivants a été menée lors de l'épidémie de 2000 en Ouganda. Bien que la moitié des villageois déclarent se sentir capables d'un contact avec un survivant de FHVE plus d'un mois après sa sortie de l'hôpital, beaucoup de convalescents sont mis à l'écart longtemps après cette période. En effet, les douleurs musculaires et articulaires sont toujours présentes, ainsi qu'une grande fatigue [46] et

certains convalescents ont été atteints de troubles oculaires [47]. L'amalgame est rapide pour les villageois qui les considèrent comme toujours contagieux.

Plusieurs survivants ont été plus fortement stigmatisés. Certains n'étaient plus acceptés dans leur maison, leurs vêtements et biens avaient été brûlés, leur famille les avait abandonnés. Cette discrimination peut aussi s'étendre aux membres de la famille et du village. Les survivants sont craints dans leur communauté, ils sont rejetés au marché, parfois même lorsqu'ils marchent dans le voisinage [48].

La mise à l'écart des survivants peut également découler du modèle d'explication de la sorcellerie. En effet, la guérison de ces personnes est la preuve de leurs pouvoirs de sorciers grâce auxquels ils ont pu déjouer le sort. Enfin, l'aide matérielle apportée aux convalescents suscite les jalousies et déclenche un processus d'accusation.

En Afrique Centrale, dans la région Gabon-Congo, les épidémies sont survenues dans des villages enclavés où les familles se situent de part et d'autre de la frontière. Les survivants y sont très entourés, contrairement à l'Afrique de l'Est. Les hommes sont soutenus et les femmes qui ont soigné leur mari et survécu sont considérées comme de grandes guérisseuses. La mise à l'écart ne vient pas des villageois, mais bien des convalescents qui s'écartent d'eux-mêmes pour 2 raisons principales. La première est l'habitation offerte par l'OMS et construite en bordure du village. La seconde est une précaution qu'ils prennent en cas de nouvelle épidémie, afin de ne pas en être considéré comme responsables. Le reste du village les respecterait et craindrait beaucoup moins leur potentielle contagiosité que leur force spirituelle, qui leur aurait permis de survivre au sort jeté par un individu plus puissant que la majorité des membres de leur famille [Gasquet C., communication personnelle].

II.2. Transmission du virus chez l'Homme

a. Importance du contact lors des soins, des rites funéraires et de la médecine traditionnelle.

Dès la première apparition en 1976, des études épidémiologiques cherchent à déterminer les causes et moyens de contamination afin d'enrayer la transmission et mettre fin aux épidémies. Ces études au sein de foyers hautement infectés ont montré un taux

d'attaque (taux d'infection secondaire) de 20% des personnes ayant simplement dormi et touché le cas primaire lors de la phase aiguë de la maladie contre 81% des personnes qui lui ont apporté des soins [13, 17]. Lors de l'épidémie de Kikwit, 173 membres de familles ayant eu des contacts avec des malades ont été suivis. Les 78 membres de la famille qui n'ont eu aucun contact physique avec les personnes malades n'ont développé aucun symptôme. Les 28 personnes ayant eu des contacts physiques directs avec un malade, soit pendant la phase précoce de la maladie à domicile, soit pendant l'hospitalisation, ont été infectés et sont tombés malades à leur tour [49]. Cette étude souligne l'importance d'un contact physique direct, prolongé et continu entre le malade et le soignant pour que la contamination ait lieu. De plus, les contacts physiques répétés lors de la phase d'incubation n'ont pas été associés avec un risque accru de contamination, de même que les contacts sporadiques tels que parler, partager un repas ou un lit avec un malade. Le sexe n'est pas un facteur de risque significatif. En effet, autant d'hommes que de femmes sont victimes de la FHVE du fait de leurs occupations respectives : les hommes, chargés de la chasse sont le plus souvent les cas index, ils sont également chargés de l'enterrement des autres hommes ; la population féminine paie son tribu par le biais des soins aux malades et des funérailles des femmes. Les taux de mortalité des hommes et des femmes sont équivalents, avec une légère prédominance pour l'un ou l'autre sexe en fonction des épidémies [13, 17, 21, 22, 24]. Un taux d'infection faible (9%) a été observé chez les enfants de moins de 17 ans [49]. Cette faible transmission aux enfants a été expliquée par la tradition africaine de les tenir le plus souvent possible éloignés des malades [50], ce qui renforce l'idée d'un contact étroit indispensable à la contamination. Cependant, les épidémies de Booué, Gabon, en 1996 se sont déclarées chez des adolescents, et 20% des victimes des flambées de 2001-2002 au Gabon étaient âgés de moins de 14 ans [24].

L'importance de la fréquence de contact avec un patient en phase symptomatique dans la transmission a été confirmée lors des épidémies de 1994-97 au Gabon et de 2000 en Ouganda [22, 51].

Les études faites lors des premières épidémies et la ré émergence à Kikwit montrent un risque de contamination accru pour les personnes assistant aux funérailles d'un cas infecté [17, 52]. Ce facteur de risque a été confirmé lors de l'épidémie de Gulu, Ouganda en 2000, pendant laquelle une équipe de chercheurs a interrogé des personnes ayant eu des contacts qui ont développé ou pas des symptômes (ou les proches des malades décédés). Quatre-

vingts pourcent d'entre eux déclarent avoir assisté aux funérailles de leur cas index, et près de 35% ont nettoyé le cadavre [51].

En Ouganda, c'est la tante paternelle du décédé (ou une femme âgée de la lignée paternelle) qui s'occupe de la toilette et de l'habillement du cadavre. Les personnes assistant aux funérailles se lavent toutes les mains dans un même récipient, puis sont invités à venir toucher la dépouille une dernière fois. Le corps est ensuite enveloppé dans un tissu blanc puis enterré à proximité de la maison [48]. Ce rituel est très important, c'est pourquoi les parents éloignés font spécialement le voyage pour participer à la cérémonie, participant ainsi à la propagation du virus dans des villages parfois très distants du foyer primaire de l'épidémie [49].

Dans les villages du Nord-est du Gabon et de la Cuvette Ouest de la RC, les funérailles donnent lieu à des rituels similaires. Beaucoup de personnes assistent à l'enterrement, mais ce sont surtout les membres de la famille qui touchent et pleurent sur le corps du défunt.

Dans les villages, les structures sanitaires ne sont pas toujours fonctionnelles, et les habitants ont souvent recours à la médecine traditionnelle pour diagnostiquer et soigner les maladies. Les pratiques des tradipraticiens (appelés *nganga*) se fondent souvent sur une thérapie de groupe. Le *nganga* réuni sous son toit des personnes aux maladies diverses et les soigne au moyen d'incantations, d'herbes et souvent de scarifications non stériles [53].

Toutefois, suite aux campagnes de lutte contre le SIDA, de nombreux *nganga* ont diminué leur recours à la scarification, et ont pris de nouvelles précautions contre le VIH. Ainsi, ils utilisent des lames propres à chaque patient pour les scarifications. Il existe également d'autres modes de purification utilisés par les *nganga*. L'un d'eux est la purification par l'eau. Si certaines ethnies lavent les impuretés à la source afin qu'elles soient emportées, certains *nganga* font puiser l'eau à l'aube par leurs patients et les soignent au village. Ceux-là peuvent parfois être amenés, par soucis d'économie de l'eau et/ou des herbes, à réutiliser l'eau pour traiter plusieurs patients.

Les tradipraticiens sont donc considérés comme de potentiels amplificateurs de l'épidémie par leurs pratiques. Cependant, leur popularité représente également un facteur d'amplification. Lors de l'épidémie de 2000 en Ouganda, la mort d'une guérisseuse infectée auprès d'un de ses patients atteint de FHVE illustre ce rôle de la popularité des tradipraticiens. Dès le début des symptômes, cette femme partit dans son village, où elle n'y soigna personne, son matériel étant resté en ville. La transmission de la maladie à plusieurs personnes du village n'était donc pas due aux pratiques traditionnelles, mais au

fait qu'elle était une puissante guérisseuse. Beaucoup de personnes l'ont donc assistée, soignée, et ont nettoyé son cadavre pour les funérailles se contaminant par contact direct [48].

Voyons maintenant quels sont les liquides biologiques assurant la transmission.

Le premier matériel biologique infectieux identifié fut le sang. Dès les premières épidémies de 1976, les titrages de prélèvements sanguins de malades ont révélé des virémies importantes durant toute la durée des symptômes. Des macaques rhésus et cynomolgus (*Macaca macaca* et *Macaca fascicularis*) et des singes verts *(Cercopithecus aethiops)* infectés expérimentalement par du sang de singes ou humains prélevés en phase symptomatique ont développé la maladie et presque tous en sont morts [54, 55]. Tout matériel biologique contenant du sang (écoulement nasal, liquide diarrhéique, vomissures, c'est-à-dire presque tous dans le cadre d'une fièvre hémorragique) sont donc potentiellement infectieux pour les muqueuses, une peau abrasée, voire une peau saine.

EBOV a également été isolé dans les urines, la salive et les fécès de macaques infectés par REBOV [56] et ZEBOV [57]. Chez les humains, la présence de virus a été détectée jusque 33 jours après le début des symptômes dans l'urine, la salive, les selles, les liquides vaginal et séminal, les larmes et la peau de patients convalescents [58]. Le virus a également été mis en évidence dans des biopsies post-mortem de peau et autour des glandes sudoripares, faisant de la sueur un mode de contamination potentiel [59].

b. Infection nosocomiale

La transmission nosocomiale se produit selon 2 modes.

D'un côté, la mauvaise ou non-application des mesures de protections sanitaires de base par le personnel médical entraîne leur contamination par contact direct avec les liquides corporels des patients infectés. Des cas de contamination par frottement des yeux avec des gants souillés ou lors d'un acte chirurgical ont été recensés [21] et le risque de piqûre accidentelle avec une aiguille contaminée n'est pas à exclure. Le personnel médical malade contamine ensuite les patients lors des auscultations ou soins.

D'un autre côté, les patients hospitalisés pour d'autres pathologies et ceux venus en consultation externe peuvent être contaminés suite à l'injection de médicament avec des

seringues et aiguilles non stériles réutilisées [17]. Il y a également de nombreuses occasions de contamination pour ces patients et leurs visiteurs qui parfois aident aux soins dans les salles d'hôpital, tels que le contact avec des draps ou vêtements souillés, les bassins hygiéniques, le matériel non stérile, l'air ambiant rempli de particules virales émises par la sueur, les diarrhées et vomissements [14].

c. Infection par voie respiratoire

Le mode de transmission principal, nous venons de le voir, est constitué par le contact direct avec un patient malade et ses fluides corporels. Or les enquêtes épidémiologiques lors des épidémies de 1976 et 1979 au Soudan mettent en évidence plusieurs cas n'étant pas reliés à un contact physique. De même, lors de l'épidémie de Kikwit, en 1995 en RDC, 5 des 315 cas n'ont eu aucun contact physique avec un malade ou des personnes présentant les symptômes caractéristiques de la FHVE [52]. Ces victimes sans cas index suggèrent l'existence d'une voie de transmission autre que le contact physique, probablement une transmission par les voies respiratoires faisant intervenir de larges gouttes ou des particules virales aérosolisées.

Lors des épidémies de FHVE de l'espèce *Reston* qui ont touché les populations de singes macaques cynomolgus exportés des Philippines, plusieurs cas d'infection sans contact physique ont également été observés [2, 7, 60]. Ce mode de contamination a été remarqué lors d'un protocole expérimental visant à étudier le rôle protecteur de l'IFN-α dans l'infection de singes macaques rhésus par ZEBOV. Tous les singes infectés, qu'ils aient reçu ou non de l'IFN-α, développèrent des symptômes et moururent. Quelques jours après le décès du dernier animal, 2 des 3 animaux contrôles négatifs succombèrent à la FHVE. Une forte présence d'antigène viral fut détectée dans les tissus pulmonaires de ces animaux, qui étaient détenus dans des cages situées à 3m des animaux infectés expérimentalement. De plus, pendant toute la durée du protocole, les animaux utilisés comme contrôles négatifs furent prélevés les premiers, afin d'éviter une contamination accidentelle par les seringues ou les tampons de prélèvement. Leur contamination n'aurait pas été le fait d'une contamination accidentelle par le matériel de prélèvement, et la forte présence d'antigènes dans les tissus pulmonaires suggérait une contamination par voie aérienne [61].

Un mode de transmission autre que le contact physique direct fut donc envisagé. Il ferait intervenir l'exposition des voies respiratoires, conjonctivales ou buccales par des gouttelettes contenant de fortes quantités de virus, ou des suspensions de particules virales sous forme d'aérosols [62]. Les gouttelettes ou aérosols contenant EBOV peuvent soit provenir des projections lors des évacuations de liquides biologiques infectés (vomissures, liquides diarrhéiques, salive, sueur, …) soit être générés au cours de la respiration.

Dans le but d'étudier le potentiel d'infection aérogénique, différentes infections expérimentales ont été menées chez le singe. D'abord, l'infection de 8 macaques rhésus, 4 par voie conjonctivale et 4 par voie orale, a induit une pathologie associée à une FHV aboutissant au décès de 7 animaux [63]. Bien que ces résultats aient été obtenus grâce à de fortes quantités de virus déposées directement sur les muqueuses, ils doivent tout de même être pris en considération dans l'application de mesures de précaution lors de la manipulation d'animaux infectés.

Une autre étude faisant intervenir une inhalation forcée d'une faible quantité de virus a entraîné la mort des singes infectés et a mis en évidence une forte concentration d'antigène viral dans l'épithélium des voies respiratoires et les tissus pulmonaires [64]. De même, l'inhalation de grandes quantités de virus de Marburg provoque la maladie puis la mort chez les singes verts [65]. Les résultats de ces études sont renforcés par l'analyse en microscopie électronique et en immunohistochimie des coupes pulmonaires prélevées sur les animaux décédés. De fortes concentrations d'antigène viral sont retrouvées dans les alvéoles pulmonaires, le tissu interstitiel pulmonaire et à l'intérieur des pneumocystes de type I qui tapissent les parois alvéolaires [56, 61, 64, 66]. Enfin, certaines études ont montré que EBOV est relativement stable dans le milieu atmosphérique et notamment dans le mucus alvéolaire, et qu'il résiste assez bien à certains traitements physiques (congélation/décongélation, exposition aux rayons U.V.) [67].

Tous ces arguments suggèrent l'existence d'une transmission aérienne, bien qu'aucun ne la démontre formellement. Cependant, les faits suggèrent que la transmission aérienne n'est pas courante. En effet, lors de l'épidémie de 1979 au Soudan, parmi la famille proche au contact d'un malade, seulement ceux ayant eu des contacts directs et prolongés lors des soins développaient la maladie. Les membres de la famille exposés à un malade dans l'espace confiné, relativement petit et peu ventilé qu'est une hutte ou une chambre commune étaient épargnés [14]. De même, le petit nombre de cas sans contact physique avec un malade lors de l'épidémie de Kikwit (5 cas sur 315, soit 1,6%) rend l'hypothèse d'une transmission par voie aérienne peu probable [52]. Néanmoins, la mise en évidence

par des études expérimentales de ce mode de contamination, soit par gouttelettes, soit par aérosols, justifie la mise en place de mesures de prévention dans les hôpitaux et les centres de recherche lors de la survenue de cas cliniques [62].

d. Autres modes de contamination

Un autre de mode de transmission concerne le virus de Marburg et n'a été observé qu'une seule fois. Trois mois après l'épidémie qui a touché l'Institut virologique de Marburg, la femme d'un technicien survivant est tombée malade. Les analyses virologiques ont révélé que cette femme avait été contaminée par le sperme de son mari lors de sa convalescence [68]. Ce mode de transmission a été corroboré par la détection de virus infectieux dans le sperme d'un technicien de laboratoire en Angleterre qui avait développé les symptômes caractéristiques de la FHVE plus de 2 mois avant [18]. Lors de l'épidémie de Kikwit, RDC, en 1995, une étude sur la persistance d'EBOV chez 12 patients convalescents a permis de mettre en évidence la présence de virus jusqu'à 101 jours dans le fluide séminal, et la présence de virus infectieux dans le sperme d'un patient 82 jours après le début des symptômes [58]. Toutefois, aucune contamination par ce mode n'a été observée avec EBOV.

III.3. Cycle naturel du virus Ebola

a. Transmission aux espèces sensibles : Hommes et Primates

La propagation inter-humaine de la maladie a lieu, comme nous l'avons vu précédemment, par le contact physique répété avec les fluides corporels d'un individu infecté et en phase symptomatique. L'origine suspectée de l'épidémie, ou cas index, est la personne qui a contracté la maladie auprès d'un animal, et non d'un autre individu malade.

- **Infection du cas index à partir d'un animal malade.**

La plupart des épidémies de FHVE ont eu comme une source de contamination un animal connu.

En Côte d'Ivoire, en 1994, une éthologue suisse s'est contaminée lors de l'autopsie d'un chimpanzé. L'étude d'identification a montré qu'il était infecté par la même souche virale que l'éthologue [10].

Au Gabon, en 1996, les cas index furent des adolescents ayant dépecé un cadavre de chimpanzé trouvé en forêt [22]. Les flambées épidémiques de 2001-2002 dans le Nord-est du Gabon ont débuté par la manipulation d'un céphalophe (*Cephalophus monticola*) trouvé mort, une partie de chasse ou la manipulation de la viande d'un gorille (*Gorilla gorilla*) [24].

Au Congo, les épidémies de Mbomo-Kelle et de Mbandza, en 2003, et Etoumbi en 2005, suivirent des contacts avec des gorilles ou d'autres mammifères tués ou trouvés morts.

Les primates et certains mammifères sont sensibles à EBOV et pourraient jouer le rôle de vecteur du virus pour l'aider à traverser la « barrière écologique » séparant l'espèce réservoir et l'homme.

- **Infection du cas index à partir du réservoir**

Cependant, certaines épidémies survinrent sans source animale identifiée. Les premières épidémies au Soudan en 1976 et 1979 débutèrent par quelques travailleurs d'une usine de coton tombés malades, aucun contact avec un animal ni aucune chasse en forêt ne furent enregistrés [13, 14]. L'origine de l'épidémie en RDC en 1976 fut un homme venu à l'hôpital avec des symptômes présumés de paludisme [17]. Le cas index de la ré-

émergence en 1995 contracta la maladie soit dans la mine de charbon où il travaillait, soit dans sa plantation [21].

Ces cas index se seraient donc infectés directement auprès de l'espèce réservoir.

b. Recherche de l'espèce réservoir

Le réservoir est une (ou des) espèce(s) animale(s) dans lesquelles le virus peut se répliquer de manière asymptomatique. La question de l'hôte naturel d'EBOV est longtemps restée posée, le voile commençant seulement à se lever sur ce mystère. De nombreuses enquêtes de terrain et de laboratoire ont été initiées afin d'identifier l'espèce animale, vertébrée ou invertébrée, capable d'héberger le virus sans développer de maladie.

Enquêtes de terrain

La première enquête de terrain eut lieu lors de l'épidémie de Yambuku, en 1976 en RDC. Des insectes et animaux autour et dans les habitations des malades ont été capturés et l'isolement viral a été tenté sur des lignées cellulaires sensibles à EBOV, telles que la lignée de cellules de rein de singe vert (cellules Vero). Les cellules ont été infectées par le broyat des moustiques et de 818 punaises de lit capturés, ou par le sérum de 10 cochons domestiques, 1 vache, 7 chauves-souris, 123 rongeurs, 8 écureuils, 6 singes cercopithèques ou 2 petites antilopes (*Cephalophus monticola*). Aucun isolement viral n'a pu être obtenu [17]. Une étude similaire portant sur une capture de 501 vertébrés a été menée au Soudan au moment de l'épidémie de 1976, avec les mêmes résultats [69].

Après le cas isolé d'infection par ZEBOV à Tandala, RDC, en 1977 [19], d'importantes captures furent entreprises durant la saison sèche de 1979 dans cette région du Nord de la RDC. Cette étude, centrée sur Yambuku et Tandala, à environ 300 km, a été menée sur 267 primates, 463 chauves-souris, 137 écureuils, 514 rongeurs, 186 autres mammifères, 67 oiseaux et 30 reptiles. Aucun isolement viral n'a pu être obtenu [70].

A la suite de l'épidémie de 1995 en RDC, 2 nouvelles enquêtes de terrain ont été menées. Dès la fin de l'épidémie, 3 066 vertébrés [71] et 27 843 arthropodes [72] ont été capturés dans des habitats proches de Kikwit, ainsi que dans les champs où le cas index travaillait. Des tentatives d'isolement viral et les dosages d'Immunoglobuline G (IgG) circulant chez les vertébrés furent réalisées, ne donnant lieu à aucun isolement et à aucune

détection d'anticorps. La collection de vertébrés comprenait, entre autres, 1914 rongeurs, 539 chauves-souris, 265 oiseaux et 129 reptiles et amphibiens. La collection d'arthropodes était constituée de 15 118 moustiques, 6 538 punaises de lit, 144 puces, 103 poux et 5 816 tiques.

Récemment, une enquête de prévalence en anticorps a été menée sur 439 chiens dans le Nord-est du Gabon. Cette étude a été entreprise suite à l'observation, lors des épidémies de 2001-2002, que le léchage et/ou le comportement charognard des chiens les exposait fortement à EBOV. Dans les villages ayant enregistré des cas, 25 % des chiens prélevés présentaient des anticorps dirigés contre le virus. Ces résultats suggèrent que les chiens puissent être infectés par EBOV, et que cette infection serait asymptomatique. Sans en être l'espèce réservoir (les contacts homme-chien sont trop fréquents et réguliers par rapport à l'apparition sporadique des épidémies), les chiens pourraient être des vecteurs du virus et avoir un rôle de source primaire ou secondaire d'infection de l'homme [73].

- **Infections expérimentales**

Parallèlement aux enquêtes de terrain, plusieurs infections expérimentales d'animaux, plantes ou arthropodes ont été effectuées. Les tentatives d'inoculation par voie intra-thoracique d'arthropodes avec REBOV [74] ou ZEBOV [75] n'ont pas abouti à la détection de réplication virale. Une autre étude a mis en évidence une virémie élevée pendant près de 4 semaines chez des chauves-souris insectivores et frugivores infectées expérimentalement par ZEBOV [75]. Ces résultats ne procurent pas la preuve définitive que les chauves-souris pourraient être le réservoir d'EBOV, mais ils ouvrent un axe de recherche pour les enquêtes de terrain.

- **Éléments de spéculation sur le réservoir**

Plusieurs hypothèses plus ou moins fiables ont été émises sur la nature du réservoir et la méthode à utiliser pour le découvrir. Dans ce but, des indicateurs pratiques sont proposés. Il s'agit d'accumuler des preuves épidémiologiques, puis d'identifier l'infection naturelle par détection d'anticorps ou par isolement du virus, et enfin de caractériser le(s) agent(s) pathogène(s) trouvé(s) [76]. Une autre méthode propose d'émettre une série de postulats concernant la nature du réservoir, de développer une liste de mammifères répondants aux critères émis et dont la distribution correspond à la zone endémique, afin d'étudier les différentes espèces par ordre de priorité [77].

Cependant, l'animal sur lequel pèsent le plus de soupçons est la chauve-souris (pour revue [28]). Cette hypothèse est appuyée non seulement par des infections expérimentales encourageantes mais aussi par quelques constatations. (i) Des chauves-souris ont été repérées dans des entrepôts de l'usine de coton de Nzara, au Soudan, où eurent lieu les premières épidémies [13]. L'Australien infecté par MARV qui a contaminé 2 personnes à Johannesburg en 1975 rentrait d'un voyage au Zimbabwe durant lequel il dormait souvent à la belle étoile et plus d'une fois dans une maison abandonnée dont le grenier était habité par de nombreuses chauves-souris [78]. De même, 2 semaines avant de tomber malade, l'ingénieur français victime du virus de Marburg au Kenya en 1980 avait visité un parc national et il était entré dans des grottes abritant une large population de chauves-souris [79]. Dans le but de tester l'hypothèse de la contamination par les chauves-souris, des babouins et singes vervets ont été placés en cage à l'intérieur de la grotte incriminée. Aucun des animaux ne tomba malade [80]. (ii) Certaines espèces virales génétiquement proches des *Filoviridae*, telles que les *Rhabdoviridae* et les *Paramyxoviridae*, ont les chauves-souris pour hôte naturel [35].

Cependant, l'hypothèse des arthropodes comme réservoir ou vecteur ne doit pas être définitivement écartée. Bien que les infections expérimentales n'aient donné que des résultats négatifs [74, 75], l'Australien infecté par MARV en 1975 a déclaré avoir été piqué ou mordu par un arthropode inconnu 6 jours avant le début des symptômes [78]. De plus, l'infection expérimentale de moustiques *Aedes aegypti* a montré la persistance de MARV pendant plus de 3 semaines [81].

- **Les chauves-souris, espèce réservoir ?**

Les connections épidémiologiques ainsi que quelques infections expérimentales font peser de lourds soupçons sur les chauves-souris frugivores. Dans le but de vérifier ces présomptions, des enquêtes de terrain ont été menées avec 3 missions de capture d'animaux dans 2 zones forestières touchées par différentes épidémies entre 2001 et 2004. Les filets de captures ont été posés dans un rayon d'une dizaine de km autour du lieu où une carcasse de gorille a été trouvée infectée par EBOV. Les captures se sont étendues sur 3 semaines, quelques jours après la découverte de la carcasse. Au total, 1 030 animaux, dont 679 chauves-souris ont été capturés [82].

Les analyses de laboratoire, combinant détection d'anticorps dirigés contre EBOV (IgG) et amplification de séquences virales, ont montré que 3 espèces de chauves-souris, *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata*, sont asymptomatiquement infectées par EBOV. Des IgG ont été détectées chez des individus de ces espèces. L'amplification virale a été possible chez ces mêmes espèces, mais à partir d'individus différents [83]. Ces premières preuves de l'infection asymptomatique de chauves-souris frugivores étayent l'hypothèse émise par les précédentes investigations identifiant ces animaux comme réservoir candidat (Figure 4).

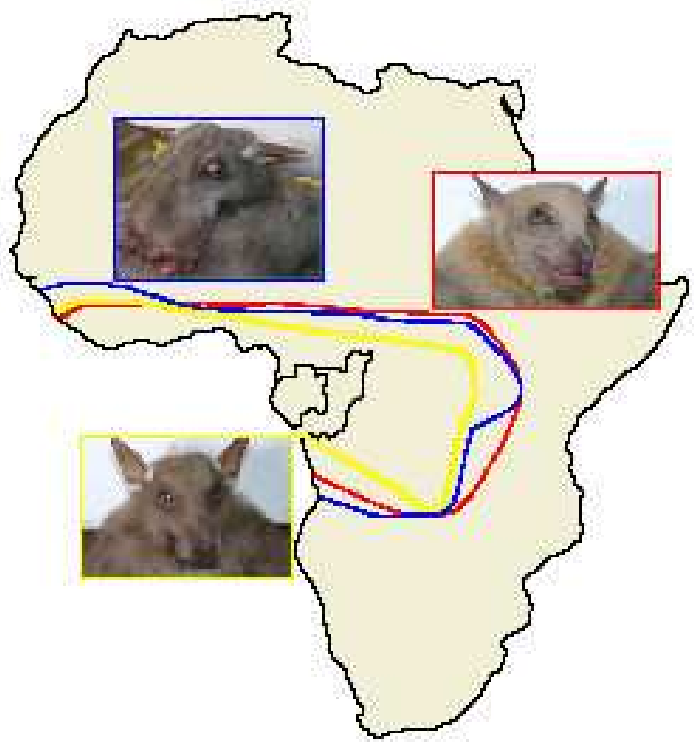


Figure 4 : Distribution géographique des espèces de chauves-souris frugivores suspectées réservoir d'EBOV. *Hypsignathus monstrosus* en bleu, *Epomops franqueti* en rouge et *Myonycteris torquata* en jaune. D'après Leroy [83]

Des analyses phylogénétiques ont été menées sur les séquences amplifiées à partir des chauves-souris capturées. Les séquences obtenues se groupent avec les séquences déjà connues de l'espèce *Zaïre*. Ce résultat confirme l'appartenance du virus qui infecte les chauves-souris à l'espèce ZEBOV [83]. La disposition des séquences en fonction du temps suggère des relations de descendance. Les populations des 3 espèces de chauves-souris auraient pu subir une diminution drastique due à des conditions écologiques et environnementales inconnues. Cette réduction aurait diminué la population virale, faisant

disparaître les lignées virales existantes, à l'exception d'une seule. Les variations génétiques observées seraient alors la conséquence d'une accumulation de mutations ponctuelles lors des 30 dernières années [84]. Cependant, ces découvertes n'excluent pas l'existence d'autres espèces de chauves-souris ou d'autres animaux abritant naturellement EBOV.

Toutefois, le mode et les conditions de transmission d'EBOV des chauves-souris aux humains restent à découvrir. Les analyses phylogénétiques suggèrent une introduction récente d'EBOV dans les 3 espèces de chauves-souris étudiées. Dans l'hypothèse où les chauves-souris ne seraient pas le seul réservoir de ZEBOV, l'existence d'un ancêtre commun viral pourrait être expliquée par l'introduction du virus chez les chauves-souris frugivores au même moment où le virus a infecté d'autres populations sauvages et a émergé chez l'homme. Cette hypothèse impliquerait l'existence d'un réservoir primaire à découvrir [84].

Les enquêtes épidémiologiques ont montré que la mortalité due à EBOV chez les grands singes est accrue pendant la saison sèche. Or vers la fin de cette saison, les denrées alimentaires se raréfient en forêt. Différentes espèces animales frugivores, dont les grands singes et les chauves-souris, se retrouveraient donc au même moment à consommer les mêmes fruits dans une zone restreinte. Cette compétition pour la nourriture favoriserait et augmenterait les contacts entre les 2 espèces, par la salive laissée sur les fruits, l'urine ou les fécès. De plus, la saison sèche est la période des mises bas groupées chez les femelles chauves-souris. Cet événement physiologique permettrait la réplication du virus chez les chauves-souris gestantes, grâce à la modification de la nature et du niveau de la réponse immunitaire, pouvant aller jusqu'à favoriser l'apparition de virus dans la circulation sanguine. Les grands singes se contamineraient alors à partir du sang et/ou des tissus placentaires [82, 83].

Le cycle naturel du virus Ebola se compose donc de 3 étapes : (i) la transmission de virus de l'espèce réservoir à une espèce sensible (primate ou directement l'homme) ; (ii) contamination de l'homme à partir d'un animal infecté ; (iii) transmission inter-humaine avec l'hôpital comme amplificateur de l'épidémie (Figure 5).

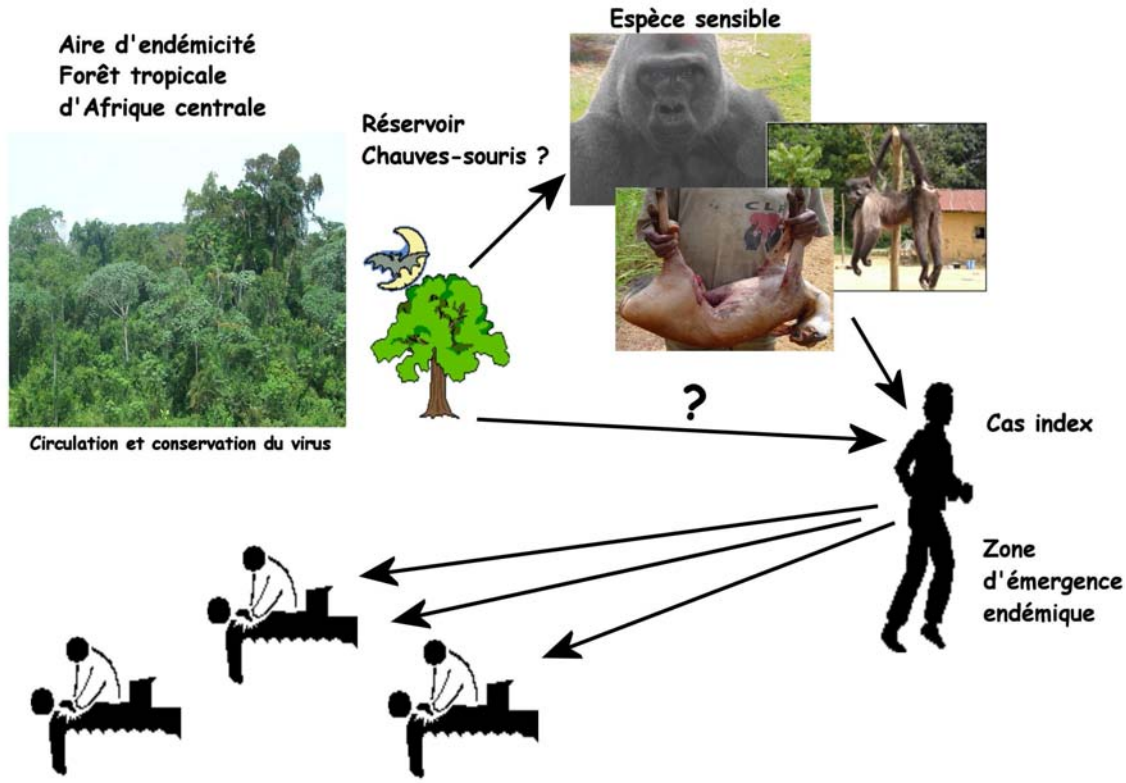


Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'épidémiologie de l'infection par EBOV. Le virus est conservé et circule dans la forêt tropicale d'Afrique centrale à l'intérieur d'une population réservoir, probablement les chauves-souris frugivores. Dans des conditions environnementales précises, les espèces réservoirs et sensibles partageraient les mêmes aire de répartition et nourriture, favorisant la contamination des primates. L'homme se contamine auprès des cadavres de grands singes infectés par EBOV, ou auprès de gibier infecté et tué lors de parties de chasses. L'homme pourrait aussi se contaminer directement auprès de l'espèce réservoir. Une épidémie se déclare lorsque le cas index transmet le virus à sa famille et ses amis. L'infection est relayée et amplifiée par l'hôpital et peut se propager dans des villes et villages très éloignés du foyer primaire.

III. Les épidémies

III.1. Caractéristiques cliniques chez l'homme

En 1976, 2 épidémies d'une maladie inconnue se sont déclarées quasi simultanément dans le Sud du Soudan et au Nord de la RDC. Bien que les taux de mortalité diffèrent entre les 2 épidémies, les symptômes furent uniformes, à des degrés différents (Tableau I).

La maladie se déclare soudainement. Les premiers symptômes ressemblent à un état grippal, avec une forte fièvre, maux de têtes soudains douloureux et persistants. Simultanément, le patient est faible, ses articulations ainsi que ses muscles cervicaux et lombaires sont douloureux. Deux jours après le début des symptômes, les manifestations pulmonaires et gastro-intestinales apparaissent. Elles correspondent à une douleur dans la poitrine associée à une toux sèche, avec une sensation de balle dans la gorge, une diarrhée plus ou moins sanguinolente ainsi que des vomissements qui entraînent la déshydratation, des douleurs abdominales et une annorexie. Les symptômes hémorragiques sont le plus souvent discrets et apparaissent majoritairement chez les patients dont l'issue sera fatale (Tableau I). Ils se caractérisent par des méléna (évacuation par l'anus de sang noir, car en partie digéré, mélangé ou non aux selles), hématémèse (rejet de sang par la bouche lors du vomissement), épistaxis (communément appelé un saignement de nez), des saignements aux points d'injection, gingival, oral, vaginal, cutané et/ou conjonctival. Des manifestations cutanées ont été observées 5 ou 6 jour après le début des symptômes, il s'agit de rash et de desquamations localisés souvent sur le tronc, les avant-bras ou les cuisses. Certains patients présentent également des troubles nerveux traduits par des comportements bizarres, une grande léthargie ou une prostration. Le décès survient 7 à 8 jours après le début des symptômes [13, 17, 85, 86]. La période de convalescence dure 1 à 3 semaines. Cependant, le suivi de groupes de survivants pendant 6 mois montre qu'ils souffrent d'arthralgie, myalgie, douleurs abdominales, d'extrême fatigue et d'anorexie, qui se résolvent seuls au cours du temps [46].

En 1994 en Côte d'Ivoire, l'éthologue s'est contaminée lors de l'autopsie d'un chimpanzé par un virus de l'espèce CIEBOV. Ses symptômes correspondaient au tableau clinique présenté pour les espèces *Zaïre* et *Soudan*. Cependant, aucune manifestations hémorragiques ne fut observée [9, 11].

Le Tableau I résume les principaux symptômes et compare leurs fréquences d'apparition entre les patients survivants et les patients décédés. Ces fréquences sont obtenues grâce à un questionnaire rétrospectif des convalescents et des membres de la famille proche des patients décédés. D'autres manifestations cliniques ont été observées lors des différentes épidémies de FHVE.

Chez les femmes enceintes, l'avortement spontané est fréquent. Sur les 15 femmes enceintes hospitalisées à Kikwit, RDC, en 1995, une seule a mis au monde un prématuré mort-né. Une seule femme a survécu, mais elle a du subir un curetage suite à un avortement incomplet au 8è mois. Les autres femmes enceintes ont succombé à la FHVE avant leur délivrance. A Yambuku en 1976, 23% des femmes enceintes ont avorté spontanément. Les rares enfants nés à terme (1 à Kikwit et 10 à Yambuku) sont morts quelques jours après leur naissance. Ces nourrissons sont considérés comme cas probables contaminés par leur mère, bien qu'il n'y ait ni confirmation, ni certitude sur le mode de contamination (in utero, pendant l'accouchement, suite à l'allaitement) [17, 87].

Certains patients survivants souffraient de douleur oculaire, de photophobie, d'hyperlacrimation et d'une perte d'acuité visuelle progressive. Ces patients étaient atteints d'uvéites, inflammation de la membrane intermédiaire entre l'enveloppe externe de l'œil et la rétine [47]. Cette pathologie a également été observée chez un patient atteint par MARV en Afrique du Sud [78].

Enfin, une patiente de Kikwit transportée dans la capitale Kinshasa présenta un abcès péri-orbital douloureux accompagné d'une cécité de l'œil droit. Une biopsie de la paupière permit de mettre en évidence un mucormycosis, infection opportuniste fongique des sinus, du cerveau ou des poumons qui apparaît chez les personnes immunodéprimées ou diabétiques. Or cette patiente n'était pas diabétique, et le test de sérologie se révéla négatif pour le VIH. Deux ans après l'intervention et le traitement, les séquelles furent une cécité de l'œil droit, une ophtalmoplégie droite (anomalie de la motilité de l'œil) et une légère paralysie faciale [88].

Tableau I : Fréquences des symptômes entre des patients survivants et d'autres dont l'issue était fatale [86]

Symptômes	% patients décédés	% patients convalescents
Fièvre	100	100
Céphalées	100	40
Diarrhée	94	100
Vomissements / nausées	89 / 78	60 / 60
Saignements (points injection)	39	0
Méléna	56	0
Saignement gingival / oral	39	0
Douleurs abdominales	100	80
Arthralgie	22	20
Conjonctivite	89	40
Hématémèse	39	0
Épistaxis	6	0
Asthénie	100	100
Anorexie	94	100

III.2. Méthodes de diagnostic

Dans la zone d'endémie du virus Ebola, de nombreuses pathologies et fièvres hémorragiques virales partagent des symptômes communs. En effet, la Vallée du Rift, la fièvre de Crimée-Congo, Lassa, la fièvre jaune, la dysenterie, le paludisme, les fièvres hémorragique à virus Ebola et de Marburg présentent des manifestations cliniques similaires : accès de fièvre soudain, des céphalées, des douleurs musculaires et articulaires, des diarrhées pour certaines et des symptômes hémorragiques pour les cas sévères. Le diagnostic à partir des observations cliniques peut donc être faussé, c'est pourquoi une confirmation en laboratoire est indispensable afin de prendre les mesures de lutte adéquates.

a. L'examen direct du virus

La forme caractéristique des filovirus permet de visualiser directement les particules virales ou leurs antigènes grâce à l'utilisation de sérums polyclonaux spécifiques [89].

La microscopie électronique

Cette méthode consiste à observer le virus dans des échantillons sanguins, des surnageants de cultures cellulaires infectées par un sérum ou des coupes d'organes (peau, foie, rate, rein) découpés et fixés sur des lames. La différentiation entre les espèces Ebola ou Marburg est obtenue par microscopie immunoélectronique, en utilisant des anticorps spécifiques [90].

Les culots de cellules infectées, les sérums ou les organes sont fixés dans du glutaraldéhyde, puis subissent une contre-fixation dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1%. Les échantillons sont ensuite colorés par une solution d'acétate d'uranyl, déshydratés puis fixés dans une résine. Des sections ultrafines sont découpées, puis colorées par une solution d'acétate d'uranyl et de citrate de plomb. Les sections sont ensuite récoltées et examinées à 80kV [90-92].

La microscopie immunoélectronique utilise un protocole similaire. Les cellules ou organes sont d'abord fixés dans une solution de paraformaldéhyde-glutaraldéhyde (2%-0,1%) puis stérilisés par irradiation gamma et fixés dans une résine. Les sections ultrafines de résine sont immergées dans un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés de souris contre les protéines virales. Ces anticorps sont à leur tour reconnus par des anticorps anti-souris marqués par des billes d'or [90]. Les sections sont ensuite fixées et colorées.

Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence la présence de ZEBOV dans des coupes de foie et de rate [54, 61] ; de SEBOV dans des coupes de foie, rein, rate et poumons (Figure 6) [91] ; de REBOV dans des coupes de foie [54, 66] et de rate [61]. Elle a également permis de visualiser les particules virales extracellulaires [54] et les inclusions intracytoplasmiques. La microscopie électronique a été utilisée pour étudier l'assemblage des virions et leur sortie de la cellule [93, 94].

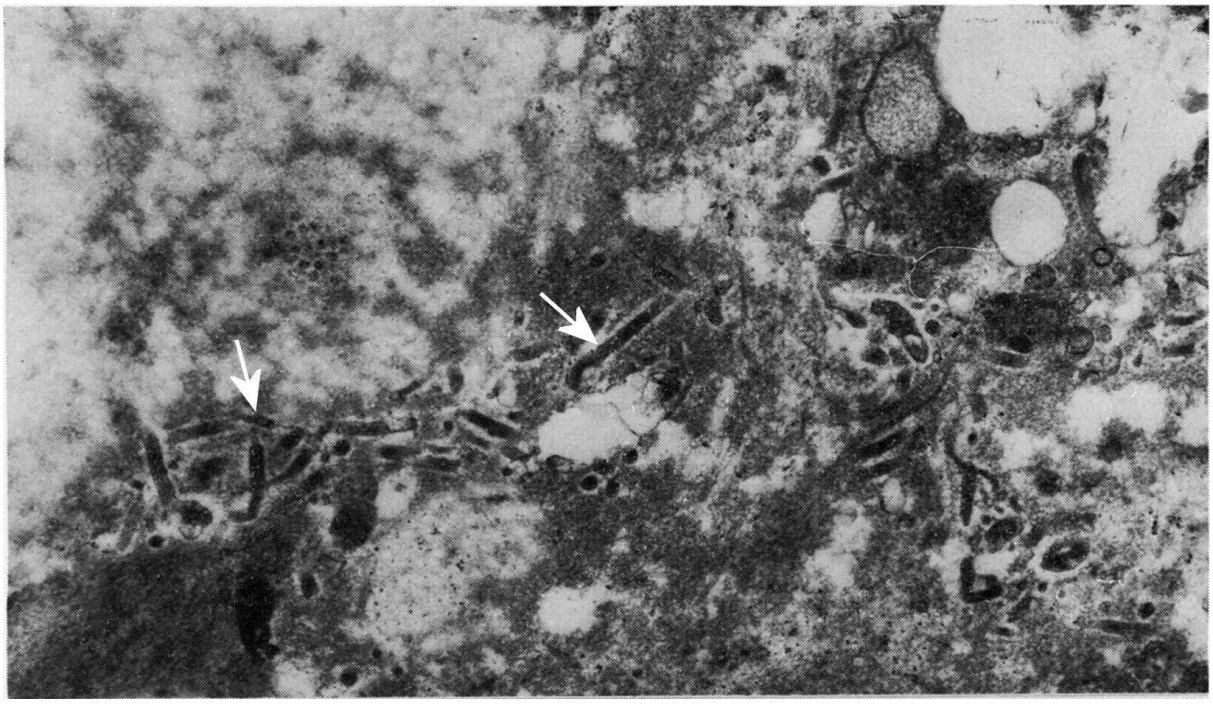


Figure 6 : Vue générale de particules d'*Ebolavirus*, espèce *Soudan*, dans une coupe de foie d'après Ellis et al. [91]. Les flèches indiquent les particules virales filamenteuses.

L'immunohistochimie

La méthodologie de cette technique ressemble à celle de la microscopie électronique [59]. Les prélèvements d'organes sont stockés dans de la paraffine. Avant utilisation, ils sont nettoyés de toute trace de paraffine, et réhydratés. Comme pour la microscopie électronique, l'échantillon est mis en présence d'anticorps polyclonaux dirigés contre EBOV. Cependant, le second jeu d'anticorps est marqué par la biotine, et la révélation utilise la streptavidine conjuguée à une phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline est détectée grâce au substrat naphtol/rouge, puis les sections sont contre-colorées par l'hématoxyline.

Cette technique fut utilisée pour détecter la présence de virus dans des prélèvements post-mortem de peau lors de l'épidémie de Kikwit, RDC (Figure 7) [59]. Elle a également servi à diagnostiquer l'infection par EBOV du chimpanzé autopsié par l'éthologue suisse dans la forêt de Taï en Côte d'Ivoire [10, 95] et à identifier l'espèce *Reston* responsable des épizooties survenues aux USA en 1990 [1, 66].

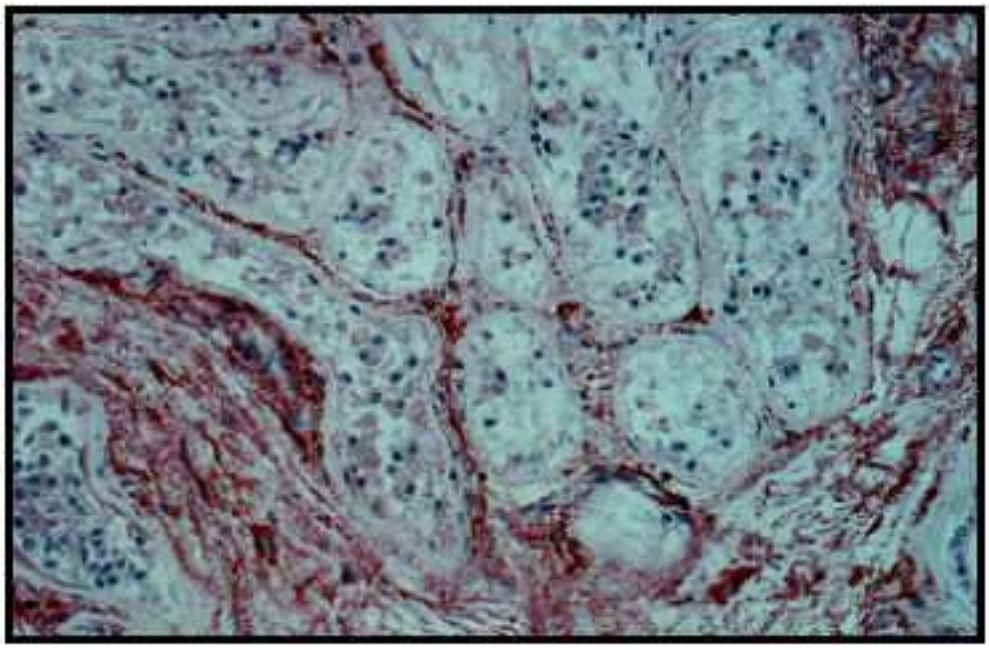


Figure 7 : Visualisation par immunohistochimie des particules d'EBOV sur coupe de peau (grossissement x50) d'après Zaki et al. [59]. De grandes quantités d'antigène viral peuvent être observées à proximité des glandes sudoripares.

Intérêt de ces méthodes

Ces techniques sont très sensibles. Leur efficacité a été prouvée par la concordance des résultats avec ceux obtenus par les techniques sérologiques lors de l'épidémie de Kikwit, RDC. De plus, l'immunohistochimie a permis de montrer la présence d'antigènes viraux dans un prélèvement de peau d'un patient convalescent, dont les tests sérologiques étaient négatifs. Ce résultat indique que le virus persisterait plus longtemps dans les tissus que dans la circulation sanguine [59]. Enfin, la méthode de prélèvement en elle-même (avec une pince) est plus sécurisante, et l'échantillon est inactivé est immédiatement inactivé par la fixation par la formaline.

Cependant, ces techniques ne sont pas adaptées au diagnostic de routine lors d'une épidémie. En effet, elles nécessitent un matériel lourd inadapté aux conditions de terrain et l'établissement du diagnostic est trop long.

b. Isolement viral

L'isolement viral est la technique de diagnostic de référence qui a permis la première identification des virus Ebola et de Marburg.

Méthode

L'isolement viral consiste à infecter des lignées cellulaires permissives ou des animaux sensibles par des sérums suspects ou des suspensions de broyats d'organes. L'identification du virus est ensuite assurée par une technique immunologique spécifique. Les premiers isolements en 1976 ont été effectués sur lignées de cellules de rein de singes verts (cellules Vero) et par infection de cochons d'Inde [13]. Les animaux susceptibles à EBOV sont les souriceaux âgés de 1 à 3 jours et les cochons d'Inde. La première inoculation se réalise souvent avec un sérum infecté par voie intrapéritonéale. Plusieurs passages successifs par inoculations de broyat de foie issu du passage précédent sont nécessaires avant que l'animal ne développe des symptômes [96]. La mortalité et la présence de symptômes chez le souriceau ou le cochon d'Inde atteste de la présence d'un agent pathogène dans le sérum humain testé.

Le virus est isolé dans des flasques de $25cm^3$. Le sérum infecté ou la suspension de broyat d'organe dilués sont déposés sur un tapis de cellules confluentes. Lorsque les effets cytopathogènes apparaissent, le surnageant est collecté pour confirmation de l'isolement par microscopie électronique, immunohistochimie, capture d'antigène ou RT-PCR. Les effets cytopathogènes sont caractérisés entre le $3^{è}$ et $4^{è}$ jour par un « lâcher de ballons », puis par la formation de plages de lyse de taille croissante dans le tapis cellulaire dès le $7^{è}$ jour après inoculation [1].

Les espèces *Zaïre, Côte d'Ivoire,* et de MARV ont été isolées sur cellules Vero. L'isolement des espèces *Reston* et *Soudan* s'avère plus difficile sur cette lignée cellulaire et plusieurs passages en aveugle sont nécessaires [97]. Les cellules de rein de macaques rhésus fœtal, MA-104, sont plus sensibles et plus appropriées à ces 2 espèces. D'autres lignées cellulaires telles que les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) [98] ou les monocytes/macrophages humains différenciés sont également sensibles à EBOV.

Quantification des charges virales

✓ *Charge virale infectieuse*

La quantification du virus a d'abord été déterminée en fonction de l'infectivité de l'échantillon sur un modèle animal [99]. Cependant, cette méthode est peu reproductible en raison de réactions des animaux à l'infection trop disparates. Deux techniques semblables ont donc été développées sur lignées cellulaires pour quantifier les virus infectieux. Il s'agit du test de plages et de celui de zones de fluorescence.

Le test de plages consiste à infecter des cellules Vero, non pas en flasques, mais en puits de 6 ou 12 puits. Au 6è jour de culture, les cellules sont recouvertes d'une couche d'agarose contenant du rouge neutre. Dès le lendemain, des plages blanches sont visibles à l'œil nu aux endroits où le virus s'est répliqué. Le titre viral est alors proportionnel au nombre de plages de 2 à 5 mm de diamètre, il est exprimé en $\log_{10}$ d'unités formant plages (PFU) [100]. Cette méthode est peu sensible, des sérums de patients testés positifs par d'autres techniques dont l'isolement viral peuvent ne former aucune plage.

Le test des zones de fluorescence est basé sur le même principe, mais les zones de réplication sont détectées par un sérum de lapin dirigé contre EBOV, lui-même reconnu par des anticorps conjugués à la fluorescéine [101]. Le titre est exprimé en unité de foyer fluorescent (FFU)/ml. Cette technique est plus sensible que le test de plages, probablement grâce à l'identification microscopique des zones de fluorescence.

✓ *Charge virale totale*

Le développement de la RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne) quantitative ou en temps réel a ouvert un nouvel axe d'études pour le diagnostic rapide. Cette technique consiste à amplifier une séquence d'ARN viral et déterminer simultanément la quantité de copies d'ADN d'origine virale présentes dans le milieu de réaction.

La première mise au point de cette technique pour détecter EBOV a été réalisée avec des sérums de patients infectés. En moins de 6h, la RT-PCR en temps réel a permis de mesurer le nombre de copies d'ARN viral chez un patient malade et chez un convalescent, sans aucun faux positif. Le gène de la polymérase était amplifié et détecté grâce au

SybrGreen, fluorophore s'intercalant dans l'ADN [102]. L'éventualité d'une amplification non-spécifique doit tout de même être écartée en faisant migrer les produits de PCR sur gel d'agarose et en les séquençant.

Lors de l'épidémie de Gulu, Ouganda, en 2000, la détection par sonde Taqman a été développée. La sonde, couplée à un fluorophore, est complémentaire à une séquence de l'ADN à mesurer, ce qui permet à la technique d'être beaucoup plus spécifique [103].

Enfin, sur la base de la RT-PCR en temps réel, a été développée une technique de transcription inverse suivie d'une amplification isotherme (RT-loop mediated isothermal amplification, RT-LAMP). Cette méthode de détection rapide cible la région trailer du génome viral. Elle permet de détecter un nombre faible de copies en un temps très court (10^4 FFU détectées en 20 minutes). De plus, cette technique ne nécessite pas d'instrument sophistiqué, elle peut donc être utilisée facilement sur le terrain [104].

Cette technique est utilisée comme diagnostic rapide lors d'une épidémie, pour comparer les charges virales entre les patients convalescents et ceux qui décèdent [102, 105], ou pour tester des composants antiviraux [106].

Intérêt de ces méthodes

L'isolement viral reste la méthode de diagnostic de référence. Cependant, cette technique n'est pas appropriée pour un diagnostic en routine car les délais sont trop longs et elle nécessite un laboratoire de biosécurité de niveau maximal de type 4. De plus, la comparaison des différentes techniques de diagnostic lors de l'épidémie de Kikwit, RDC, montre que l'isolement du virus n'est possible que pendant la phase symptomatique, au plus jusqu'à 2 semaines après leur apparition [101]. L'isolement est la première étape obligatoire pour les études de caractérisation morphologique, structurale et moléculaire des virus.

La quantification de la charge virale totale, bien que hautement spécifique et rapide, utilise des amorces et des sondes spécifiques d'une espèce et/ou souche virale. Pour rester à jour, cette technique nécessite de dessiner et utiliser de nouvelles sondes et amorces au fur et à mesure des caractérisations de souches virales [102]. Bien que cette technique soit la plus rapide et la plus spécifique méthode de diagnostic à ce jour, les conditions idéales de manipulations ne sont pas toujours obtenues dans un laboratoire de terrain, et les

villages dans lesquels sévissent les épidémies de FHVE n'ont pas toujours d'électricité ou de générateur pour faire fonctionner l'appareil et son ordinateur.

c. Détection de la présence virale

Les antigènes viraux peuvent être détectés par immunofluorescence, capturés par ELISA ou le matériel génétique viral peut être amplifié par RT-PCR.

- **Immunofluorescence**

Les techniques d'immunofluorescence classique permettent de détecter efficacement les particules virales dans des suspensions de foie, rate ou reins [89]. La révélation y est assurée par la conjugaison de l'anticorps final avec la fluorescéine. La détection par immunohistochimie, la deuxième technique d'immunofluorescence, a été décrite précédemment.

- **Capture d'antigènes par ELISA**

La technique de reconnaissance des antigènes Ebola a été mise au point lors des épizooties de 1990 [107]. L'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) est basée sur la double reconnaissance des antigènes viraux par un mélange d'anticorps monoclonaux de souris fixés à la plaque et par un sérum de lapin anti-EBO.

Cette technique a depuis été utilisée pour le diagnostic de toutes les épidémies survenues en Afrique.

Récemment, la spécificité de cette technique a été améliorée par le développement d'anticorps poly- et monoclonaux dirigés contre les protéines d'enveloppe (GP) des 3 espèces *Soudan, Zaïre* et *Reston* [108] ainsi que contre la protéine de matrice (VP40) des 4 espèces virales [109].

- **RT-PCR**

La caractérisation des différentes souches virales responsables des épidémies de FHVE a permis de développer la technique de transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Cette technique autorise la détection rapide d'ARN viral, les

séquences obtenues sont ensuite comparées avec les séquences virales connues. L'ARN viral peut être obtenu à partir de sang ou de tissus prélevés en période de symptômes ou par nécropsie [110]. En effet, cette technique permet de détecter l'ARN viral 24 à 48h plus tôt que les autres méthodes de diagnostic, et jusqu'à 3 semaines après la fin des symptômes [111].

La RT-PCR permet d'amplifier le gène codant pour la polymérase (L), qui est le plus stable du génome, et celui codant pour la nucléoprotéine (NP) qui est exprimé en abondance [105].

Récemment, la technique a été améliorée en fonction de la diversité des filovirus. La méthode de PCR consensus développée met en jeu un mélange d'amorces spécifiques à chaque espèce virale. La nouveauté réside dans l'automatisation de l'analyse des séquences qui repose sur une base de données en constante évolution [112].

Intérêt de ces méthodes

La capture d'antigène constitue le test de référence. La comparaison avec d'autres méthodes de diagnostic lors de l'épidémie de Kikwit montre que ce test est hautement sensible et spécifique pour les patients en phase symptomatique [101]. Ces méthodes sont très rapides et donnent en quelques heures des résultats fiables dès les premiers jours de symptômes [107]. L'inactivation des échantillons testés par irradiation ou par dodécylsulfate de sodium permet de l'utiliser en l'absence de laboratoire spécialisé.

La RT-PCR est une technique rapide, très sensible et hautement spécifique. Cependant, les molécules d'ARN peuvent être détériorées par de mauvaises conditions de stockage pendant le transport du lieu d'épidémie au laboratoire et/ou si l'extraction n'est pas opérée correctement. La détection par RT-PCR vient donc en complément de la capture d'antigènes et de l'isolement viral [110].

d. Diagnostic sérologique

- **Immunofluorescence Indirecte (IFI)**

Cette technique consiste à faire réagir les sérums à tester sur un broyat de cellules Vero infectées fixé sur des lames. L'interaction est révélée par des anticorps spécifiques dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) ou les IgM et conjugués à la fluorescéine [113, 114].

L'immunofluorescence indirecte est longtemps restée la seule méthode pour le diagnostic et le dosage des anticorps. Elle fut utilisée lors des épidémies de 1976 et 1979 et lors des enquêtes de séroprévalence [38, 40, 115]. Cependant, cette technique possède une faible spécificité et a causé de nombreux résultats faux-positifs lors des enquêtes [39].

- **Détection d'anticorps par ELISA**

✓ *Détection des IgM*

Les IgM sont détectées selon le principe ELISA. L'IgM du sérum à tester est d'abord capturée par un anticorps anti-μ fixé au puits, puis elle est incubée en présence de surnageant de culture de cellules Vero infectées. L'antigène capturé est à son tour reconnu par un sérum polyclonal anti-EBO, lui-même reconnu par des anticorps monoclonaux conjugués à la peroxydase. Le résultat est obtenu par lecture de l'absorbance du composé coloré produit [116].

Cette technique a été testée par l'infection expérimentale de singes. L'étude a montré que les IgM apparaissent dès le 6^{è} jour, atteignent un pic pendant 3 semaines, puis diminuent pour devenir indétectables au bout de 3 mois [116]. Par contre, chez les humains, les IgM apparaissent dès le 2^{è} ou 4^{è} jours après le début des symptômes et disparaissent 2 mois après la fin des symptômes. La faible persistance des IgM empêche leur détection dans le cadre d'études rétrospectives ou de séroprévalence. De plus, de nombreux patients décèdent sans développer de réponse anticorps [101]. La détection des IgM serait donc plus adaptée au diagnostic rapide en période d'épidémie ou pour la confirmation de patients survivants en période de convalescence.

✓ *Détection des IgG*

La détection des IgG est elle-aussi basée sur le principe ELISA, mais la méthodologie diffère de la détection des IgM. Le sérum à tester reconnaît l'antigène viral, généralement un surnageant de culture ou un broyat de cellules Vero infectées, et préalablement fixé aux puits. L'IgG est ensuite reconnu par un sérum polyclonal de souris anti-γ conjugué à la peroxydase. Le résultat est lu par spectrophotométrie [116, 117].

Les IgG sont détectées à partir de 10-12 jours chez les macaques infectés expérimentalement. Cependant, chez l'Homme, les IgG apparaissent vers le 3è jour et persistent au moins pendant 2 ans [101]. Ainsi, les sérums de 2 survivants de l'épidémie de 1976 en RDC présentaient plus de 10 ans après des taux d'IgG équivalents à ceux des singes expérimentaux convalescents. Les IgG étant rarement détectées chez les patients qui décèdent, cette technique ne peut pas être appliquée au diagnostic en cours d'épidémie. La longue persistance des IgG en fait une méthode de prédilection pour les études rétrospectives ou les enquêtes de séroprévalence.

e. Méthodes diverses

D'autres techniques ont été développées dans le but d'obtenir un diagnostic toujours plus rapide, sensible et spécifique.

Le Western Blot permet de reconnaître des protéines virales par des anticorps. Cette technique, longue à appliquer, n'a jamais été utilisée pour le diagnostic. Elle peut cependant être utilisée pour confirmation la spécificité des anticorps détectés par les méthodes ELISA [118].

La radioimmunoprécipitation (RIPA) consiste à incuber les sérums avec des antigènes, puis dans une solution contenant la protéine A marquée à l'iode 125. Le résultat est obtenu par comptage des rayons γ émis [119]. Cette méthode, bien que sensible, spécifique et n'utilisant que peu de sérum, n'est pas adaptée aux conditions de terrain. Elle n'est pratiquement jamais utilisée pour le diagnostic.

III.3. Contrôle, prévention et traitement

a. Prévention : mesures sanitaires, vaccin

Mesures sanitaires

En l'absence de traitement et de vaccin, les mesures d'hygiène générale représentent la seule arme des personnels de santé pour lutter contre la progression d'une épidémie.

Dans un premier temps, un cordon sanitaire est mis en place autour des foyers épidémiques afin de limiter au maximum la contamination des personnes extérieures au cours d'échanges entre les populations touchées des foyers épidémiques primaires et celles des zones extérieures saines [20, 120].

Dans un second temps, la stratégie de prévention est basée sur le diagnostic rapide des cas et l'isolement des malades afin de briser les chaînes de transmission [121].

Une fois le diagnostic clinique établi, les cas suspects sont isolés et reçoivent dans la mesure du possible des traitements palliatifs prophylactiques et curatifs [20, 122]. Le traitement des symptômes inclus du paracétamol, des antiémétiques, des antispasmodiques et des antipsychotiques. En l'absence de confirmation en laboratoire, les patients reçoivent également des antibiotiques et un traitement antipaludéen [122].

Le personnel de santé est formé sur le terrain pour l'utilisation correcte des équipements de protection. Les soins aux malades se donnent équipé de blouse, gants, masque et sur-chaussures jetables. Le matériel médical, les vêtements, déchets et locaux souillés sont systématiquement désinfectés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2% [20].

Enfin, un réseau de surveillance des individus ayant eu un contact avec un malade et de l'apparition de nouveaux cas est mis en place par les médecins présents sur place assistés par les volontaires de la Croix-Rouge [29, 121].

Malheureusement, dans la zone d'endémie du virus Ebola où les villages sont souvent enclavés, les structures sanitaires sont souvent peu fonctionnelles, les équipements de protection et le personnel soignant manquent.

Vaccins

Le génome d'EBOV étant très stable au fil du temps et des chaînes de transmission [58, 123], un moyen de vaccination est envisageable. Plusieurs vecteurs et méthodes ont été testés sur le modèle murin avant d'être testés sur le modèle primate, qui mime mieux l'infection chez l'homme.

✓ *Expérimentations sur le modèle rongeur*

Le virus Ebola est mortel pour les souris nouvellement nées, et non pour les adultes. Les souches d'*Ebolavirus zaïre* peuvent être adaptées par passages successifs sur des souris de plus en plus âgées, jusqu'à provoquer une infection létale chez des souris adultes [124]. Le même processus d'adaptation de souches par passage successif est également utilisé chez le cochon d'Inde. Grâce à ces variants adaptés à ces animaux, diverses prophylaxies ou vaccins peuvent être étudiés.

Une première étude a utilisé des souris infectées pour tester le transfert passif d'anticorps. Les souris survécurent et développèrent de forts taux d'immunoglobuline G (IgG). Leur sérum transfusé à des souris naïves protégeait ces dernières d'un challenge contre une dose létale d'EBOV [125]. Cependant, le transfert passif de sérum ne protégeait pas les souris naïves lorsque le premier groupe avait été immunisé par un virus recombiné avec les protéines virales VP24, VP40 et VP30 [126]. De même, cette approche vaccinale n'aboutit pas chez le modèle primate [127].

Les équipes de chercheurs se sont ensuite penchées sur une technique d'immunisation génétique appliquée avec succès pour d'autres agents pathogènes [128-130]. Cette technique consiste à incorporer des gènes viraux dans un vecteur d'expression. Une fois injecté, l'hôte va exprimer ces protéines, ce qui induira une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Des vecteurs d'expression plasmidiques contenant les gènes viraux de la nucléoprotéine (NP) et des glycoprotéines (GP) soluble et membranaire ont été injectés à des souris. Les animaux immunisés présentaient une réponse anticorps ainsi que des cellules T cytotoxiques activées, ils ont tous survécu à un challenge létal, jusqu'à 4 mois après la première injection [131]. Les vecteurs d'expression codant les GP et la NP confèrent donc une protection. Par contre, les vecteurs codant les protéines virales VP24, VP30, VP35 et VP40 ne protègent pas efficacement les souris. Seule la souche de souris

C57BL/6 a pu être protégée contre un challenge létal par une immunisation avec la VP35. Les autres protéines virales pouvaient induire une réponse immune, mais pas protéger les souris du challenge [126].

La coexpression dans des cellules de mammifères de la GP et de la protéine de matrice (VP40) d'EBOV résulte en la production et sortie de particules qui ressemblent aux virions infectieux (VLP, virus-like particles). Ces particules induisent la maturation *in vitro* des cellules dendritiques dérivées de moëlle osseuse et les activent. De plus, la vaccination de souris avec les VLP activait les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$, et protégeait 100% des souris contre une inoculation létale d'EBOV [132].

L'étude des effets de mutations dans le gène de la GP montre que les sites de N-glycosylation de la GP2 sont importants pour l'antigénicité et le pouvoir immunogène. Au contraire, la mutation des sites de N-glycosylation de la GP1 pourrait démasquer des épitopes et augmenterait le pouvoir immunogène du mutant [133].

L'immunisation par un vecteur adénoviral a prouvé son efficacité sur les modèles animaux. Cependant, ces vaccins ne sont dirigés que contre l'espèce *Zaïre*, dont le taux de mortalité est le plus élevé, laissant de côté l'espèce *Soudan* dont les épidémies sont tout aussi dévastatrices. Un vaccin adénoviral bivalent a été testé sur des souris. Il contient les GP des espèces *Soudan* et *Zaïre* dans un vecteur adénoviral. L'administration de ce vaccin à des souris induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire, et les protège contre l'infection par une très forte dose du virus de l'espèce *Zaïre* adapté aux souris [134].

Malheureusement, certaines de ces stratégies vaccinales, efficaces chez la souris ou le cochon d'Inde, ne protègent pas les macaques cynomolgus ou rhésus [135].

✓ *Expérimentations sur le modèle primate*

Bien que le modèle primate soit très proche de l'humain, l'entretien des animaux nécessite des infrastructures spécifiques, et il est parfois difficile d'avoir un nombre d'individus suffisant pour des résultats significatifs.

L'utilisation de vecteurs non viraux pour l'expression de protéines virales permet d'éviter une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur. En effet, le facteur limitant des vaccins à base d'adénovirus ou de virus de la vaccine est l'exposition possible d'une part

importante de la population à ces virus naturels ou utilisés pour une autre vaccination. L'existence d'une immunité contre le vecteur diminuerait l'efficacité du vaccin [136].

Cependant, les vecteurs viraux sont nécessaires pour obtenir une réponse immune importante et durable [137]. Les études se concentrent donc sur un vecteur pour lequel la population aurait peu d'immunité naturelle, ainsi que sur une planification des immunisations qui produirait la meilleure réponse. De ce fait, plusieurs vaccins à base de plasmides, d'adénovirus, de paramyxovirus, d'alphavirus ou du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ont été testés, seuls ou en combinaison avec un plasmide portant l'ADN viral, suite à une ou plusieurs injections.

L'« immunisation génétique » a été utilisée en association avec un vecteur adénoviral dont la réplication est déficiente et qui exprime des protéines d'EBOV. Ce vecteur sert de rappel afin d'améliorer la réponse immune. Des macaques cynomolgus ont été immunisés par 3 injections, séparées par 4 semaines, d'un plasmide codant pour la nucléoprotéine et les GP des 3 espèces (*Soudan*, *Zaïre* et *Côte d'Ivoire*). Après environ 3 mois (16 semaines), ces animaux subissaient une immunisation de rappel avec un adénovirus recombinant qui exprimait seulement la GP de l'espèce *Zaïre*. Chez les animaux immunisés, une réponse en anticorps spécifique était détectée 4 semaines après la dernière injection du plasmide. Les titres en anticorps ont augmenté de 10 à 20 fois après l'injection de rappel adénoviral. La réponse immunitaire induite était également cellulaire, avec une stimulation des cellules T. Enfin, le challenge par une dose létale de la souche Mayinga (ZEBOV) a démontré la protection conférée par cette technique puisque aucune augmentation du titre viral ni aucun symptôme n'ont été observés chez les animaux immunisés [138].

Cependant, cette stratégie vaccinale nécessite plus de 6 mois pour compléter l'immunisation. Afin de réduire le temps d'immunisation, des macaques ont reçu une injection d'adénovirus codant pour la GP et la nucléoprotéine suivie par un rappel 9 semaines plus tard. Une semaine après le rappel, les animaux ont reçu soit une faible soit une forte dose d'us isolat de l'épidémie de 1995. Tous les animaux immunisés ont survécu au challenge, quelle que soit la dose reçue. De plus, les réponses des cellules T $CD8^+$ ainsi que celle des anticorps dirigés contre EBOV ont significativement augmenté chez les animaux vaccinés. La comparaison des réponses immunes observées après la première et la deuxième immunisation suggère que la première injection serait suffisante. Pour cela, des macaques ont été immunisés une seule fois par une injection d'adénovirus. Quatre

semaines plus tard, ils ont reçu une dose létale d'EBOV. Tous les animaux immunisés ont survécu à l'infection, que la dose reçue soit forte ou faible. Dans ce cas de vaccination, la réponse des cellules T $CD8^+$ était similaire à celle de la vaccination « prime-boost ». Par contre, la réponse des cellules T $CD4^+$, non détectable avant le challenge, augmentait après l'infection. La stratégie de vaccination « prime-boost » confère une meilleure protection. Si la réponse est durable, elle pourrait être utilisée pour les vaccins préventifs, chez le personnel de laboratoire ou hospitalier par exemple. D'autre part, l'administration d'un seul vaccin adénoviral, plus rapide, aurait une utilité lors des épidémies [137].

Le vaccin à base d'adénovirus codant la GP et la NP procure une protection spécifique. Cependant, la GP a un effet cytopathique sur les cellules *in vitro*, et plusieurs variants de la GP ont été identifiés. La GP a été modifiée afin d'éliminer les effets cytopathiques tout en gardant la protection spécifique. La délétion de la partie transmembranaire de la GP élimine les effets cytopathiques sur les cellules HEK293 transfectées, mais le vaccin à base de GP délétée est moins efficace pour protéger des macaques d'une dose létale d'EBOV. Le variant E71D, muté dans une région qui lierait le récepteur [139], procure une protection spécifique aux macaques vaccinés avec une cytopathie réduite *in vitro*. De plus, l'élimination de la NP et l'administration de doses réduites ne diminue pas son efficacité [140].

Suite au développement prometteur d'un vaccin basé sur le virus atténué de la stomatite vésiculaire (VSV) recombiné avec une protéine du virus Lassa [141], une étude a testé ce vecteur pour les virus Ebola et de Marburg. Le vaccin utilisait un VSV recombiné à la GP du virus Ebola ou de Marburg. La glycoprotéine filovirale synthétisée et maturée par le VSV recombinant est identique à la GP produite par EBOV [142]. Une simple injection intramusculaire du vaccin à base de VSV permettait d'induire une réponse cellulaire et humorale chez les singes vaccinés. Tous les animaux immunisés ont survécu au challenge, aucune trace de réplication du virus n'a été détectée. De plus, aucun rejet du vecteur n'a été observé [143].

De même, un vaccin basé sur le virus de l'encéphalite équine, souche Venezuela (VEE) a été testé. Le système du vecteur réplicon VEE consiste en un réplicon vecteur d'expression à ARN codant le gène contre lequel se fera l'immunisation, et un ARN bipartite assistant l'empaquetage, produits *in vitro* par des plasmides. Ces réplicons sont encapsidés dans des particules ressemblant aux VEE grâce aux capsides et protéines d'enveloppe virales. Durant la vaccination, le vecteur VEE délivre, amplifie et exprime *in vivo* le gène vaccinal

[144]. Une réponse immune à 2 antigènes différents a été détectée suite à plusieurs inoculations de ce vecteur VEE. Le potentiel immunogène et protecteur d'une immunisation par un réplicon VEE codant pour une protéine du virus Lassa a été mis en évidence. Ainsi, un réplicon combinant l'expression de gènes des virus Lassa et Ebola a été évalué. Des réponses anticorps ont été détectées pour les 2 gènes codés par le vecteur réplicon, avec une réponse apparente plus forte pour la GP d'EBOV. Cette étude montre qu'une protection contre une dose létale d'EBOV ou du virus de Lassa peut être apportée par un vecteur co-exprimant plusieurs antigènes aussi bien que par plusieurs vecteurs codant un seul antigène [145].

L'utilisation d'un vecteur paramyxovirus a été étudiée à la fois chez les cochons d'Inde puis sur des singes. Le vaccin, basé sur le virus parainfluenza humain de type 3 (HPIV3) recombiné avec la GP seule ou avec la NP d'EBOV, a été administré par inoculation intranasale à des cochons d'Inde. Cette étude a montré que la réponse en anticorps dirigés contre EBOV est 100 fois supérieure à la réponse en anticorps dirigés contre le vecteur HPIV3. De plus, les animaux immunisés ont tous survécu à l'injection intrapéritonéale d'EBOV, sans qu'aucun signe de maladie, aucune virémie ou antigène ne soit détecté dans le sang, ni qu'aucun signe d'infection dans les organes cibles (foie, rate, poumons) ne soit observé [146].

L'efficacité d'une immunisation par un vecteur viral vivant et recombiné a ensuite été étudiée sur le modèle primate. Le vecteur paramyxovirus HPIV3 recombiné avec la GP filovirale seule ou en combinaison avec la NP ou associé à une cytokine stimulant les granocytes-macrophages a été administré par voie respiratoire à des macaques rhésus. Une simple immunisation par un vecteur exprimant la GP était moyennement immunogène et protégeait 88% des animaux contre une infection par EBOV. L'administration de 2 doses s'est révélée être hautement immunogène, la totalité des animaux vaccinés a survécu à une dose mortelle d'EBOV, sans aucun symptôme [147].

L'immunisation par un plasmide recombinant a été étudiée dans la phase I sur les humains. Le vaccin contient 3 plasmides en concentration égales qui codent chacun pour les GP des espèces *Zaïre* et *Soudan*, et pour la NP. Des adultes sains, de 18 à 44 ans, ont reçu 3 injections de ce vaccin en double aveugle, aléatoire, en fonction de la dose. Le vaccin a été bien toléré. Les réponses en anticorps spécifiques et des cellules T $CD4^+$ ont

été observées chez tous les sujets vaccinés. La réponse des cellules T $CD8^+$ a été détectée sur 6 des 20 sujets vaccinés [148].

b. Traitement

Chimiothérapie

✓ *La ribavirine*

Les résultats *in vitro* et lors d'expérimentations animales montrent que la ribavirine est capable d'inhiber des virus de fièvre hémorragique. La ribavirine est un nucléoside triazole synthétisé pour la première fois en 1970. C'est un analogue des pyrimidines de part sa structure similaire à celle de la guanosine. La ribavirine est efficace en prophylaxie ou en traitement contre, entre autres, des arénavirus, le virus de la fièvre de Lassa, de la Vallée du Rift, le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo. Cependant, EBOV n'est pas inhibé *in vitro* par la ribavirine. De même, l'administration de ribavirine en tant que prophylaxie ne change pas le taux de survivants chez des cobayes infectés par les espèces *Zaïre* ou *Soudan*, bien que le temps moyen avant le décès soit prolongé dans le cas d'une infection par l'espèce *Soudan*. La ribavirine n'a également aucun effet sur le cours de la maladie chez des macaques cynomolgus infectés par *Ebolavirus zaïre* [149].

✓ *Les inhibiteurs de la SAH*

La S-adenosylhomocystéine (SAH) hydrolase (EC 3.3.1.1) est une enzyme cellulaire impliquée dans le transfert d'un groupe méthyle sur le résidu guanosine de la coiffe 5' de l'ARNm viral. Cette étape est indispensable à l'initiation de la réplication du virus. Plusieurs inhibiteurs de la SAH ont été testés en fonction de leur pouvoir inhibiteur et de leur toxicité. Sur les 9 candidats, seule la 3-déazaadénosine carbocyclique (Ca-c^3 Ado) conférait une protection significative (90% de survie) lorsque le traitement est commencé au plus tard 2 jours après l'infection. Lorsque le traitement est initié 3 jours après l'infection, le taux de survie chute à 40%. Toutefois, l'emploi et l'efficacité de cet inhibiteur restent conditionnés par un protocole strict (une dose supérieure à 0,7mg/kg toutes les 8 heures) [150].

✓ *Le rNAPc2*

Un des symptômes de la FHVE est une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Dans le cas d'une infection par EBOV, les facteurs de la coagulation sont surexprimés par les monocytes et macrophages. [151].

La protéine recombinante c2 de nématode (rNAPc2) est une protéine anticoagulante de 85 résidus qui inhibe directement le complexe facteur VIIa/facteur tissulaire [152]. Son potentiel antithrombique a été démontré lors de la phase II des essais cliniques sur des patients ayant subi une angioplastie coronaire [153]. Afin de tester si l'inhibition de la coagulation a un impact sur le devenir de la maladie, des macaques ont été traités par des injections de rNAPc2 une fois par jour. Le traitement débutait soit 10 minutes soit 24h après l'infection par EBOV et a continué pendant 14 et 8 jours. Les 2 traitements permettaient de prolonger le temps de vie des animaux de quelques jours, associé à une atténuation de la réponse proinflammatoire, une réduction de la coagulation et de la fibrinolyse [154].

✓ *Les PMO*

Les oligomères antisens morpholino-phosphorodiamidate (PMO) sont des agents antisens qui se fixent à l'ARN messager (ARNm) viral pour former des complexes bloquant la transcription et la réplication virale, le temps que la réponse immunitaire se mette en place [155]. Le traitement PMO antisens, dont l'efficacité a été prouvée *in vitro* [156], a été testé *in vivo* sur le modèle murin puis primate, en prophylaxie avant ou en traitement après infection. Une dose de PMO antisens dirigés contre 3 sites différents de l'ARNm administrée 24h post-exposition a permis de protéger efficacement des souris et cochons d'Inde.

Porté sur le modèle primate, l'administration de PMO antisens complémentaires aux ARNm des gènes VP35, VP24 et L s'est montré efficace à protéger les macaques rhésus 2 jours avant jusqu'à 9 jours après l'infection [157].

Transfert passif de sérum

Le transfert passif d'immunoglobuline G (IgG) d'origine équine a été étudié sur les modèles de souris, cochons d'Inde et de macaques cynomolgus. Les souris n'étaient pas entièrement protégées quand le traitement commençait le jour de l'infection. Au contraire, les cochons d'Inde ont été protégés lorsque le traitement était commencé avant l'apparition d'une virémie. Enfin, les singes traités par une dose d'IgG le jour de l'infection ont tous

succombé, mais avec un début des symptômes et l'apparition de la virémie retardés [158]. L'administration d'une seconde dose d'IgG au cinquième jour post-infection n'a pas eu d'effets bénéfiques. L'administration d'interféron-α2b aboutissait aux mêmes observations sur les macaques, à savoir retarder l'apparition de la virémie et la mort [159]. Chez le Babouin, l'inoculation de sérum jusqu'à 1h30 après l'infection empêche le développement de la virémie. La différence observée entre les modèles babouin et macaque pourrait être causée soit par des différences spécifiques aux espèces utilisées soit par la dose injectée pour le challenge qui différait entre les deux études. Chez les babouins, les anticorps atteignent leur concentration maximale dans la circulation sanguine plus rapidement que le virus n'infecte les cellules cibles [160].

Lors de l'épidémie de 1995 à Kikwit, RDC, 8 patients ont été transfusés avec du sang de donneurs convalescents. Le sang transfusé contenait des anticorps dirigés contre EBOV, mais aucun antigène n'a été détecté. Sur les 8 patients, un seul est décédé. Il doit cependant être noté que les patients transfusés étaient mieux soignés que les patients du début de l'épidémie. Ils ont reçu des injections de glucose et d'électrolytes, un traitement à base d'antibiotiques et d'antipaludéens ainsi qu'un supplément alimentaire. La raison de ce plus faible taux de mortalité reste à expliquer. En effet, 4 des 5 patients de Mosango et Kikwit qui présentaient des saignements et ont été transfusés sont morts des suites de la maladie bien qu'ils furent transfusés avec du sérum de patients convalescents [161]. Par ailleurs, en 1976, une nonne belge était décédée après avoir reçu plusieurs transfusions de sang de patient convalescent [162].

- **Anticorps neutralisants**

Afin de tester la capacité des anticorps à protéger contre EBOV, des anticorps monoclonaux ont été générés à partir de banques d'ADN et leur efficacité a été étudiée. Les anticorps dirigés contre la GP étaient divisés en 5 groupes, selon leur épitope. Sur les 14 anticorps monoclonaux générés, 10 apportaient une protection à des souris infectées par un variant adapté lorsque que l'anticorps purifié était administré 24h avant le challenge. D'autres anticorps se sont révélés efficaces même s'ils étaient administrés 2 jours après infection. Cependant, aucun anticorps n'a pu protéger les souris quand il était administré 3 jours après l'infection, lorsque le titre viral était trop élevé [163].

L'anticorps monoclonal humain KZ52 a été produit et caractérisé à partir du sérum d'un survivant [164]. L'administration de l'anticorps KZ52 à des cochons d'Inde avant ou jusqu'à 1h après l'infection par EBOV résultait en une protection dépendante de la dose d'anticorps injectée, la plus forte dose protégeant tous les animaux, la plus faible n'en protégeant aucun. La protection ainsi apportée par l'anticorps KZ52 n'inhibait pas la réplication du virus, puisque des titres viraux bas étaient détectés dans le plasma des animaux traités. En prophylaxie, l'administration de l'anticorps KZ52 une heure avant l'infection a permis de protéger tous les animaux. En traitement, l'anticorps KZ52 a protégé du challenge 4 des 5 animaux traités une heure après l'infection, mais aucun des cochons d'Inde traités 6h après infection n'ont pu être protégés [165]. L'anticorps pourrait intervenir dans la destruction des cellules infectées, aidant ainsi à contrôler les dommages causés aux organes.

D'autres anticorps, dont les épitopes sont différents de celui de KZ52, ont été testés sur les souris et cochons d'Inde. Le traitement 2 jours après infection protégeait complètement les souris. Si le traitement était administré 3 ou 4 jours après infection, la protection était tout de même partielle. Le traitement des cochons d'Inde n'était pas aussi efficace, une dose injectée jusqu'à 2 jours après l'infection par EBOV protégeant seulement une partie des animaux. Il est intéressant de remarquer que le comportement *in vitro* des anticorps utilisés pour cette étude ne correspondait pas à la protection observée chez les animaux [166]. Ceci suggère des mécanismes différents dans la neutralisation par les anticorps lorsqu'ils sont utilisés seuls ou dans le contexte immun d'un hôte.

Enfin, l'anticorps neutralisant KZ52 a été étudié dans le modèle primate. Des macaques rhésus ont été traités par cet anticorps 1 jour avant et 4 jours après infection par EBOV. Aucun des animaux n'a survécu. De plus, l'administration de l'anticorps n'a eu aucun effet sur la réplication virale. Les anticorps acquis passivement seraient incapables de bloquer l'entrée de toutes les particules virales aux cellules. Une fois les particules entrées, la réplication virale explosive ne pourrait plus être contenue par la réponse cellulaire. Il semblerait que le mécanisme de propagation de l'infection chez le macaque soit insensible à la concentration d'anticorps [167].

- **Vaccin post-exposition**

Le vaccin basé sur le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) s'est montré efficace pour protéger les macaques contre une dose mortelle d'EBOV [143]. Récemment, le traitement de macaques rhésus par un vaccin VSV recombinant portant une protéine de MARV a

permis de protéger tous les animaux. Le traitement était administré 20 à 30 minutes après l'infection par une forte dose de virus de la même souche que celle utilisée pour le vaccin ou par une autre souche [168, 169]. L'utilisation de ce vaccin contre EBOV a donc été testée après exposition sur les 3 modèles animaux. Cinquante et 100% des cochons d'Inde et souris, respectivement, traités jusqu'à 24h après l'infection ont survécu. De même, 50% des macaques rhésus traités 20 à 30 minutes après l'infection par EBOV ont survécu. L'efficacité de ce traitement post-exposition pourrait être augmentée par une plus forte dose, par des traitements multiples au cours du temps. Le traitement post-exposition est particulièrement adapté aux cas d'exposition accidentelle d'individus et pourrait être amélioré en association avec le traitement inhibant les désordres de la coagulation [170].

Ces études prometteuses suggèrent que l'emploi d'une multithérapie pourrait augmenter l'efficacité de traitement. La recherche d'un vaccin se heurte aux problèmes éthiques posés par la phase humaine des tests cliniques pour un virus aussi mortel.

IV. Les mécanismes physiopathologiques

IV.1. Physiopathogénèse

a. Modèle animal

Le modèle primate a d'abord été utilisé pour étudier les modifications biologiques et hématologiques induites par EBOV. Chez des singes verts et macaques rhésus infectés, la maladie ressemblait à celle observée chez les humains, avec perte de poids, anorexie, fièvre, hémorragies et rash. De fortes concentrations virales ont été trouvées dans plusieurs organes, mais surtout dans le foie, la rate et les poumons [91, 171]. La microscopie électronique a mis en évidence des nécroses coagulatrices locales dans le foie, la rate, les reins, les poumons et les testicules d'animaux infectés, ainsi que des dommages vasculaires modérés [95, 172]. L'infection de 21 macaques cynomolgus et leur suivi sur 6 jours a permis d'identifier les cellules dendritiques des tissus lymphoïdes comme des cibles précoces d'EBOV [173]. De plus, l'infection par aérosols produit le même tableau clinique

que l'inoculation parentérale, à la différence de saignements sous-cutanés, aux points de ponction, et du nez [64].

L'infection de cochons d'Inde avec un variant adapté à cette espèce provoque des lésions similaires à celles observées chez les singes ou les humains infectés. Ce modèle a permis d'identifier les macrophages et autres cellules du système de la phagocytose mononucléaire comme les cellules cibles primaires d'EBOV [174].

Le modèle murin présente des modifications similaires à celles observées sur les 2 autres modèles animaux. L'étude sur les souris a confirmé la grande prédilection d'EBOV pour les cellules du système de la phagocytose mononuclée. Le virus infecterait ensuite les tissus connectifs et les cellules parenchymales associées à ce système. Toutefois, l'infection expérimentale des souris ne provoque que peu de dépôts de fibrine dans les vaisseaux sanguins des souris lors de la phase tardive de la maladie [175].

Différents paramètres biologiques ont été comparés entre des groupes de souris, de cochons d'Inde et 3 macaques rhésus après infection par un variant EBOV adapté par passages successifs chez la souris. L'étude a montré des perturbations hématologiques et biochimiques similaires dans les 3 modèles, bien que les anomalies de coagulation soient moins marquées chez les souris [176]. Les auteurs suggèrent que le degré de virémie, ainsi que les changements hématologiques, biochimiques et de la coagulation pourraient être utilisés pour prédire l'issue de la maladie. Il est toutefois nécessaire de remarquer que l'expérimentation sur un modèle animal doit tenir compte de l'espèce. En effet, une infection expérimentale comparée sur 2 espèces primates a montré que certaines caractéristiques sont spécifiques à l'espèce : la virémie était détectée plusieurs jours après l'infection chez les babouins alors qu'elle était détectée après 24h seulement chez les singes verts. Une autre différence a été observée au niveau de la coagulation : les babouins étaient sujets à de nombreuses hémorragies quand les singes verts présentaient une thrombose généralisée. Ces spécificités en fonction de l'espèce sont importantes dans le choix du modèle expérimental [177].

b. Paramètres biochimiques et hématologiques

Les changements hématologiques majeurs observés lors d'infections comprennent l'élévation du nombre de leucocytes puis sa diminution brusque, des désordres de

coagulation, la diminution du nombre de plaquettes qui reste tout de même dans la fourchette normale au 8è jour pi, quand aucune agrégation en présence de collagène, d'ADP ou d'adrénaline n'est plus possible *in vitro,* malgré des doses supraoptimales [178].

D'autres caractéristiques récurrentes sont une neutrophilie, une sévère lymphopénie, ainsi que le non-fonctionnement des plaquettes avant la thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes dans le sang). Cette perte de fonction des plaquettes est associée à leur activation et leur dégranulation. Les causes probables à l'origine de cet événement sont leur agrégation/désagrégation suite aux dommages causés à l'endothélium auquel elles ont brièvement adhéré, leur activation directe dans la circulation par le virus ou des produits secrétés par les lymphocytes actifs, ou la formation de complexes immuns [57]. Dans le cas d'une infection virale, l'hémostase est altérée par effet direct du virus sur la fonction cellulaire ou suite à l'activation des voies immunes et inflammatoires. L'infection virale produit une grande variété de dommages, dont la thrombocytopénie causée par un auto-anticorps dirigé contre les plaquettes ou par l'agrégation de celles-ci accélérée par le virus. La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) correspond à la diminution du taux de facteurs de coagulation suite à l'augmentation de la consommation (utilisation des facteurs pour transformer le fibrinogène en fibrine, élément constituant des caillots sanguins) ou à une synthèse défectueuse (foie endommagé). La CIVD est causée soit par l'augmentation puis la diminution du taux des facteurs de coagulation soit par la circulation d'anticoagulants [179]. Treize facteurs de coagulation sont nécessaires pour transformer le fibrinogène soluble en fibrine insoluble composant le caillot. La circulation d'anticoagulants et le disfonctionnement des cellules endothéliales sont d'autres dommages causés par une infection virale [179]. La CIVD, mise en évidence par des niveaux élevés en produits de dégradation du fibrinogène, se développe plus tard au cours de la maladie et majoritairement chez les humains et animaux moribonds [57]. L'infection et l'activation des monocytes/macrophages pourrait également sécréter des facteurs qui induisent le développement d'anomalies de la coagulation [151].

Les analyses biochimiques mettent en évidence une fonction rénale défectueuse (rapport ASAT/ALAT élevé), des dommages modérés des cellules du foie et des changements d'électrolytes compatibles avec une infection sévère [178].

Chez des animaux infectés, les lésions provoquées se situaient surtout dans le foie, bien que l'infection par EBOV ne soit pas toujours associée à cette inflammation. Les foci

granuleux observés dans des sections de foie d'animaux infectés seraient donc des pièges à virus, où les monocytes infectés migreraient du sang sous l'effet des chémoattractants secrétés par les macrophages produits par les foci enflammés [180].

Les cellules endothéliales ne sont pas des cibles précoces d'EBOV et les autopsies d'animaux infectés expérimentalement montrent un endothélium relativement intact [181]. Cependant, les caractéristiques cliniques des fièvres hémorragiques virales (FHV) sont en accord avec une perte générale d'intégrité de l'endothélium. Ces caractéristiques sont un développement soudain d'un choc hypovolémique et hyponatrémique, des effusions multiples et de multiples points de saignement [57]. Bien qu'il y ait de nombreux saignements, les volumes de sang perdus ne sont pas assez élevés pour entraîner la mort. De même, la nécrose hépatique et l'étendue des disfonctionnements hépatique et rénal ne sont pas aussi dangereux pour la vie qu'ils ne le sont par exemple dans le cas d'une hépatite B fulminante. [57]

IV.2. Immunologie

a. Immunité cellulaire

L'endothélium a des fonctions importantes de régulation. Les virus de Marburg et Ebola s'y répliquent aussi bien que dans les cellules de reins de singes couramment utilisées [182]. L'infection de cellules dérivées des poumons montre qu'elles ne sont pas des cibles précoces d'EBOV [181]. Par des essais d'infection *in vitro*, les macrophages et autres cellules du système de la phagocytose mononuclée ont été identifiées comme les cibles primaires d'EBOV [95, 174, 183]. Comme pour les macrophages adhérents en culture, l'activation de monocytes en suspension est indépendante de la réplication virale. De plus, les chémokines et cytokines produites par les monocytes activés pourraient déstabiliser l'endothélium de l'hôte [184]. *In vivo*, l'infection des cellules de l'immunité par EBOV se traduit par une prolifération des lymphocytes, suivi d'une baisse des indices de prolifération.

En effet, les analyses pratiquées sur des patients atteints par SEBOV qui décèdent montrent une diminution de leur nombre de cellules T $CD8^+$ alors que le nombre de ces cellules augmente chez les patients qui survivent [185]. Afin de mieux comprendre cette

variation dans l'immunité cellulaire des patients, les mécanismes d'élimination du virus ont été étudiés dans un modèle murin. Toutes les souris déficientes en cellules T $CD8^+$ ont succombé. Au contraire, les souris déficientes en cellules B ou T $CD4^+$ ont éliminé l'infection et ont survécu. Les cellules T $CD8^+$ seraient donc essentielles à la protection contre une infection sous-cutanée par EBOV. De leur côté, les cellules T $CD4^+$ ainsi que les anticorps seraient plutôt nécessaires pour une protection à long terme. Dans certaines conditions d'immunodéficience, un hôte pourrait alors héberger le virus pour des périodes prolongées, agissant ainsi comme un réservoir [186].

Les cellules Natural Killer (NK) ont également un rôle décisif lors d'une infection par EBOV. En effet, l'injection d'un pseudovirus exprimant la GP ne procure aucune protection à des souris déficientes ou déprimées en cellules NK lors d'une infection par EBOV. Par contre, les cellules NK traitées avec ce pseudovirus protègent contre un challenge létal quand elles sont transférées à des souris naïves. De plus, les cellules NK stimulées *in vitro* par ce pseudovirus secrètent des cytokines et chémokines pro-inflammatoires et tuent les cellules cibles infectées [187].

Les cellules dendritiques sont également des cibles primaires d'EBOV. A la surface de ces cellules se trouvent des protéines membranaires associées en homotrimères, qui lient les GP des rétrovirus afin d'en faciliter l'entrée dans la cellule. Ces protéines membranaires, nommées DC-SIGN/R pour Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin / Related, agissent comme des cofacteurs lors de l'entrée d'EBOV dans les cellules dendritiques. DC-SIGN/R est exprimé par de nombreuses cellules cibles précoces, dont les cellules dendritiques, les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales sinusoïdales ou du foie et des ganglions lymphatiques [188]. De la même manière que DC-SIGN/R aide le VIH à pénétrer dans les cellules T CD4+, cette protéine permet à des particules pseudovirales exprimant une partie du génome d'EBOV d'infecter des cellules dendritiques [189]. La capacité de fixation du virus aux DC-SIGN/R dépend du type de la structure carbohydrate de la GP virale. Plus la proportion de glycanes N-liés est grande, meilleure sera l'infectivité du virus [190]. La comparaison des interactions DC-SIGN/R avec les GP des espèces *Soudan* et *Zaïre* a montré qu'elle serait gouvernée par le peptide signal. En effet, il influencerait l'attachement du virus aux cellules à 2 niveaux : d'abord au niveau de la glycosylation de la GP virale, le peptide signal modulerait la modification de la GP et pourrait donc influer sur l'interaction DC-SIGN/R-virus, qui dépend des

carbohydrates de la GP ; ensuite, au niveau de l'incorporation de la GP dans les virions. Ceci suggère la nécessité de liaison DC-SIGN-virus multiples pour une infection robuste [191].

Enfin, les cellules dendritiques répondent à l'infection par la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, l'activation de nombreux facteurs de transcription dont NFκB, et l'activation des MAP kinases ERK1/2. Cependant, l'étude de pseudovirions exprimant une GP mutante délétée de son domaine « mucin-like » montre que l'activation de NFκB et de ERK est affectée et que les cellules produisent moins de cytokines [192].

Les monocytes infectés pénètreraient donc dans la circulation sanguine et dissemineraient le virus dans d'autres cellules et organes [175]. EBOV pourrait également être propagé par le biais des cellules dendritiques et leur capacité d'infecter les cellules en trans [193]. Cependant, les anomalies de coagulation observées chez des patients atteints de FHVE ne seraient pas le seul résultat d'une cytolyse des cellules endothéliales par le virus, mais pourraient faire également intervenir le système immunitaire [181].

b. Cytokines

Les cytokines sont un groupe de petites protéines (8 à 30kDa) et peptides utilisés par les organismes comme éléments de signalisation. Il existe 4 types de cytokines en fonction de leur structure : la famille de cytokines à 4 hélices-α subdivisée en 3 sous-familles ; la famille des IL-1 ; la famille des IL-17 ; et la famille des chémokines. Les cytokines peuvent également être classifiées selon leur rôle dans la prolifération et le fonctionnement des cellules T helper de type 1 ou 2. Les cytokines constituent le 3è signal requis pour l'activation des cellules T en présence d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'activation de la cellule T passe tout d'abord par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II présentant l'antigène au récepteur de la cellule (TCR). Cette interaction est ensuite stabilisée par des interactions entre les molécules d'adhésion et leurs récepteurs. Enfin, la CPA secrète des cytokines qui, une fois liées à leurs récepteurs sur la cellule T, vont activer celle-ci [194]. Les cytokines sont produites par les cellules de l'immunité et plus particulièrement par les cellules T et les monocytes-macrophages [183]. Leurs effets sont variés et incluent la régulation de plusieurs gènes, l'augmentation du nombre de récepteurs de surface pour d'autres cellules, ou la suppression de leur propre

effet par retro-inhibition. Ainsi, l'IL-6 pourrait altérer la production de plaquettes en augmentant la transcription dans le foie du régulateur de la thrombopoièse [195]. *In vitro*, l'IL-6 agirait comme un facteur de maturation des mégacaryocytes [196].

Les chémokines (pour chemotactic cytokines) sont une famille de petites cytokines ou de protéines secrétées par les cellules. Elles sont caractérisées par leur petite taille (8 à 10 kDa) et la présence de 4 cystéines à des positions conservées. Le rôle majeur des chémokines est de guider la migration des cellules grâce à un gradient de concentration. Elles ont alors un rôle dans l'inflammation où leur fonction de chémoattraction permet de recruter les leucocytes, monocytes, neutrophiles et autres cellules effectrices de la circulation sanguine au site d'infection. La distance qui sépare les 2 premiers résidus cystéine permet de classer les chémokines en 4 types. Il s'agit des γ-chémokines (ou chémokines C) qui attirent les précurseurs de cellules T dans le thymus ; des δ-chémokines (ou chémokines CX_3C) qui servent à la fois de chémoattractant et de molécule d'adhésion ; des α-chémokines (ou chémokines CXC) dont une classe, contenant l'interleukine (IL)-8, induit la migration des neutrophiles. Il s'agit également des β-chémokines (ou chémokines CC) qui induisent la migration des monocytes, cellules NK et dendritiques. Cette classe comporte la protéine chémoattractant les monocytes (MCP-1 ou CCL2) ainsi que la chémokine RANTES ou CCL5 qui attire les cellules T, les éosinophiles et les basophiles [197]. Les chémokines RANTES, MIP-1α et MIP-1β ont été identifiées comme des facteurs de suppression du VIH-1 produit par les cellules T $CD8^+$ [198, 199]. La sécrétion de chémokines est souvent stimulée par des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'IL-2 et l'IL-10 induisent l'expression des récepteurs CCR1 et CCR2 à la surface des cellules T [200, 201]. Ces récepteurs sont spécifiques des chémokines RANTES, MIP-1 et MCP-1 [202].

L'infection par le virus ZEBOV bloque l'induction de différents gènes dans les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC). Ainsi, l'expression des gènes du CMH-I, de l'IL-6, de l'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire) et du facteur de régulation de l'IFN est inhibée. Le CMH-I est une protéine de surface qui présente l'antigène aux cellules T cytotoxiques $CD8^+$; l'IL-6 est un signal de différentiation des cellules B, signal de sécrétion des anticorps aux cellules du plasma, et un co-stimulateur pour cellules T ; l'ICAM-1 permet aux cellules endothéliales de recruter les leucocytes afin de les faire transiter au site de l'infection. Son inhibition pourrait atténuer la réponse

inflammatoire. L'inhibition de l'expression de ces gènes pourrait jouer un rôle dans l'immunosuppression observée lors d'infections par ZEBOV, donc dans la pathogenèse de la maladie [98].

En effet, la GP d'EBOV comporte un motif semblable au domaine immunosuppresseur identifié chez les rétrovirus et plus particulièrement dans le VIH-1 [203]. Des cellules mononucléaires sanguines d'humain ou de macaques rhésus (PBMC) activées ont été exposées à ZEBOV inactivé ou à des peptides représentant le motif immunosuppresseur des différentes souches de filovirus. Une diminution de l'expression des marqueurs d'activation sur les cellules CD4 et CD8 a été observée, ainsi que l'apoptose de ces cellules 12h après exposition, l'inhibition de la progression de leur cycle cellulaire, la diminution de l'expression de l'IL-2, l'IFN-γ et l'IL12-p40, et l'augmentation de l'expression de l'IL-10 [204].

Les macrophages et monocytes étant les premiers producteurs de cytokines et chémokines, l'effet direct de EBOV sur les macrophages humains a été étudié en mettant des PBMC ou des macrophages dérivés de monocytes en présence d'EBOV. L'infection des PBMC résultait en l'induction des MCP-1, MIP-1α, RANTES et du Tumor Necrosis Factor (TNF)-α 24h après l'infection. L'infection des macrophages par un virus vivant induisait la production de MIP-1α et TNF-α alors que la mise en présence des cellules avec un virus inactivé ou vivant stimulait dans les 2 cas la production de RANTES et MCP-1. Les macrophages étant une cible importante pour la réplication virale, les filovirus pourraient exploiter les propriétés chémotactiques des chémokines pour sa propre propagation dans l'hôte. Curieusement, les interférons de type I (IFN-α et –β), l'IL-1β et l'IL-10 n'étaient pas induits par EBOV dans cette étude alors qu'ils sont observés en taux élevés dans les sérum de patients [205].

Cette étude est en accord avec l'inhibition de la production d'IFN type 1 par la VP35 grâce à la synthèse d'ARN double-brin inhibiteur [206].

En effet, un microarray d'expression montre que les gènes liés au système immunitaire sont sur-exprimés dans les cellules hépatiques humaines infectées par les filovirus ZEBOV, REBOV et MARV. Au contraire, les gènes codant pour des protéines de la coagulation ou de la phase aïgue sont sous-exprimés. Une caractéristique commune de la virulence des filovirus est la suppression des réponses antivirales clé de la cellule. L'infection par ZEBOV ou MARV inhibe l'expression des gènes stimulés par l'IFN. Il est

probable qu'une corrélation existe entre l'antagonisme des réponses IFN type I et la virulence des filovirus [207].

Un test multiplex a été développé afin de mesurer les taux de cytokines et chémokines circulantes chez des macaques cynomolgus infectés par REBOV. L'augmentation en cytokines circulantes était corrélée à l'augmentation en antigènes viraux circulant. Les chémokines dont les taux ont augmenté étaient les MCP-1 et -1β, RANTES et l'IL-1β à des taux plus variables. MCP-1 et RANTES peuvent affecter la perméabilité vasculaire par induction de sécrétion de radicaux superoxydes et histamine [208, 209]. RANTES affecterait également la fonction des plaquettes par sécrétion d'acide arachidonique [210]. Les cytokines dont les taux ont augmenté étaient :l'IL-6, le TNF-α, l'IFN-γ, les IL-2, -4, -8, et -10. Les cellules Th1 sécrètent principalement l'IL-2, le TNF-α et l'IFN-γ en vue d'activer les macrophages. L'IL-4 est plus spécifiquement secrétée par les cellules Th2 afin d'activer les cellules B et de stimuler l'immunité humorale. Contrairement aux résultats trouvés chez les humains asymptomatiques [211], 81% des macaques infectés pour lesquels de forts taux d'IL-4 ont été déterminés avaient également un fort taux d'anticorps IgM [210].

Les taux de cytokines ont été comparés entre des sérums de patients décédés, de survivants et de contrôles. Les patients qui décèdent présentent une forte augmentation à des degrés variables des niveaux d'IFN-γ, d'IL-2 et -10, de TNF-α et d'IFN-α, dont le taux d'ARNm dans les cellules sanguines est élevé. Ces résultats suggèrent qu'une forte activation immune accompagne la phase aïgue et terminale de la maladie et pourrait contribuer à l'issue fatale de la FHVE. La présence d'IFN en grandes quantités pourrait contribuer au syndrome de fuite des capillaires et aux symptômes hémorragiques associés à la FHVE. Cette hypothèse est corrélée par l'observation clinique lors d'épidémies que la plupart des victimes meurent d'un état de choc accompagné de fièvre, polypnée, disfonctionnement des reins et altérations du système nerveux central [212].

L'apoptose des cellules CD4 et CD8 avait été observée 12h après exposition de PBMC à *Ebolavirus zaïre* [204]. La mort cellulaire intervient par 2 mécanismes distincts [213] : soit la perforine provoque l'ouverture de pores dans la membrane des cellules cible [214, 215], soit le ligand FasL, exprimé par les cellules effectrices et principalement les cellules T activées, interagit avec son récepteur Fas situé à la surface des cellules cibles [216].

Les mécanismes impliqués dans l'apoptose des lymphocytes ont donc été étudiés chez des primates infectés. Les cytokines et chémokines dans le sérum ont été mesurées, ainsi que le taux du facteur soluble Fas. L'infection *in vitro* de PBMC montre une forte induction des cytokines/chémokines, utilisées comme voie de signalisation, et une augmentation du nombre de lymphocytes apoptotiques observés par microscopie électronique. La plupart des caractéristiques pathologiques observées seraient donc la conséquence de ces évènements [217].

c. Immunité humorale

Chez les malades atteints de FHVE, les IgG et les IgM apparaissent à peu près au même moment après le début des symptômes (8 à 10 jours), mais les IgM persistent pour une période plus courte chez les patients convalescents. En effet, des IgG ont été détectés jusqu'à 2 ans après la convalescence. La détection d'anticorps est beaucoup plus utile pour le diagnostic de survivants en début de convalescence et dans le classement des cas [101].

Un panel d'anticorps monoclonaux humains recombinants a été isolé à partir d'ARN extrait du sang de survivants de l'épidémie de 1995 à Kikwit, RDC. Les anticorps étaient d'abord sélectionnés selon leur capacité à réagir avec un lysat de cellules Vero infectées avec la GP soluble, puis avec une préparation de membrane de virion [218]. Les anticorps qui réagissaient fortement avec la nucléoprotéine (NP) et les GP soluble et membranaire ont été caractérisés. Un des anticorps dirigés contre la GP (KZ52) neutralisait 50% du virus à des concentrations nanomolaires [164].

Les anticorps ont une activité de neutralisation du virus [163, 165]. Tous les anticorps murins, humain, équins ou primates testés permettaient de neutraliser l'infection de monocytes/macrophages ou de cellules Vero par EBOV [219]. Cette activité est toutefois réduite en présence de GP soluble, dont le rôle serait de capter les anticorps destinés aux cellules infectées [220].

d. Cas asymptomatiques humains

Lors de 2 épidémies en 1996 dans le Nord du Gabon, des personnes ayant eu des contacts permanents sans protection avec du matériel contaminé n'ont pas développé de symptômes. La réponse immune de 7 d'entre eux a été étudiée. Des gènes viraux ont pu être amplifiés par RT-PCR, mettant en évidence leur infection. Des IgG et IgM dirigés contre EBOV, et des IgG dirigé contre protéines NP et VP40 ont été identifiés confirmant l'infection. Le taux d'IgG augmente entre 17 à 25 jours, celui d'IgM augmente entre 10 à 18 jours après le contact infectieux. La réponse anticorps est induite plus tardivement que chez les patients symptomatiques. Ces 7 patients asymptomatiques présentaient une réponse inflammatoire forte et précoce, caractérisée par de fortes concentrations de cytokines circulantes : IL-1β, TNF-α, IL-6 (qui enclenchent et régulent la réponse inflammatoire) et chémokines circulantes : MCP-1, MIP-1α, MIP-1β (qui recrutent les cellules immunitaires au site d'infection) [211].

Les réponses inflammatoires de ces patients asymptomatiques étaient en association temporelle avec la phase anti-inflammatoire composée par l'antagoniste soluble de l'interleukine 1, l'IL-1RA, par les récepteurs solubles du TNF- α, de l'IL-10 et du cortisol, qui sont des médiateurs anti-inflammatoires. La régulation négative de la réponse inflammatoire était suivie par l'activation transitoire des cellules T pendant quelques jours. Cette activation était indiquée par la régulation positive de l'ARNm des cytokines IL-2 et IL-4 et des marqueurs d'activation CD28, CD40L et CTLA4. La réponse des cellules T était associée à l'activation des cellules cytotoxiques, mise en évidence par l'augmentation marquée et maintenue de l'ARNm de IFN-γ, du ligand FasL et de la perforine impliquées dans la mort cellulaire. La diminution des marqueurs cytotoxiques coïncidait avec la disparition de l'ARN viral, suggérant l'élimination des cellules infectées de la circulation par les cellules cytotoxiques [221]. Les résultats suggèrent que les composants pro- et anti-inflammatoires forment une boucle d'autorégulation, dans laquelle l'IL-10 et le cortisol réguleraient négativement les cytokines pro-inflammatoires et stimuleraient leurs antagonistes. Dans cette boucle d'autorégulation, les récepteurs solubles du TNF- α et l'IL-1RA réduiraient l'activité des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la rapide régulation des réponses inflammatoires permettrait d'éviter les fortes fièvres et les dommages causés aux tissus.

V. Agent pathogène : le virus Ebola

V.1. Taxonomie des fièvres hémorragiques tropicales

Les fièvres hémorragiques virales (FHV) sont des maladies virales d'étiologies diverses mais regroupées sur leurs caractéristiques cliniques (Tableau II). Les FHV ont des symptômes communs fréquemment observés dans les régions tropicales. Il s'agit de fièvre, de symptômes digestifs et de signes hémorragiques généralisés ou localisés à certains organes [222]. Ces caractéristiques cliniques peuvent être provoquées par de nombreux virus, des parasites, des bactéries ou des venins. Douze virus distincts associés à des fièvres hémorragiques chez les humains sont classés en 4 familles : Arenaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae et Filoviridae (revues réf [223]).

a. Les Arenaviridae

Les virus du genre *Arenavirus*, famille *Arenaviridae*, sont des virus enveloppés dont la face extérieure est couverte de glycoprotéines. Leur génome est composé de 2 segments d'ARN négatif simple brin, nommés Small (S) et Large (L), contenant chacun 2 gènes en orientation ambisens [224]. Le petit segment code pour la nucléoprotéine (N) et la glycoprotéine (GPC), le grand pour la polymérase (L) et la protéine de matrice (Z) [225]. La plupart des arénavirus ont une distribution géographique restreinte, leur espèce réservoir est en général un rongeur [224]. Des 16 virus composant cette famille, 6 sont pathogènes pour l'Homme. Les *Arenavirus* les plus connus provoquent la fièvre de Lassa et les fièvres hémorragiques Argentine et Bolivienne [89].

La fièvre de Lassa a été décrite pour la première fois en 1969, mais il est possible que des épidémies non reconnues aient existé auparavant. L'apparition de la fièvre de Lassa dans la population humaine implique un premier contact de l'homme avec le réservoir murin du virus, *Mastomys natalensis*. La transmission secondaire est principalement nosocomiale. Cette maladie est endémique en Afrique de l'Ouest où plusieurs épidémies ont sévi au Nigeria, en Sierra Leone et au Libéria [226]. Des analyses sérologiques chez les populations guinéennes et sénégalaises ont révélé la présence d'anticorps suggérant le

contact avec le virus Lassa [227]. Le taux de mortalité observé lors de la dernière épidémie varie de 12 à 23% [228].

D'autres maladies dues aux arénavirus sont la fièvre hémorragique argentine, reconnue depuis 1943 et causée par le virus Junin, et la FH bolivienne, reconnue depuis 1959 et causée par le virus Machupo [89]. La FH argentine est restreinte à une région bien délimitée où des épidémies ont lieu presque tous les ans [229], en relation avec des changements dans les conditions de vie du réservoir [230]. De même, le virus Machupo infecte naturellement une espèce rongeur et sévit dans une région précise de Bolivie. Ces 3 virus se transmettraient à l'homme par des aérosols d'excréta de rongeurs infectés [231].

b. Les Bunyaviridae

Les virus de la famille des *Bunyaviridae* sont des virus enveloppés, dont la face extérieure est couverte de glycoprotéines. Leur génome est composé de 3 segments d'ARN négatif simple brin (grand L, moyen M et petit S) codant en antisens les protéines virales [225]. Plusieurs virus de cette famille provoquent des FH chez l'homme. Les maladies les plus connues sont la fièvre de la vallée du Rift, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo et les fièvres hémorragiques avec syndrome rénal.

La fièvre de la vallée du Rift est causée par un virus du genre *Phlebovirus*, isolé pour la première fois en 1930. La transmission de la maladie à l'homme est le plus souvent observée en période d'épizootie, soit par le biais du vecteur, les moustiques du genre *Culex* ou *Aedes* [232, 233], soit par aérosols émis lors de l'abattage des animaux infectés [223]. Elle a touché l'Égypte [234] et les pays de l'Afrique de l'Est : Ouganda, Kenya, Somalie [235-237] bien que des petits foyers épidémiques aient éclaté dans le sud de l'Afrique [238], au Sénégal [239] et en Mauritanie [240]. Toutes les épidémies recensées suivent des périodes de précipitations élevées, propices au développement de la végétation et à l'explosion démographique des moustiques [241, 242]. La croissance importante de la population de moustiques infectés occasionne alors de grosses épidémies en nombre de cas. La dernière épidémie de fièvre de la vallée du Rift survenue au Kenya au touché 404 personnes de novembre 2006 à janvier 2007 et provoqué 118 décès (29% de mortalité) [236].

La fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC), décrite en 1944 en Crimée de l'ancienne Union Soviétique, est causée par un virus du genre *Nairovirus*, décrit en 1967 et similaire à un virus isolé en 1956 au Congo. La maladie peut être transmise par les morsures de tiques du genre *Hyalomma*, par contact avec des animaux infectés ou des personnes malades [243]. Sept lignées génétiques du virus de la FHCC ont été mises en évidence en fonction de leur localisation géographique [244]. Des épidémies et cas de FHCC ont été recensés dans l'Ouest et le Sud de l'Afrique [243, 245], en Europe de l'Est [246], Turquie [247], Asie [248], et Moyen-Orient [249], avec un taux de mortalité de 27%.

Les virus responsables de la fièvre hémorragique de Corée, des épidémies de FH avec syndrome rénal (FHSR) en Chine et dans l'ancienne Union Soviétique sont proches et forment le genre *Hantavirus*. Ces virus sont eux aussi véhiculés par un réservoir rongeur [250] et existent au-delà de l'aire d'extension de la FHSR [251]. En 1993, une maladie inconnue avec des symptômes pulmonaires est apparue dans le sud-ouest des USA, entraînant le décès de 75% des cas confirmés. L'amplification de fragments du génome viral a mis en cause un membre du genre *Hantavirus* [252]. L'apparition de cas de syndrome pulmonaire à Hantavirus est liée à des facteurs saisonniers et temporels [253-255]. La grande répartition des virus responsables de FHSR et de ses espèces réservoir ont permis de nombreuses captures, études de caractérisation moléculaire [256, 257] et études de leurs relations phylogénétiques [258]. Les cas d'infection par un Hantavirus sont estimés de 100 000 à 200 000 cas par an [259].

c. Les Flaviviridae

Le genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae* est composé de virus enveloppés dont le génome, une molécule d'ARN positif simple brin, code une seule phase ouverte de lecture. Celle-ci est clivée pendant et après la transcription afin de produire 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales. Les virus responsables de FH chez l'homme sont pour la plupart des arbovirus, c'est-à-dire transmis par des arthropodes.

Le représentant le plus connu de cette famille est le virus amaril de la fièvre jaune. Depuis le XVII^{è} siècle, la fièvre jaune est responsable d'épidémies urbaines aux conséquences dramatiques pour des pays tropicaux d'Amérique du Sud et d'Afrique. Le virus est transmis par 2 genres de moustiques distincts selon le continent (*Aedes* en Afrique et *Haemogogus* en Amérique) et il se perpétue grâce à 2 cycles de transmission : un cycle silencieux dans la forêt, maintenu par des transmissions continues moustique-singe-moustique, et un cycle urbain potentiellement dévastateur pour l'homme. L'homme s'infecte suite à une piqûre de moustique infecté. La fièvre jaune peut être responsable de gigantesques épidémies, telles celles du Sénégal en 1965 et du Burkina-Faso en 1969 et 1983 qui ont totalisé près de 800 cas [260]. Elle peut aussi survenir sous la forme de petits foyers épidémiques de quelques cas sporadiques [261, 262]. Le taux de mortalité observé était de 11% pour l'Afrique en 2004 [260]. Ce taux était en une nette progression lors de l'année 2005 avec des taux de mortalité allant de 20 à 43%, alors qu'il restait stationnaire en Amérique du Sud avec 45% de décès [263]. Le développement d'un vaccin a permis de maîtriser les épidémies en organisant des campagnes de vaccination de rattrapage lors de l'apparition de cas de fièvre jaune. Cependant, la couverture vaccinale moyenne des pays d'Afrique reste inférieure à 50% [264].

La dengue est quant à elle connue depuis près de 200 ans, mais ne fut caractérisée qu'à partir de 1960 [265]. Les virus de la dengue comportent 4 sérotypes distincts DEN1 à DEN4, transmis par les moustiques du genre *Aedes*. La maladie peut prendre 3 formes selon le degré de gravité de la maladie. La fièvre de la dengue est la forme bénigne classique, avec peu ou pas de symptômes. Une forme sévère, la fièvre hémorragique de la dengue, a été observée chez des personnes qui ont déjà été infectées par d'autres sérotypes. Dans 1% des cas, cette forme est associée à un syndrome de choc [266]. Les taux de mortalité de ces 2 formes sévères sont respectivement de 10-20% à 40% [267, 268]. Originaire de l'Asie du Sud-Est où il a émergé il y a 50 ans, le virus de la dengue s'est propagé aux régions du Pacifique, allant jusqu'en Amérique latine. Au niveau mondial, près de 50 millions d'infections apparaissent chaque année, provoquant 24 000 décès et 90% des 500 000 hospitalisations recensées sont des enfants [269].

Les *Flavivirus* ont été divisés en différents sérogroupes sur la base de tests de réactions de neutralisation croisées. Un de ces groupes comprend les virus encéphalite transmis par les tiques. Parmi ce sérogroupe, 3 virus provoquent des fièvres hémorragiques. Le virus de

la maladie de la forêt de Kyasanur, reconnu en 1957 suite à une épidémie qui touchait les personnes entrant dans la forêt, provoque chaque année entre 400 et 500 cas dans la zone d'endémie avec un taux de mortalité d'environ 10% [270]. La fièvre hémorragique d'Alkhurma est causée par un variant du virus de Kyasanur dont les séquences nucléotidiques présentent 89% d'homologie. Ce virus a été isolé dans les années 1990 en Arabie Saoudite. A ce jour, seulement 24 cas ont été recensés dont 25% est décédé [271]. Enfin, le virus d'Omsk a été isolé en 1947 en Sibérie, il est restreint à la partie asiatique de la Russie. Très peu de cas ont été recensés, 2 sous-types antigéniques ont pu être identifiés. Il est provoque une maladie hémorragique associée à une encéphalite létale dans 0,5 à 3% des cas [272].

d. Les Filoviridae

En 1967 une nouvelle FH apparaissait dans des laboratoires de Marburg (Allemagne) et Belgrade (Yougoslavie) qui travaillaient avec des singes verts (*Cercopithecus aethiops*) en provenance d'Ouganda [273]. En 1976, 2 autres épidémies d'une nouvelle FH se sont déclarées quasi simultanément au Soudan [13] et au Zaïre [17]. De ces 3 épidémies ont été isolés et identifiés 2 nouveaux virus aux morphologies et structures similaires, mais aux propriétés génétiques légèrement différentes. Ils ont été nommés, selon leur lieu d'apparition, virus de Marburg et virus Ebola, nom de la rivière baignant le village de Yambuku, épicentre de l'épidémie du Zaïre. Ces 2 virus, qui ne possèdent aucune parenté antigénique avec les virus connus responsables de FH, ont été groupés en une nouvelle famille basée sur leur morphologie filamenteuse : les *Filoviridae* [274].

Les *Filoviridae* sont des virus enveloppés, dont le génome est composé d'un brin non segmenté d'ARN négatif. La maladie qu'ils provoquent correspond au tableau clinique des autres FH. Ils proviennent des régions tropicales d'Afrique, à l'exception d'une espèce.

Le virus de Marburg et la FH qu'il induit sont les mieux étudiés des Filoviridae tout en étant la plus rare des FH. En effet, depuis son en 1967, seulement 5 épidémies dues à MARV ont été répertoriées. La première épidémie a touché des laboratoires de Marburg (Allemagne de l'Ouest) et de Belgrade. Trente et un employés qui manipulaient des reins de singes verts provenant d'Ouganda ont été infectés, 7 d'entre eux ont succombé à la maladie [275]. La deuxième épidémie eut lieu en 1975 en Afrique du Sud avec 1 cas primaire fatal et 2 cas secondaires qui ont survécu [78]. La troisième épidémie est apparue

au Kenya en 1980 où un patient et son médecin ont été infectés. Seul le médecin a survécu à la maladie. Malgré le grand nombre de contacts, aucun cas secondaire n'a été enregistré [79]. La quatrième épidémie a sévi en 1999 en République Démocratique du Congo (RDC) dans la région du Kivu, zone entièrement contrôlée par les rebelles. Malgré l'enclavement de la région et le conflit, 73 cas ont pu être identifiés [276, 277]. La dernière apparition de MARV a provoqué 252 cas dont 227 décès dans la province d'Uige, en Angola, d'octobre 2004 à juillet 2005. C'est l'épidémie la plus importante à ce jour, en nombre de cas et en taux de mortalité (90% contre environ 25% pour les autres épidémies) [278]. Ces données montrent également que la FH de Marburg est la moins contagieuse des FH avec une transmission secondaire peu commune [279].

Au contraire, EBOV est plus fréquent et beaucoup plus contagieux (voir chapitre I. Historique). Depuis sa première apparition en 1976, 4 espèces d'*Ebolavirus* ont été identifiées sur les bases de leurs propriétés physico-chimiques, leurs différences biologiques (taux de mortalité, cultures cellulaires, immunologie) [97, 119] et leur phylogénie [280].

Tableau II : Les fièvres hémorragiques virales, leurs virus, vecteur et distribution d'après LeDuc [223].

Famille	Genre	ARN	Virus	Maladie	Distribution	Vecteur
Arenaviridae		-	Lassa	Fièvre de Lassa	Afrique Ouest	Rongeur
			Junin	FH argentine	Argentine	Rongeur
			Machupo	FH bolivienne	Bolivie	Rongeur
Bunyaviridae	*Phlebovirus*	-	Vallée du Rift	F vallée du Rift	Afrique	Moustique
	Nairovirus		Crimée-Congo	FH Crimée-Congo	Afrique, Asie	Tique
	Hantavirus		Hantaan	FHSR	Afrique, Asie, Europe, Amérique	Rongeur
Flaviviridae		+	Amaril	Fièvre Jaune	Afrique, Amérique du Sud	Moustique
			Dengue	Dengue	Asie, Pacifique, Amérique	Moustique
			Virus d'Omsk	FH d'Omsk	Russie	Tique
			Virus Kyasanur	Maladie de la forêt de Kyasanur	Inde	Tique
			Virus d'Alkhurma	FH d'Alkhurma	Arabie Saoudite	Tique
Filoviridae		-	Marburg	FH de Marburg	Afrique	
			Ebola	FH d'Ebola	Afrique	

V.2. Morphologie et structure

a. Morphologie

Les virus Ebola et de Marburg sont pléiomorphiques. Ils peuvent se présenter sous la forme la plus connue d'un filament, parfois branché, en forme de « 6 », de « U » ou épingle, ou plus rarement sous forme circulaire (Figure 8) [92]. Les filaments viraux ont un diamètre de 80 nm, cependant, leur longueur est variable, pouvant aller jusqu'à 14 µm [281]. Le pic d'infectivité d'EBOV serait associé à une longueur de 805 nm [282].

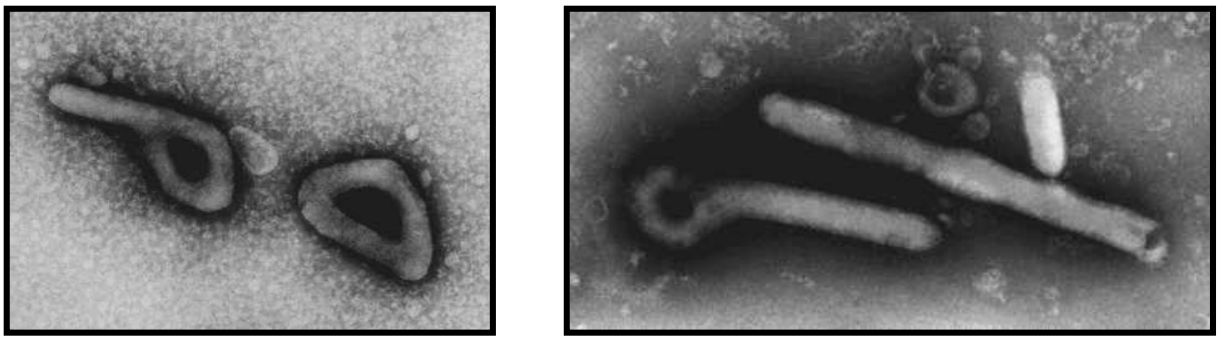


Figure 8 : Images d'*Ebolavirus* en microscopie électronique. Les formes circulaires, en 6 et en épingle sont représentées. D'après Leroy [80].

Les virus sont composés d'un complexe ribonucléocapsidique entouré d'une enveloppe lipidique dérivant en partie de la membrane des cellules infectées. L'enveloppe est entièrement recouverte de spicules globulaires d'environ 7 nm de longueur et espacées d'environ 10 nm [282].

b. Structure

Les filovirus sont composés de 2 éléments structuraux : l'enveloppe et le complexe ribonucléocapsidique, résultant de l'assemblement des 7 protéines virales. Les spicules recouvrant l'enveloppe virale sont constitués par la GP membranaire, en homotrimère sur la face externe et associée à 2 autres protéines de structure, la VP24 et la VP40 sur la face interne de l'enveloppe [282]. Le complexe ribonucléocapsidique est composé d'un brin d'ARN linéaire, de polarité négative, et des 4 protéines structurales impliquées dans la

formation de la nucléocapside : la nucléoprotéine (NP), l'ARN polymérase (L), la protéine virale de 35kDa (VP35) et la VP30 [283]. La nucléocapside hélicoïdale a une longueur de 50 nm et une périodicité d'environ 5 nm par tour d'hélice (Figure 9) [89, 281].

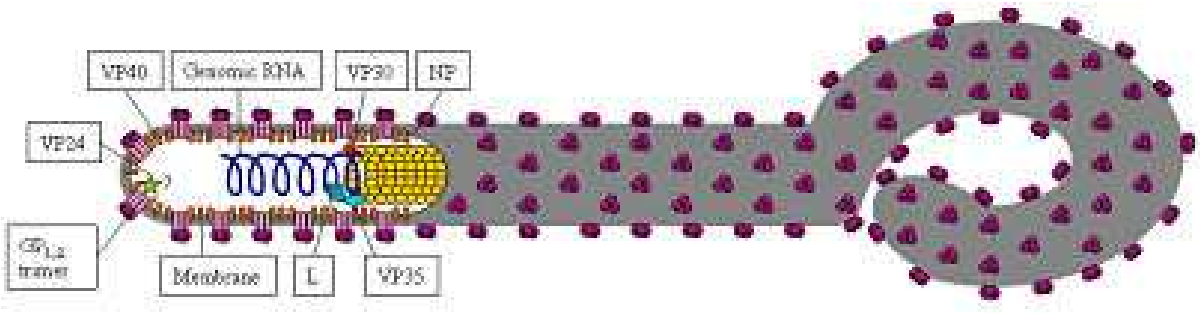


Figure 9 : Représentation schématique de la structure d'*Ebolavirus*. L représente l'ARN polymérase, GP correspond à la glycoprotéine, NP à la nucléoprotéine, et VP aux protéines virales structurales.

c. Inactivation physico-chimique

Plusieurs traitements physiques inactivent le virus Ebola. Chauffer un sérum à 60°C pendant 1h inactive complètement le virus, même lorsque le titre est très élevé [284]. L'exposition à 1,27 x 10^6 rads de rayons gamma inactive le virus sans en modifier la structure protéique ni les qualités immunologiques [285]. Par contre, l'exposition au rayonnement ultra-violet (1 200 à 2 000 W/cm² pendant 30 minutes minimum) ainsi que les cycles de congélations/décongélations successives n'inactivent pas en totalité le virus et en diminuent l'antigénicité [285].

De nombreux traitements chimiques sont également utilisables. Lorsque le matériel biologique est destiné à des études immunologiques, EBOV peut être inactivé par la β-propiolactone (solution finale diluée à 1/400) ou par la dilution du sang dans une solution d'acide acétique à 3% (pH 2,5, pendant 15 minutes). Toutefois, ces traitements peuvent altérer certaines protéines présentes dans le sérum [284, 285]. Sur le terrain, l'eau de javel et les désinfectants à base de phénol sont régulièrement utilisés pour la désinfection du matériel médical et ménager, des vêtements, et des bâtiments infectés.

Par contre, EBOV reste infectieux en milieu ambiant plusieurs jours. Ainsi, du virus a pu être isolé à partir de sang resté dans des seringues sur des paillasses de laboratoire et à partir de carcasses animales en voie de décomposition [59].

V.3. Organisation du génome

Le génome des filovirus est représenté par un simple brin d'ARN, linéaire, de polarité négative et d'une longueur d'environ 19 kb (18,9 kb pour EBOV et 19,1 kb pour MARV). Le génome code pour 7 gènes disposés comme suit : 3'-leader-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-trailer-5' (Figure 10).

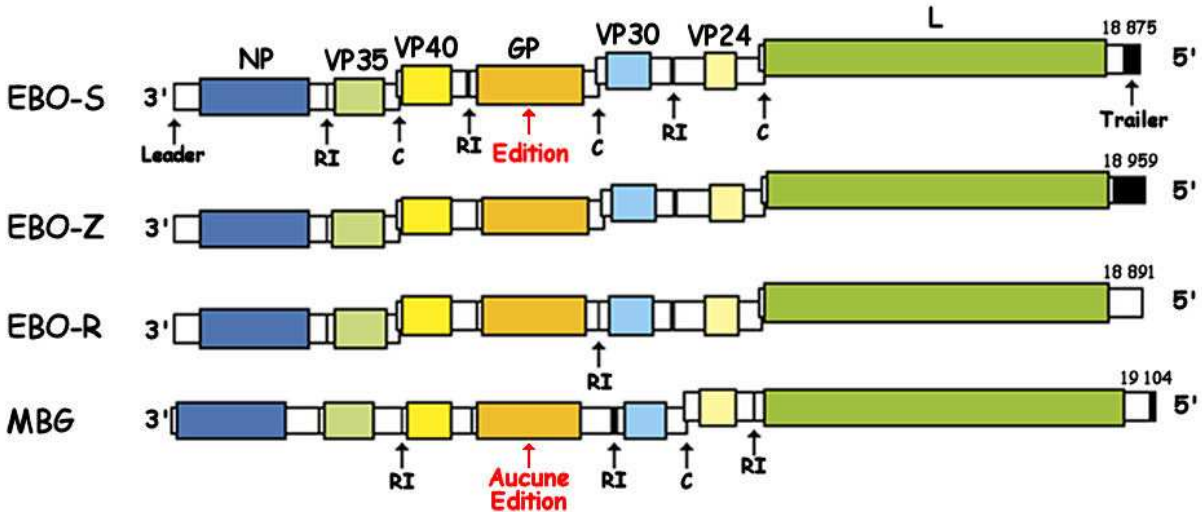


Figure 10 : Organisation génomique de *Marburgvirus* et de 3 espèces d'*Ebolavirus*, d'après Sanchez et al. [286]. RI : Région Intergénique ; C : Chevauchement.

Certains gènes des filovirus sont séparés par des régions intergéniques de longueur variable, tandis que d'autres se chevauchent. EBOV possède 3 régions intergéniques qui alternent le long du génome avec 3 chevauchements de gènes, situés entre les régions codant pour la VP35 et la VP40, celles codant pour la GP et la VP30 et celles codant pour la VP24 et la protéine L. Les chevauchements sont limités à 5 nucléotides très conservés : 3'-UAAUU-5'. Ce motif est présent dans tous les signaux de transcription Start ou Stop des gènes impliqués. Ces zones de chevauchement influeraient sur le niveau d'expression du gène en aval en agissant sur la transcription. Dans ce cas, ils pourraient permettre à la polymérase de reconnaître le site d'initiation de transcription du gène en aval après la polyadénylation de l'ARN messager (ARNm), et éventuellement de se repositionner [287].

Les régions non codantes situées aux extrémités 3' et 5' du génome contiennent les signaux de réplication et d'encapsidation [288].

La prédiction de structures secondaires a montré que les extrémités 5' des ARNm forment des structures stables en épingles à cheveux (Figure 11), les motifs conservés d'initiation et de terminaison de transcription se situant dans la partie tige de la structure [287]. Les longueurs des structures en épingle à cheveux sont similaires pour les espèces *Zaïre* et *Soudan*. Cependant, leurs longueurs et stabilités diffèrent pour les transcrits des différents gènes. Ainsi, la protéine VP40, protéine virale produite en plus grande quantité, se caractérise par un ARNm dont la structure secondaire en épingle à cheveux est la plus longue et la plus stable. Ces structures secondaires auraient pour rôle de stabiliser l'ARNm et/ou d'améliorer leur fixation aux ribosomes dans le but d'influer sur l'expression des gènes [286].

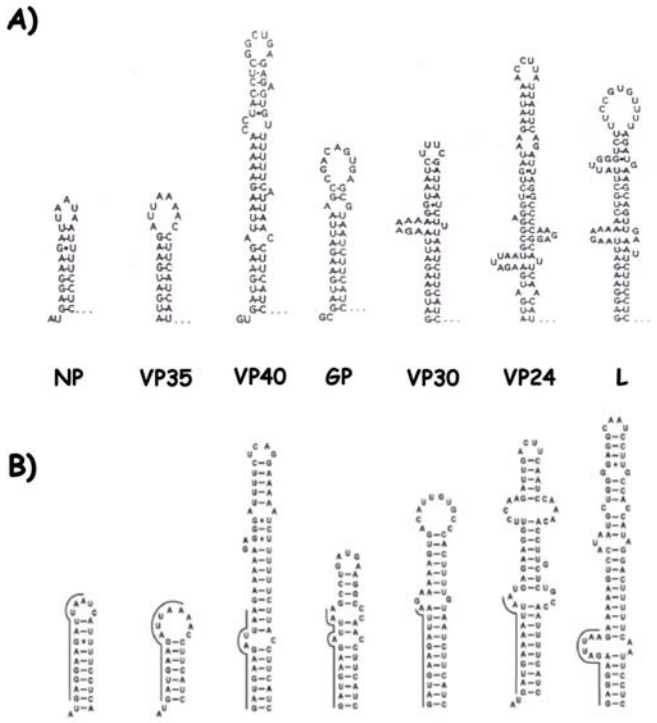


Figure 11 : Représentation schématique des structures secondaires prédites aux extrémités 5' des 7 gènes d'EBOV espèces **A)** *Zaïre* [287] et **B)** *Soudan* [286]. Les séquences conservées de transcription se trouvent dans la tige et sont représentées par les traits.

V.4. Cycle de réplication

Le danger représenté par les filovirus pour l'être humain, ajouté à l'absence de traitement ou vaccin, contraint à des manipulations de virus vivants en laboratoires de niveau de biosécurité 4. Ces contraintes ont obligé les équipes de chercheurs à trouver une alternative : les mécanismes d'entrée, réplication et sortie de la cellule sont donc étudiés

par le biais de virus pseudotypés ou recombinés, ou par transfection de cellules. Ce sont des virus dont un gène est remplacé par la séquence codant une ou plusieurs protéines du filovirus. Les systèmes utilisés sont les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) pseudotypés, les virus de la stomatite vésiculaire (VSV) recombinants, le virus de la leucémie murine (MLV) pseudotypé. L'utilisation de ces systèmes ne nécessite pas les conditions rigoureuses du travail en laboratoire de niveau de biosécurité 4. Toutefois, même si les résultats obtenus donnent une idée des mécanismes impliqués, ils ne restent qu'hypothétiques et nécessitent une confirmation par le virus vivant, dans lequel peuvent intervenir des interactions entre protéines.

a. Entrée dans la cellule

Les premières études concernant l'entrée d'EBOV dans les cellules humaines ont cherché à connaître la gamme d'infection du virus. Pour cela, plusieurs lignées de cellules humaines ont été infectées par le virus de la leucémie murine (MLV) pseudotypé avec la glycoprotéine membranaire (GP). MLV-GP infecte un grand nombre de cellules mammifères, bien que les cellules lymphoïdes (cellules T) ne soient pas permissives, probablement à cause de l'absence d'un récepteur fonctionnel. En parallèle, l'étude des bases faibles sur l'infection a montré que le mécanisme d'entrée dans la cellule serait dépendant du pH [289, 290]. Le rôle de la GP dans l'entrée dans la cellule a été démontré grâce à l'induction du gène rapporteur β-galactosidase (*LacZ*) exprimé dans les cellules cibles. Ce système est utilisé afin de mettre en évidence les échanges de cytoplasme, indicateurs de fusion des membranes. Lors de cette étude, il a été démontré que l'activation par acidification des cellules exprimant la GP était nécessaire à une fusion efficace [291].

La GP membranaire, seule protéine virale à être exposée à la surface du virus, joue un rôle dans l'entrée du virus dans les cellules. Les virus recombinants ou pseudotypés utilisés dans la détermination des mécanismes d'entrée dans la cellule expriment donc la GP.

L'étude de différents peptides de fusion potentiels a montré leur fusion avec des vésicules contenant du phosphatidylinositol dans leur membrane. Ce résultat suggère l'utilisation des cavéoles comme moyen d'entrer dans les cellules par endocytose.

De plus, la mise en évidence du récepteur folate-α (FRα) comme cofacteur de l'entrée cellulaire d'EBOV supporte cette hypothèse, l'endocytose de ce récepteur dépendant des

cavéoles [292, 293]. L'utilisation du système cavéole par EBOV est encore soutenue par l'absence d'entrée dans des cellules humaines en présence d'inhibiteurs du système. De plus, les pseudotypes utilisés sont colocalisés avec le marqueur de la protéine cavéolaire : la caveoline-1. Ces résultats suggèrent fortement l'utilisation de ce système, et du FRα comme moyen d'entrée du virus [292-294].

Ce résultat doit cependant être tempéré par l'étude de la capacité du récepteur folate-α dans la médiation de l'entrée de virus pseudotypés portant la glycoprotéine d'Ebola (EBO-GP). En effet, cette étude a montré que plusieurs cellules primaires et de lignées permissives à EBOV, telles que les macrophages, ne portent pas le FRα sur leur surface. De plus, d'autres cellules de lignées déficientes pour le système cavéole peuvent être infectées par le virus, et les cellules T non permissives expriment le FRα. Ces résultats prouvent, contrairement aux études précédentes, que le FRα ne serait pas essentiel à l'entrée d'EBOV [295]. Un autre mode d'entrée parmi les nombreux ligands cellulaires doit donc être recherché.

La similarité structurelle de l'enveloppe d'EBOV avec les enveloppes rétrovirales ouvre de nouveaux axes de recherche [296]. Les rétrovirus étant mieux caractérisés (car plus faciles à manipuler), les mécanismes qu'ils font intervenir sont étudiés dans le cadre de cellules exprimant EBO-GP. Ainsi, lorsqu'il a été démontré que l'interaction de la gp120 du VIH avec le récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non integrin), protéine membranaire exprimée par les cellules dendritiques immatures, facilite l'infection de cellules permissives, le rôle des lectines de type C DC-SIGN a été étudié dans des cellules exprimant EBO-GP [188]. L'expression de DC-SIGN et de son homologue L-SIGN (exprimé à la surface de cellules endothéliales dans le foie, les ganglions lymphatiques, et le placenta) est suffisante pour permettre l'infection de lignées cellulaires non permissives. De plus, il apparaît que ces récepteurs agiraient en *trans* en liant EBOV et transmettant l'infection aux cellules permissives [189]. Une autre lectine de type C, mise en évidence dans les macrophages humains et spécifique pour la galactose et la N-acetylgalactosamine (hMGL) permet d'augmenter l'infection par les filovirus. Ses ligands sont différents de ceux utilisés par les récepteurs DC-SIGN. De plus, la présence d'un domaine « mucin-like » de la GP serait nécessaire à une reconnaissance efficace par la lectine [297]. EBOV utiliserait donc différents récepteurs en fonction du type de cellules à infecter.

Toujours d'après le modèle d'autres virus similaires, le rôle des cathepsines a été étudié. Les cathepsines B et L (CatB et CatL), des cystéines protéases endosomales, agiraient sur l'entrée du virus dans la cellule grâce à la protéolyse de la GP1 [298]. Les pseudovirions présentant la GP1 clivée (de 19 kDa au lieu de 130 kDa) seraient plus infectieux et résisteraient aux effets des inhibiteurs de CatB et des petits ARN interférant (siRNA). Leur présence serait donc nécessaire mais non suffisante à l'infection de pseudovirions VSV-GP, car un troisième facteur endosomal ou lysosomal interagirait alors avec la GP2 dont l'accès est facilité pour déclencher la fusion [299]. Récemment, 3 des membres de la famille Tyro3 récepteurs des tyrosines kinases ont été identifiés comme éléments du mécanisme d'entrée. Leur implication a été confirmée par l'augmentation de l'infection de cellules de lignées non permissives les exprimant, et par la diminution de l'infection en présence d'anticorps anti-Tyro. De plus, la distribution des récepteurs Tyro3 correspond au tropisme des filovirus [300]. Enfin, différentes autres études ont montré l'implication du cytosquelette (microtubules et microfilaments) [301], et le rôle de différents domaines des GP1 et GP2 [139, 302, 303].

En résumé, le mécanisme d'entrée d'EBOV dans les cellules cibles n'est toujours pas défini. Cependant, les expériences d'infection avec des virus recombinants exprimant la GP permettent de penser que EBOV utiliserait différents récepteurs en fonction du type de cellules à infecter. EBOV entrerait dans la cellule au niveau des endosomes, dont le pH bas faciliterait la fusion, grâce à la fixation de la GP membranaire avec différents récepteurs dont le récepteur folate-α, les lectines de type C DC-SIGN ou hMGL, de la famille Tyro3 de tyrosines kinases, ou suite au clivage de la GP1 par des protéases afin de faciliter l'accès de la GP2 à un (des) facteur(s) de fusion à déterminer.

b. Transcription et réplication

La transcription et la réplication d'EBOV ont lieu dans le cytoplasme des cellules infectées. La transcription débute, comme pour les autres virus à ARN négatif non segmenté, au niveau d'une petite séquence amorce de polarité positive. L'ARN génomique est alors transcrit en 8 ou 9 ARNm monocistroniques codant pour 8 ou 9 protéines et complémentaires de l'ARN génomique [287, 304]. Les extrémités 5' et 3' portent les

signaux d'initiation et de terminaison de transcription qui comportent le motif conservé 3'-UAAUU-5'. Le site de terminaison de transcription en 3' comporte un signal de polyadénylation.

Le promoteur de réplication est bipartite : un premier élément serait situé dans la région leader du génome, le second élément se trouverait en aval, dans la région 3' non traduite du premier gène. La séparation des 2 éléments serait indispensable à la réplication, bien que le contenu de cette séquence ne soit pas important [305]. La réplication est inhibée par la protéine antivirale zinc finger (ZAP). Cette protéine fixerait les transcrits du gène de la polymérase L sur ses 2ème et 4ème motifs en doigt de zinc, avant d'affecter les taux d'ARN génomique et antigénomique [306].

c. Sortie de la cellule

La protéine de matrice VP40 joue un rôle central dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Cependant, d'autres protéines virales interviennent dans ces processus. L'influence des différentes protéines virales dans l'assemblage et la sortie de particules virales a été étudiée par co-transfection de cellules mammifères. Les protéines virales (VP) 35 et 24 ainsi que la nucléoprotéine (NP) sont nécessaires et suffisantes pour l'assemblage de la nucléocapside. Par tomographie électronique, une technique de reconstruction pleiomorphique haute résolution de macromolécules complexes en 3D, des structures ressemblant à la nucléocapside ont été observées dans le cytoplasme de cellules exprimant ces 3 protéines. Ces structures étaient des hélices gauches à petits sillons, ce qui correspond aux nucléocapsides observées chez les autres virus à ARN négatif non segmenté [307]. La formation de la nucléocapside n'a lieu que si la NP est O-glycosylée et sialisée [308]. Les protéines VP35 et VP40 en interaction suffisent pour incorporer un mini génome dans des particules pseudo virales [309]. L'expression par des cellules transfectées de la GP augmente la sortie de pseudovirions, suggérant un rôle de la GP membranaire dans le bourgeonnement [310]. Le bourgeonnement médié par la protéine de matrice est augmenté en présence de la NP ou de la GP, l'augmentation étant plus importante lorsque les 2 protéines sont présentes simultanément [311]. Les processus d'assemblage et de bourgeonnement nécessiteraient donc des interactions entre les protéines VP40, VP24, VP35, NP et GP. Sur la base de ces interactions potentielles, le rôle des différentes protéines a été étudié des points de vue

structurel et biochimique dans des cellules transfectées par différentes combinaisons de protéines virales et des cellules infectées par EBOV. Cette étude montre que l'interaction entre la VP40 et les nucléocapsides, formées par un noyau de NP auquel s'associent les VP35 et VP24, permettrait leur transport au site d'assemblage grâce à l'utilisation des microtubules cellulaires. Enfin, 80% des virions issues de cellules infectées par EBOV et la quasi-totalité des particules pseudovirales issues de cellules transfectées possédant une nucléocapside bourgeonnait horizontalement. Le mode majoritaire de bourgeonnement d'EBOV serait donc parallèle à la surface cellulaire, quand les particules virales sans nucléocapside bourgeonnent perpendiculairement à la surface [94].

Les filovirus sortent généralement des cellules infectées par bourgeonnement, pouvant conduire à la mort cellulaire. Cependant un bourgeonnement intracellulaire et une accumulation des particules virales dans les vacuoles ont été observés pour MARV et pourraient être utilisé par le virus pour échapper à la surveillance du système immunitaire [183]. Le processus de bourgeonnement pourrait avoir lieu au niveau de la membrane plasmique, où la GP virale est incorporée, grâce à des interactions entre les différentes protéines virales assemblées et des constituants cellulaires [282]. Dans des cellules polarisées, la GP exprimée seule se situe dans la partie apicale de la cellule, quand MARV bourgeonne dans sa partie basale. Des facteurs autres que les protéines de surfaces interviendraient alors dans le bourgeonnement [312].

La GP des filovirus présente des similitudes structurelles avec les protéines d'enveloppe du VIH et du virus Influenza [313], regardons comment s'effectue la sortie des rétrovirus de la cellule infectée.

La machinerie cellulaire de conjugaison à l'ubiquitine par le biais du domaine L des protéines virales de matrice joue un rôle crucial dans le bourgeonnement de différents groupes de virus enveloppés [314]. La mono-ubiquitination fonctionne comme un signal de dégradation qui utilise un mécanisme différent de la poly-ubiquitination, signal de reconnaissance pour la dégradation des protéines par le protéasome. Contrairement à d'autres signaux d'internalisation contenus dans la séquence primaire de la protéine, le signal d'internalisation de l'ubiquitine est contenu dans sa structure tridimensionnelle, ce signal dirige les protéines vers une dégradation ou une régulation négative par endocytose [315-317]. La sortie des rétrovirus des cellules infectées est réduite en présence d'inhibiteur du protéasome (réduction de la quantité d'ubiquitine libre). Cependant, l'effet est reversé par la sur-expression d'ubiquitine libre ou fusionnée à la protéine virale

d'enveloppe. L'ubiquitination, et surtout celle de la protéine virale d'enveloppe, serait une étape du processus de bourgeonnement des rétrovirus [318].

Les protéines Gag de nombreux rétrovirus et les protéines de matrice de rhabdovirus et filovirus contiennent des domaines jouant un rôle crucial dans la séparation des particules virales de la membrane plasmique. Ils sont appelés domaines tardifs ou L (late domains) à cause de leur influence sur la dernière étape du bourgeonnement. Il existe 3 classes de motifs (PTAP, PPxY, YxxL ; x = n'importe quel acide aminé) dont l'intégrité semble essentielle à l'activité du domaine L, suggérant une interaction avec un (ou des) composant(s) cellulaire(s). Les 3 classes sont représentées chez les rétrovirus et les protéines de matrice des *rhabdoviridae* contiennent la séquence PPxY [319]. Les filovirus se démarquent par la présence dans la protéine de matrice de 2 motifs chevauchants PTAPPxY (séquence IL<u>PTAPPEY</u>MEA), tous 2 participant à la sortie du virus. L'étude de la contribution relative de ces 2 motifs suggère le recrutement d'enzymes déubiquitinylantes (facteurs de classe E intervenant dans la dégradation des protéines), ainsi que la nécessité de différents cofacteurs cellulaires recrutés par les domaines L pour le bourgeonnement [320]. Le motif PPxY interagit plus particulièrement avec des protéines cellulaires comportant un domaine WW, domaines riches en tryptophanes. La famille des E3 ubiquitine protéines ligases contient plusieurs domaines WW [321]. Ces ligases sont situées au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans l'endocytose [322]. La protéine de matrice du Vesicular Stomatitis Virus (VSV) et du virus de la rage, 2 représentant des *Rhabdoviridae*, proches des filovirus, interagissent physiquement et fonctionnellement avec l'ubiquitine protéine ligase de Levure Rsp5 [323]. Les oligomères de la protéine de matrice VP40 d'EBOV interagirait avec l'homologue humain de Rsp5, Nedd4, par le biais des domaines WW et du motif viral PPxY [324]. La protéine cellulaire Nedd4 régulerait la sortie des virions. En effet, lorsque le site actif de cette ubiquitine protéine ligase est détruit par mutagenèse, le virus ne sort plus des cellules infectées. Les domaines tardifs contenant le motif PPxY utiliseraient spécifiquement les facteurs de la classe E3 dans le processus de bourgeonnement [325].

Chez les *Rétroviridae*, dont le représentant étudié était le VIH-1, le domaine L contient le motif PTAP, également présent chez les filovirus. Afin de découvrir quel facteur cellulaire interagit avec le motif PTAP, une banque d'ADNc humain a été screenée, résultant en l'hybridation du gène codant pour Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101), facteur impliqué dans le tri des protéines. La déplétion de Tsg101 par des petits ARN interférant (siRNA) arrête le bourgeonnement à une étape tardive, le processus de sortie du

VIH-1 ne reprend que lorsque Tsg101 est réintroduit. Le bourgeonnement de rétrovirus infectieux nécessiterait une machinerie de tri des protéines fonctionnelles, le rétrovirus utiliserait la machinerie cellulaire pour sortir par les différents corps multivésiculaires du lysosome [326]. La présence du motif PTAP dans le chevauchement du domaine L des filovirus permet l'interaction des protéines de matrice avec le facteur cellulaire Tsg101, interaction essentielle à la progression du bourgeonnement [327]. La fixation de la protéine virale VP40, quelle que soit sa conformation, au facteur cellulaire Tsg101 augmente la sécrétion de virions.

Les facteurs cellulaires Nedd4 et Tsg101 pourraient jouer des rôles complémentaires dans les étapes tardives d'assemblage en recrutant les facteurs cellulaires nécessaires au bourgeonnement par 2 voies indépendantes, et pourraient aider ainsi à franchir la barrière énergétique requise pour la fission des membranes cellulaires et virales par l'utilisation des vésicules du lysosome [324, 325, 328]. Le rôle des corps multivésiculaires dans le transport de VP40 et la formation de la membrane virale a été mis en évidence pour MARV [329, 330].

V.5. Protéines et leurs fonctions

a. Nucléoprotéine

La nucléoprotéine (NP) est produite par le premier gène situé à l'extrémité 3' du génome d'EBOV. Composée de 739 acides aminés, elle a un poids moléculaire de 104 kDa [331], poids beaucoup plus élevé que les nucléoprotéines des autres virus à ARNnns dont les poids moléculaires varient de 42 à 68 kDa [332, 333]. La partie N-terminale est hydrophobe alors que la partie C-terminale est hydrophile et très acide. La NP est une phosphoprotéine structurale majeure, la forme phosphorylée étant la seule incorporée dans les virions [282, 334]. L'analyse comparative des séquences protéiques des virus MAR et EBO montre une forte homologie pour les 400 acides aminés de la partie N-terminale. Par contre, la partie C-terminale est moins conservée, et une petite région située au milieu de la protéine est fortement homologue à d'autres virus à ARNnns tels que *Paramyxoviridae* et *Rhabdoviridae* [335].

La NP possède un double rôle fonctionnel et structural. En premier lieu, les systèmes de cotransfection et de minigénomes artificiels ont montré que la NP est indispensable à la réplication, à la transcription et à l'encapsidation des virions [288, 336]. La caractérisation de variants adaptés aux souris a montré la présence de nombreuses substitutions dans la séquence de la NP, suggérant une éventuelle contribution à la virulence par le biais de la transcription et la réplication [337]. En second lieu, la NP, O-glycosylée et sialylée, est une des 4 protéines de la nucléocapside [308], son caractère phosphorylé lui permettant de se lier à l'ARN pour former le complexe ribonucléocapsidique. La microscopie immunoélectronique a permis de visualiser de larges agrégats dans lesquels la NP s'assemble en structure tubulaire hexagonale, similaire aux nucléocapsides, que ce soit en l'absence d'autres protéines virales [93], ou associée à 2 autres protéines [307]. Les acides aminés 1 à 450 de la région N-terminale sont importants pour cet auto-assemblage de la NP en structure tubulaire. Les 150 acides aminés suivant sont impliqués dans la formation de la nucléocapside par interaction avec les protéines virales de 30 et 35 kDa (VP30 et VP35) et pour la réplication [283, 338]. Enfin, les extrémités C- et N-terminales (dont les 50 derniers acides aminés de cette partie) seraient essentielles pour l'interaction avec la VP40 [311], interaction qui permettrait le transport de la nucléocapside vers la membrane plasmique, la partie C-terminale seule étant importante pour l'encapsidation des virions [94, 339].

b. Protéine virale de 35 kDa (VP35)

Cette protéine est codée par le 2è gène du génome. La VP35 a un poids moléculaire de 35 kDa et est composée de 340 à 351 acides aminés [287, 340]. Comme la NP, elle existe sous les formes phosphorylées et non phosphorylées, mais contrairement à la NP, la forme non phosphorylée seule est présente dans les virions [332, 334]. Par sa situation dans le génome et son caractère phosphorylé, la VP35 pourrait être l'analogue de la phosphoprotéine P de Paramyxovirus et Rhabdovirus.

La VP35 est une des protéines composant la nucléocapside, où elle interagit avec la NP et la polymérase (L) pour former un complexe tripartite NP-VP35-L [283, 308]. L'étude de minigénomes artificiels a montré que l'interaction de la VP35 avec la protéine de matrice suffirait pour encapsider le génome. De plus, la VP35 permettrait de fixer l'ARN

génomique à la nucléocapside [309]. Cette protéine est donc indispensable à la transcription, la réplication et l'encapsidation des virions [288, 336].

La recherche d'un vaccin contre EBOV a montré l'induction d'une réponse immune, mais une protection contre le challenge seulement sur des souris C57BL/c [126]. Cela ouvre la voie à l'étude de l'influence de VP35 sur le système immunitaire et la réaction immune de l'hôte. Il s'avère que la VP35 inhibe l'induction des gènes antiviraux en bloquant l'activation par IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3), facteur de transcription cellulaire important pour l'initiation de la réponse interféron (IFN) de la cellule hôte [341]. L'activation de IRF-3 se ferait par surexpression de l'hélicase cellulaire RIG-I [342]. La VP35, en fixant l'ARN double-brin, bloquerait donc l'induction de la réponse IFN, l'induction du promoteur IFN-β ainsi que la réponse antivirale induite par l'IFN-α [206, 342, 343]. La mutation du domaine en C-terminal de la VP35 qui intervient dans l'inhibition de IRF-3 ne perturbe pas la transcription ni la réplication. Les 2 fonctions de la VP35 seraient donc distinctes [344].

c. Protéine virale de 40 kDa

Produite par le 3è gène, la protéine virale de 40 kDa est composée de 326 acides aminés [340]. Cette protéine n'est pas associée au complexe ribonucléocapsidique. La VP40 se comporte comme une protéine associée à la membrane, de part sa position sous-membranaire et son abondance dans les virions. Elle correspondrait donc aux protéines de matrice des autres virus à ARNnns [330, 345]. La VP40 aurait un rôle dans la réplication et l'encapsidation des particules virales.

L'étude de minigénomes ARN artificiel montre que l'interaction entre la VP35 et la VP40 suffit pour son encapsidation [309]. La cotransfection de cellules et l'étude par microscopie électronique à transmission montre que VP40 intervient dans le transport de la nucléocapside vers la surface cellulaire, où son interaction avec la NP permet l'incorporation de la nucléocapside dans les virions [94]. Enfin, l'expression de VP40 seule dans des cellules mammifères est suffisante pour induire la formation de particules filamenteuses semblables aux virions, probablement par auto-agrégation de la VP40 [346]. En effet, la VP40 s'associe en octamère capable de lier l'ARN. La mutation des 2 acides aminés impliqués dans l'oligomérisation a abouti à une inhibition partielle ou totale de la fixation de l'ARN sans incidence sur l'encapsidation. L'oligomérisation de la VP40 n'est

pas essentielle pour l'encapsidation, mais est indispensable pour la fixation à l'ARN et la réplication [347].

La VP40 présente un motif conservé riche en prolines dans sa partie N-terminale. L'interaction physique et fonctionnelle de ce motif avec une ubiquitine protéine ligase suggère une rôle important dans le bourgeonnement des virions et l'existence d'un domaine L [321].

Les domaines L (late) ou tardifs permettent l'interaction entre une protéine virale et des facteurs cellulaires. Ce sont des motifs très conservés connus pour l'interaction protéine-protéine dans la cellule hôte. Ils sont appelés domaines tardifs car ils interviennent dans la dernière étape du bourgeonnement. Il existe 3 classes de motifs : (i) PxxP, dont un exemple est le motif PTAP présent entre autres chez le rétrovirus VIH-1, ce motif interagit préférentiellement avec le domaine SH3 (Src homology 3) présent dans des protéines ayant une fonction GTPase, ligase, ou phosphatase ; (ii) PPxY, présent par exemple dans le Rhabdovirus Vesicular Stomatitis Virus (VSV), ce motif interagit avec les domaines riches en tryptophane (domaine WW) présent dans de nombreuses protéines aux fonctions variées ; (iii) YxxL. La particularité d'EBOV réside dans le chevauchement de 2 motifs PTAPPxY. De nombreux résultats suggèrent que le domaine L de la VP40 et la machinerie d'ubiquitination cellulaire interagissent. Cette interaction permettrait de diriger les protéines virales vers l'endocytose ou par la voie biosynthétique vers les corps multivesiculaires [319].

Les 2 motifs présents dans la VP40 d'EBOV sont impliqués dans la sortie des particules virales. Leur contribution relative diffère lorsqu'ils sont transférés dans d'autres virus [320]. La mutation de l'un ou l'autre motifs, ou des 2, atténue légèrement le pouvoir infectieux du virus. Le domaine L ne serait pas indispensable à la réplication, mais permettrait plutôt d'en améliorer l'efficacité [348]. Les 2 motifs recrutent 2 protéines aux fonctions différentes. L'étude des interactions *in vitro* a montré que le motif PPxY, situé en N-terminal de l'héxamère VP40, se lie avec le domaine WW de Nedd4, une ubiquitine protéine ligase. Quant au motif PTAP, il se fixerait au domaine inactif de conjugaison de l'ubiquitine présent en N-terminal de Tsg101 [324]. Il est intéressant de remarquer que l'interaction du facteur cellulaire Tsg101 avec la protéine de matrice de MARV se réalise par le biais d'un motif PPxY [349]. La VP40, par le biais du domaine L, recruterait par 2 voies indépendantes des facteurs cellulaires aux rôles complémentaires dans l'étape tardive d'encapsidation.

d. Protéine virale de 30 kDa

Cette protéine issue du 5è gène tient son nom de son poids moléculaire de 30 kDa. Composée de 260 acides aminés, sa partie C-terminale est hydrophobe, son milieu est neutre, et sa partie N-terminale est hydrophile et très basique. Cette partie positivement chargée pourrait interagir dans la nucléocapside avec la région basique C-terminale de la NP, ou interagir avec l'ARN génomique [283, 287]. La VP30 est une phosphoprotéine minoritaire dans les virions [332]. L'étude de minigénomes artificiels de MARV a montré que la VP30 n'était pas nécessaire à la réplication ni à la transcription [288]. Cependant, la même étude sur EBOV a montré que la VP30 était indispensable à la transcription [336]. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant au rôle de la VP30 dans la transcription. Elle pourrait agir soit comme un régulateur positif de l'initiation de la transcription, soit comme un facteur d'élongation lors de la synthèse d'ARNm ou lors de la polyadénylation, soit stabiliser l'ARNm.

Récemment, la structure tridimensionnelle de la partie C-terminale de la VP30 a été résolue à 2Å. La structure montre que la VP30 s'associe en hélice homodimère, cette hélice s'assemblant ensuite en héxamère dans les virions. L'étude par mutagenèse a montré que 2 clusters basiques de cette partie seraient requis pour interagir avec la nucléocapside [350].

e. Protéine virale de 24 kDa

Produite par le 6è gène, cette protéine se compose de 251 acides aminés pour un poids moléculaire de 24 kDa [287, 332]. La VP24 constitue la 2è protéine de matrice, elle est localisée dans la région périnucléaire ou au niveau de la membrane plasmique en forte association avec la membrane lipidique. Elle s'associe préférentiellement en tétramères, probablement par sa partie N-terminale. Cette capacité d'oligomérisation et son interaction avec les membranes lipidiques suggèrent un rôle dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales [351]. En effet, contrairement aux autres protéines virales, la VP24 n'est pas indispensable pour la réplication, ni la transcription, et l'encapsidation de mini génomes est possible en son absence [311, 352]. Cependant, des changements de composition du complexe ribonucléoprotéique (RNP) ont été observés en l'absence de

VP24. Cette protéine serait probablement essentielle pour la formation correcte et fonctionnelle du complexe RNP [94, 353]. Enfin, la caractérisation de variants adaptés au cochon d'Inde a montré la présence de mutations dans la VP24, ce qui suggère un rôle dans l'acquisition de la pathogénicité [96]. Cette hypothèse est étayée par la mise en évidence récente de l'inhibition du signal IFNα/β et IFNγ par la protéine VP24. En effet, la VP24 bloquerait l'accumulation dans le noyau de la protéine phosphorylée PY-STAT1, étape clé dans la voie de signalisation par les IFN. De plus, VP24 interagirait avec la karyophérine α1, récepteur du signal de localisation de STAT1. Cette interaction VP24-karyophérine α1 empêcherait l'interaction entre les protéines cellulaires karyophérine α1-PY-STAT1, inhibant la signalisation par les IFN [354].

f. RNA Polymérase

Codée par le dernier gène du génome, le gène L, c'est une protéine de 2212 acides aminés, dont le poids moléculaire calculé est de 252 kDa. La comparaison des séquences de la protéine L d'EBOV et d'autres représentants de l'ordre de *Mononégavirales* montre la présence de plusieurs domaines communs, qui permettent d'identifier la protéine L comme l'ARN polymérase ARN-dépendante [355]. La caractérisation du gène L de MARV montre que la partie N-terminale contient les sites enzymatiques communs aux virus à ARNnns, la partie C-terminale étant plus variable et spécifique du virus [356].

g. Glycoprotéines

La glycoprotéine membranaire est codée par le 4^{è} gène. La particularité de ce gène réside dans l'existence de 2 phases ouvertes de lecture (ORF) qui se chevauchent sur un nucléotide et qui sont transcrites dans 2 cadres de lecture différents. La zone de jonction entre ces 2 ORF comporte une succession de 7 bases Uridine qui correspond au site d'édition. Lors de la transcription, une base Adénosine est ajoutée par édition pour 20% des ARNm qui possèdent donc une suite de 8 bases Adénosine. Les 80% des ARNm non édités gardent les 7 adénosines initiales [123, 357]. La traduction des ARNm 7A produit une GP structurale tronquée, codée seulement par l'ORF I, soluble dans le milieu

extracellulaire ou le sang de patients infectés. L'ARNm 8A synthétise la GP transmembranaire codée par les 2 ORF et présente à la surface des virions (Figure 12).

Il est intéressant de remarquer l'existence de variant viraux dont l'ARN génomique comporte 8 bases Uridine. La transcription de ces variants produit dans 80% des cas des ARNm possédant 8A, 10% d'ARNm édités comportant 6A ou 9A après délétion ou insertion d'une base Adénosine. Ces ARNm édités codent alors pour une petite glycoprotéine soluble, la ssGP [358].

L'ajout d'une base supplémentaire pourrait être imputé à un glissement du ribosome sur cette séquence poly U suite à une pause de la polymérase. Cependant, la transcription d'un plasmide d'expression de la GP par une polymérase ADN-dépendante (le système vaccinia virus / T7 polymérase) synthétise les mêmes glycoprotéines, totale ou tronquées, avec l'addition d'une base supplémentaire. Bien que le changement de cadre de lecture ne puisse pas être complètement exclu, l'édition est suffisante pour expliquer la présence des différentes GP détectées [357].

L'édition a un rôle important dans la pathogénicité et la propagation du virus. Afin de bloquer l'édition par glissement du complexe de transcription, 2 bases adénosine du site d'édition ont été mutées en bases guanosine. Au lieu de produire 80% de GP soluble, le virus recombinant produisait exclusivement la GP membranaire. Cette sur-expression entraînait la mort des cellules infectées, probablement par épuisement de la machinerie cellulaire, bloquée par la quantité de GP à maturer. Ainsi, en régulant le rapport de GP membranaire/GP soluble, l'édition permet de réduire la cytotoxicité du virus [359].

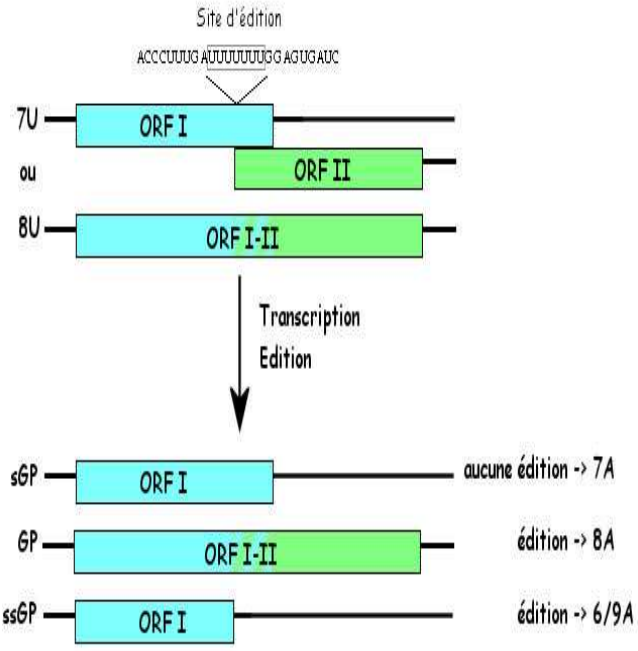


Figure 12 : Représentation schématique du site d'édition dans le 4è gène codant pour les différentes glycoprotéines de ZEBOV, d'après Volchkov et al. [357] et Sanchez et al. [123]. Les 2 ORF représentées par les rectangles colorés se chevauchent et le cadre de lecture de l'ORF II est en décalage d'un nucléotide. Les traits aux 2 extrémités du gène correspondent aux séquences non codantes. Après transcription et édition des ARN génomique comportant 7 ou 8 bases Uridine au site d'édition, les GP sont produites, soit entière et transmembranaire, soir tronquées et secrétées dans le milieu extracellulaire.

La glycoprotéine membranaire

La glycoprotéine membranaire est produite par le 4ème gène. Son ARNm contient 2 ORF chevauchantes, la traduction de la première ORF est initiée par 2 codons AUG en phase, le deuxième codon étant le plus utilisé. Après édition et ajout d'une base adénosine, la protéine synthétisée contient 676 acides aminés, pour un poids moléculaire calculé de 75 kDa. Le centre de la GP est hydrophile et variable, les extrémités sont hydrophobes, hautement conservées. L'extrémité C-terminale servirait d'ancre membranaire pour la GP dont l'extrémité N-terminale serait au contact du milieu extracellulaire [287].

La GP de MARV est présente à la surface des virions sous forme d'homotrimère [360]. Dans les cellules infectées, 3 espèces ont été identifiées selon leur degré de maturation : le précurseur non glycosylé de 90 kDa, le précurseur de 140 kDa après addition des mannoses, la protéine mature clivée de 170 à 200 kDa après conversion des sucres liés à l'azote et addition d'oligosaccharides O-liés. L'étude de ce processus de maturation a montré que la N-glycosylation est nécessaire au transport de la GP vers la membrane plasmique [361].

La comparaison par alignement des séquences peptidiques des GP de MARV et d'EBOV a permis de prédire des sites de clivage dans la région basique N-terminale, la région centrale hydrophobe et la région polaire C-terminale [287].

La maturation de la GP transmembranaire d'EBOV implique une suite d'évènements co- et post-traductionnels (pour revues voir ref. [362] et [358]). La traduction de l'ARNm produit dans le réticulum endoplasmique un premier précurseur de 110 kDa, préGP$_{er}$, auquel sont ajoutés des oligomannosides sur les positions N. Dans l'appareil de Golgi, la maturation de ce deuxième précurseur de 160 kDa, préGP, continue sur les oligomannosides pour aboutir à une protéine N- et O-glycosylée. La majorité des sites glycosylés se situent dans la région centrale de la GP [287]. La délétion des sites de O-glycosylation entraîne une amélioration de la maturation et de l'incorporation e la GP dans des particules pseudovirales. La délétion des sites de N-glycosylation n'a pas d'impact significatif, excepté pour 2 résidus conservés, le premier site de glycosylation proche de la cystéine impliquée dans le pont dissulfure (Asn 40) et le résidu Asn 296 situé dans la région variable « mucin-like ». Ces 2 sites de glycosylation seraient impliqués dans la

conformation tridimensionnelle de la GP [363]. La protéolyse du préGP a lieu dans l'appareil de Golgi et génère la protéine mature $GP_{1,2}$ dont les 2 parties protéiques sont liées par un pont dissulfure (A et B Figure 13). La GP_1 (140 kDa) correspond à la partie N-terminale de la préGP et GP_2 (26 kDa) en est la partie C-terminale. La $GP_{1,2}$ est présente dans l'appareil de Golgi et dans l'enveloppe des particules virales où elle est associée en homotrimère [364].

Le site de clivage identifié par mutagénèse dirigée se situe au niveau du motif $_{497}$RTRR$_{501}$, potentiellement un motif de reconnaissance pour les proprotéines convertases. La protéolyse serait effectuée par une endoprotéase, probablement la furine convertase. Seules des preuves indirectes permettent d'émettre cette hypothèse. En effet, la GP n'est pas protéolysée lorsqu'elle est exprimée dans des lignées cellulaires déficientes en furine [365]. Il en est de même lorsqu'un ou plusieurs acides aminés du site de clivage ont été mutés [364, 366]. La faible sensibilité au clivage par la furine de la GP de l'espèce *Reston*, espèce la moins pathogène d'EBOV, suggère que la protéolyse joue un rôle déterminant dans la pathogénicité [364]. Cependant, lorsque le motif de reconnaissance de la furine est altéré, les virions produits, qui comportent des GP non clivées, se sont révélés viables et capables d'infecter différentes lignées cellulaires ou des primates sans différence significative entre l'infection par des virions dont la GP n'est pas clivée et l'infection par le virus sauvage [365, 367]. Ces résultats suggèrent que le clivage puisse *in vitro* ne pas être nécessaire pour l'activité et la fonction de la GP. Toutefois, ces résultats n'excluent pas la nécessité du clivage *in vivo*, ou un clivage par une autre classe d'enzymes [365, 366]. En effet, l'analyse de l'infection de lignées cellulaires déficitaires en protéases ou en présence d'inhibiteurs de protéases a permis d'identifier la cathepsine B, et à un moindre degré la cathepsine L, comme des protéases essentielles pour l'entrée d'EBOV dans les cellules [298].

La proximité des protéines des filovirus avec celles des *Paramyxoviridae*, des *Retroviridae* et des *Rhabdoviridae* a été abordée lors d'études visant à déterminer les fonctions des différentes protéines virales. Les fonctions de ces protéines étant similaires et la fonction étant issue de la conformation de la protéine, la comparaison s'est poursuivie pour l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines, et particulièrement de la GP membranaire. Ainsi, la comparaison de la GP d'EBOV et de la protéine transmembranaire du virus du sarcome de Rous (RSV) met en évidence des similitudes pour 181 acides

aminés de la région C-terminale. Cette partie de la GP_2, associée à la membrane, est composée de 2 hélices en orientation anti-parallèle pour former une structure tertiaire en épingle à cheveu dont la boucle serait maintenue par un pont dissulfure. Le premier tiers en C-terminal de l'hélice amphipathique présente 50% d'identité avec le motif immunosuppresseur identifié chez les rétrovirus. Enfin, une séquence de 13 à 16 résidus non chargés et hydrophobes, présentant le plus fort degré d'homologie, pourrait être un peptide de fusion essentiel pour l'entrée du virus dans les cellules (C Figure 13) [296].

La structure tridimensionnelle a été résolue à 3 Å par cristallographie aux rayons X, sur 179 résidus auxquels a été hybridée en N-terminal une queue isoleucine zipper GCN4 afin de faciliter la purification, la solubilisation et la stabilité du repliement de la GP_2. Les résultats ont été comparé aux structures déjà résolues de rétrovirus. Ils confirment le repliement du monomère en épingle à cheveu à 2 hélices et la conservation structurelle du motif immunosuppresseur entre les filovirus et les rétrovirus. De plus, les résultats mettent en évidence l'oligomérisation de la GP en homotrimère déjà observée chez MARV [360]. Les hélices N-terminales de la GP_2 sont assemblées en une hélice α coiled-coil triple brins, stabilisée par des segments brin linéraire-hélice-brin entre les hélices α (D Figure 13). Près de l'extrémité C-terminale du coiled-coil central se trouve une séquence correspondant à une trappe à ions chlorure, dont la conservation suggère un rôle, probablement dans le changement de conformation [368]. La similitude observée entre la conformation en hélice coiled-coil de la GP d'EBOV avec la conformation de la gp41 du VIH suggère une fonction identique dans la fusion membranaire. Les auteurs proposent donc un mécanisme de fusion membranaire basé sur le mécanisme de la gp41 du VIH-1 et de HA2 de Influenza [368-370]. La cristallisation de 74 résidus de la GP_2 insensibles à la protéolyse et la résolution de la structure à 1,9 Å a confirmé les résultats précédents et la similarité de la GP_2 avec les rétrovirus oncogènes, par comparaison avec le virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) [313]. De plus, cette structure du monomère en épingle à cheveu associé en hélices coiled-coil pourrait être la conformation active de la GP2, la structure du monomère permettrait alors l'apposition des 2 membranes virales et cellulaire, mises en présence par l'interaction des 2 hélices, l'hélice C-terminale stabiliserait la conformation [371].

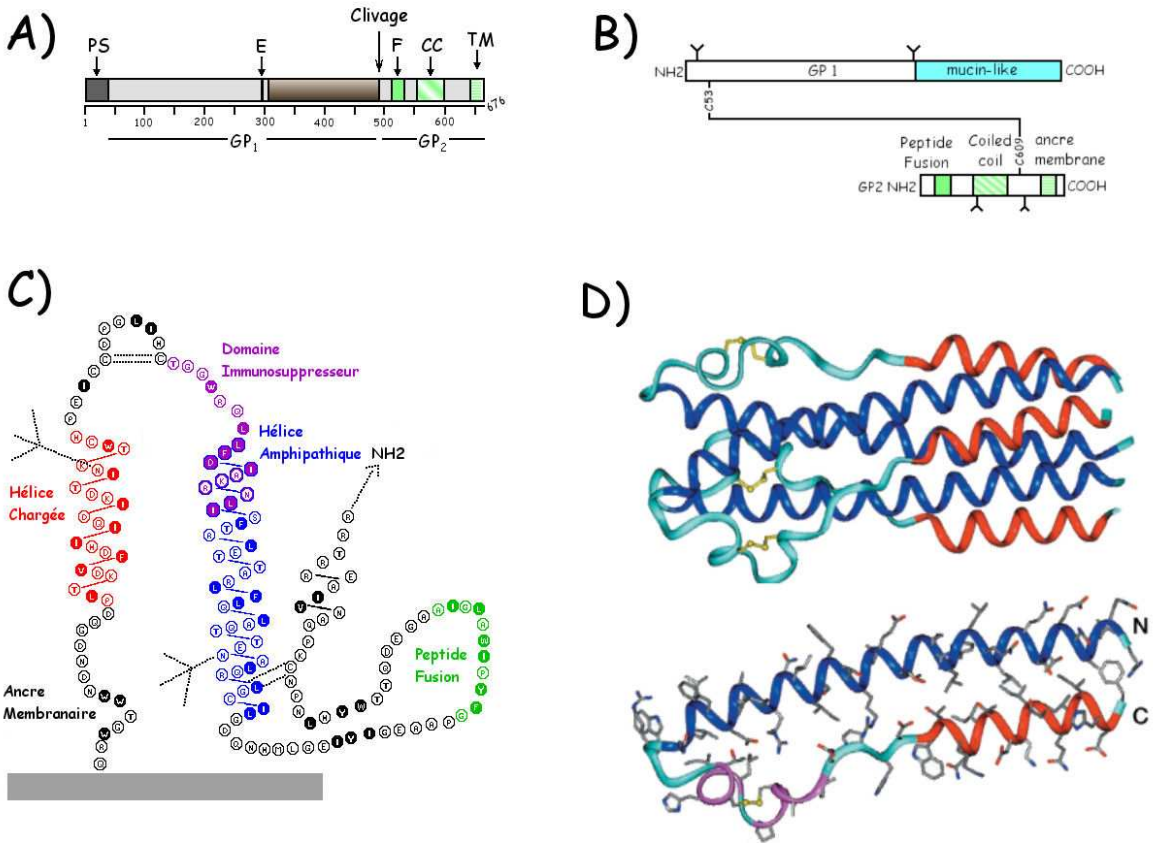


Figure 13 : Structure de la glycoprotéine membranaire d'EBOV. **A)** Représentation schématique de la séquence protéique et des différents domaines des GP_1 et GP_2 codées par les 2 ORF. PS : peptide signal. E : site d'édition. F : peptide de fusion. CC : zone hélicoïdale en coiled-coil. TM : ancre transmembranaire. Le site de clivage est signalé par une grande flèche. **B)** Représentation schématique du pont dissulfure liant les GP_1 et GP_2. **C)** Modélisation de la région C-terminale de la GP_2 selon Gallaher *et al.* [296], par comparaison des séquences protéiques avec la glycoprotéine du virus du Sarcome de Rous (RSV). Les acides aminés sont identifiés par le code 1 lettre encerclé. Les ponts dissulfures sont indiqués par 2 lignes pointillées, les sites de glycosylation par une patte d'oie en ligne pointillée. Les acides aminés hydrophobes sont représentés par un cercle plein. **D)** Structure cristalline à 1,9 Å d'une région de la GP_2 d'après Malashkevich *et al.* [313]. La structure du bas représente le monomère en forme d'épingle à cheveu. Le dernier tour de l'hélice N-terminale ainsi que les petites hélices α et 3_{10} qui suivent (magenta) correspondent au domaine immunosuppresseur. La structure du haut montre l'agencement en coiled-coil des hélices amphipathiques N-terminales (bleu) dans le trimère.

La GP2 est une succession, depuis l'extrémité N-terminale vers la C-terminale, des régions suivantes : peptide de fusion – hélice α amphipathique – domaine immunosuppresseur – petite hélice α fortement chargée – ancre transmembranaire. Chaque domaine prend part au rôle de la GP dans la fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule ainsi que dans le potentiel infectieux du virus.

Situé à proximité du site de clivage (22 résidus) dans une boucle formée par un pont dissulfure, le peptide de fusion est constitué de 10 acides aminés hydrophobes non chargés. Ces résidus sont situés aux mêmes positions que les résidus impliqués dans la fusion membranaire et l'entrée dans la cellule identifiés chez les *Retroviridae* [296]. Sa propriété fusiogénique serait plus liée à son orientation oblique par rapport à la membrane, due à la distribution asymétrique des résidus hydrophobes dans l'hélice, qu'à sa composition en acides aminés [372]. Une étude récente sur le mécanisme d'interaction et de fusion entre la membrane et ce peptide a mis en évidence le rôle essentiel des résidus Tryptophane et Phénylalanine situés aux positions 8 et 12 du peptide de fusion [373]. L'intervention de ce peptide dans la fusion membranaire a été confirmée par mutagénèse dirigée. En effet, la mutation de certains acides aminés de ce peptide affectait le potentiel d'infection de pseudovirus VSV [374].

Du dernier tiers de l'hélice amphipathique à la boucle séparant les 2 hélices, la séquence aminoacide est très homologue au domaine immunosuppresseur des protéines d'enveloppe de différents rétrovirus oncogènes. Cette séquence de 18 acides aminés bloque l'induction des lymphocytes T chez l'hôte, induisant une immunodéficience [203].

La GP transmembranaire est participe au pouvoir infectieux du virus.

D'une part, la GP permet au virus d'entrer dans la cellule grâce à 150 résidus de la région N-terminale de la GP1 mature. Deux groupes d'acides aminés ont été identifiés : ceux dont la mutation rompt l'expression et la maturation de la GP, et ceux dont la mutation inhibe l'incorporation de la GP dans le virion [139, 375]. De plus, la mutation de 2 résidus Phénylalanine (Phe88 et Phe159) annule l'infectiosité du virus mutant [303].

D'une autre part, sous sa forme associée à une particule, la $GP_{1,2}$ active les cellules endothéliales et entraîne une diminution de leur fonction de barrière [376-378]. Plusieurs études mettant la partie transmembranaire de la GP en présence de cultures cellulaires ont montré le détachement des cellules. Cependant, ce phénomène est indépendant de la mort cellulaire, puisque 95% des cellules détachées étaient viables. Le détachement des cellules, corrélé au niveau d'expression de la GP, serait du à la diminution de l'expression des molécules d'adhésion et de nombreuses autres protéines de surface [379, 380]. La GP ne diminuerait pas l'expression globale des protéines, mais agirait particulièrement sur des groupes de molécules spécifiés par leur voie de trafic cellulaire ou leur localisation au niveau de la membrane et dépendant du type de cellule dans lesquelles elle est exprimée

[381]. Cet effet sur les molécules de surface est visible par l'augmentation de perméabilité de la membrane plasmique [302].

Les glycoprotéines solubles

Des glycoprotéines ont été trouvées dans le milieu extracellulaire en l'absence de lyse. Ces GP non structurales pourraient avoir un rôle dans la pathogénicité et interférer avec le mécanisme de défense humorale en agissant comme un leurre. Contrairement à la GP membranaire, les GP solubles se fixent aux neutrophiles par le récepteur FcγIIIRB (CD16b). Elles inhiberaient *in vitro* l'activation précoces des neutrophiles, grâce à l'inhibition de la régulation de la L-sélectine, ce qui affecterait les mécanismes de défense de l'hôte [377]. La GP soluble la plus étudiée, la sGP, perturberait la liaison physique de FcγIIIRB, protéines membranaires des neutrophiles, avec le récepteur du complément de type 3 (RC3), afin de bloquer la signalisation inflammatoire [382]. Cependant, l'absence de GP soluble chez MARV, ainsi que la forte production de ces GP chez l'espèce REBOV, qui pourtant est peu pathogène, réfutent cette hypothèse [383].

Cinq glycoprotéines solubles ont été identifiées dans le sang de patients ou dans le milieu de cultures infectées (Figure 14).

La forme majoritaire de glycoprotéine soluble (sGP) est une protéine de 50 à 70 kDa. En absence d'édition, la production de la sGP est arrêtée à la fin de l'ORF I du 4è gène. La sGP partage donc 364 acides aminés N-terminaux avec la GP membranaire, sa sécrétion est due à l'absence de l'ancre membranaire située à l'extrémité C-terminale [123]. La sGP se présente sous la forme d'un homodimère [384]. L'orientation de l'homodimère est sujet à discussion. Certains auteurs ont décrit un homodimère anti-parallèle, lié par un pont dissulfure entre les cystéines 53 et 306 [385], quand d'autres décrivent une orientation parallèle liée par des ponts dissulfures entre les résidus C53-C53' et C306-C306' [386]. La sGP partage des épitopes avec la GP membranaire, ce qui lui permettrait d'interagir avec et de bloquer les anticorps neutralisants dirigés contre le virus ou les cellules infectées [378].

La petite glycoprotéine soluble (ssGP) est produite dans le milieu de culture de cellules infectées par un variant viral contenant 8 bases Uridine au site d'édition. La ssGP est produite par des ARNm édités comportant 6 ou 9 bases Adénosine. Elle partage l'extrémité N-terminale avec la GP membranaire et la sGP, mais son extrémité C-terminale est

tronquée du à l'utilisation d'un troisième cadre de lecture –2 [357]. La ssGP est un monomère d'un poids moléculaire inférieur de 6,5 kDa à la sGP [385].

La sous-unité GP_1 peut être retrouvée en quantités significatives dans les milieux de culture. La présence de la GP_1 libre est due à l'instabilité du pont dissulfure la reliant à la GP_2 ancrée à la membrane. De même que le pont dissulfure entre HA1 et HA2 du virus Influenza peut être réduit, le pont dissulfure formé avant la protéolyse et liant la GP1 et la GP2 peut être altéré lors de la maturation dans l'appareil de Golgi [383, 385].

Une quantité non négligeable de $GP_{1,2\Delta}$ est présente dans le sang d'animaux infectés expérimentalement. Il s'agit du complexe $GP_{1,2}$ dont l'ancre transmembranaire a été clivée par une métalloprotéinase zinc-dépendante après le résidu Asp637. La $GP_{1,2\Delta}$ est secrétée par les cellules infectées sous forme d'un trimère et pourrait contribuer à la suppression d'immunité observée chez les animaux infectés expérimentalement ; elle absorberait les anticorps destinés à interagir avec le virus ou la cellule infectée [387].

Enfin, la dernière glycoprotéine non structurale secrétée dans le milieu extracellulaire est un petit fragment issu de la maturation par protéolyse de la sGP. Ce petit fragment, appelé peptide Δ, est un monomère fortement O-glycosylé [388]. Son rôle reste encore à déterminer.

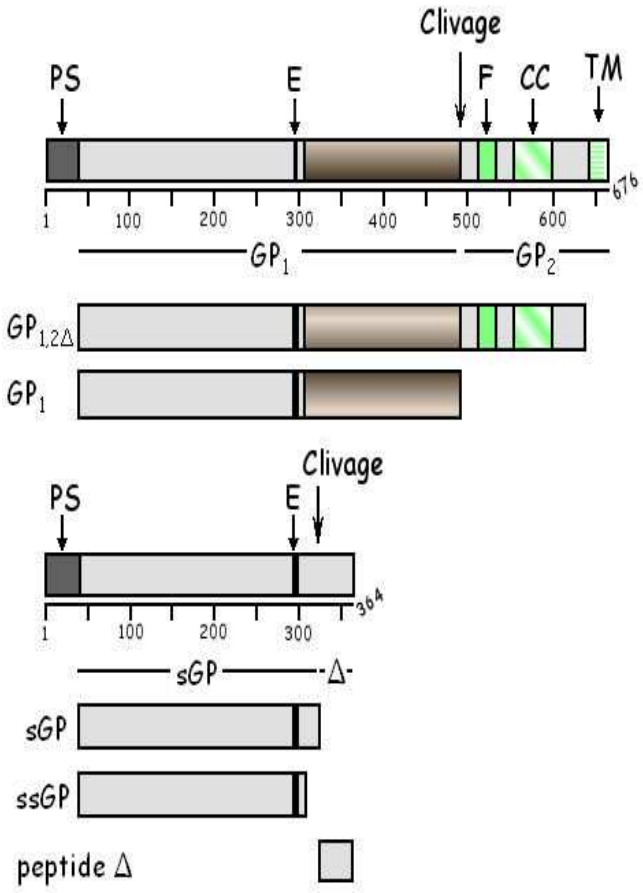


Figure 14 : Représentation schématique des différentes glycoprotéines non structurales secrétées par les cellules infectées par EBOV d'après Wahl-Jensen *et al.* [389]. $GP_{1,2\Delta}$ correspond à la GP exprimée à la surface des virions dont l'ancre membranaire est clivée. GP_1 est libérée dans le milieu suite à l'altération pendant le processus de maturation du pont dissulfure la reliant à la GP_2. sGP est synthétisée à partir d'ARNm non édité. Le peptide Δ est un fragment issu de la maturation de sGP. ssGP est produite à partir d'un ARNm variant dont l'édition résulte en la succession de 6 ou 9 bases adénosines au site d'édition, entraînant l'utilisation d'un 3è cadre de lecture. PS : peptide signal. E : site d'édition. F : peptide de fusion. CC : zone hélicoïdale en coiled-coil. TM : ancre transmembranaire.

VI. Phylogénie moléculaire des souches virales

La grande variabilité du gène codant pour la GP en fait un marqueur phylogénétique très utilisé pour élucider les relations phylogénétiques liant les EBOV et MARV. L'analyse des séquences nucléotidiques de la GP dont la région variable a été supprimée pour un meilleur alignement met en évidence les 4 espèces EBOV qui forment 4 lignées monophylétiques différentes de MARV (Figure 15A). Les gènes de la GP des différentes espèces *Ebolavirus* diffèrent de 55% du gène de *Marburgvirus* au niveau nucléotidique, et de 67% pour la séquence protéique. Les séquences nucléotidiques du gène de la GP des 4 espèces d'EBOV diffèrent entre elles de 37-41%, et de 34-43% pour la séquence aminoacide [123]. Cette analyse met aussi en évidence la grande stabilité du génome d'EBOV. En effet, le gène de la GP ne diffère que de 1,6% entre la souche de la première épidémie à Yambuku en 1976 et celle isolée lors de l'épidémie de Kikwit en 1995, alors que ces 2 épidémies sont distantes de plus de 1000 km et séparées par 19 ans.

L'analyse phylogénétique permet également de caractériser les souches responsables d'épidémies. Les souches issues des épidémies du Gabon en 1994-96 se groupent avec les autres souches de l'espèce *Zaïre*, confirmant leur appartenance à cette espèce. Il est intéressant de noter que ces 3 épidémies correspondent à 3 évènements distincts provoqués par 3 souches et sources différentes [390] (Figure 15B).

Le taux de substitution nucléotidique, calculé en divisant le nombre de substitutions non synonymes (substitutions nucléotidiques qui entraînent un changement d'acide aminé) par le temps séparant l'isolement des souches, est d'en moyenne 3,6 10^{-5} substitutions/site/an. Ce taux de substitution est équivalent à celui des autres virus à ARNnns (entre 10^{-5} et 10^{-3}). Il étaye les résultats des analyses phylogénétiques qui suggéraient la stabilité du génome d'EBOV, probablement due à de fortes contraintes fonctionnelles imposées au génome viral. A partir de ce taux de substitution, les temps de divergence déterminés montrent une séparation des espèces d'*Ebolavirus* de quelques milliers d'années, la séparation serait plus ancienne entre *Ebolavirus* et *Marburgvirus* [391].

La stabilité génétique d'*Ebolavirus* a été démontrée lors de l'épidémie de Kikwit en 1995 et celles du Gabon en 1994-96. En effet, la souche virale responsable d'une épidémie

ne varie pas au long de la chaîne de transmission. De même, les souches virales qui ont causé les épidémies du Gabon étaient identiques chez des patients dont l'issue de la maladie était différente (convalescence, asymptomatique ou décès) [25, 58].

A partir de 2001, de nouvelles épidémies humaines de FHVE ont touché le Gabon et la République du Congo, et des carcasses animales infectées par EBOV ont été trouvées dans les forêts de cette région frontalière. Chaque nouvelle épidémie avait une source distincte, ainsi, 11 nouvelles souches ont pu être isolées et caractérisées. Toutes les épidémies apparues depuis 1976 étaient causées par des souches virales différentes. Ce résultat suggère l'existence de nombreuses souches virales dans le milieu forestier d'Afrique centrale. Ces souches circuleraient au sein de leur hôte naturel, et apparaîtraient dans les populations de grands singes et humaines par le biais de contaminations simultanées et indépendantes des grands singes [26].

En contradiction avec l'hypothèse de la persistance des souches virales dans le milieu forestier est l'hypothèse d'une épizootie constante qui propagerait le virus selon un front avançant. Cette hypothèse se base sur l'analyse des relations phylogénétiques des souches virales et leurs date et lieu d'émergence. En effet, les souches virales issues des épidémies les plus récentes descendent des souches virales plus anciennes, et toutes descendent de la première souche virales isolée à Yambuku en 1976 (Figure 15C). Ceci suggère que les épidémies sont épidémiologiquement liées. De plus, les situations géographiques des épidémies suggèrent un déplacement en fonction du temps. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une épizootie persistante dans les populations de grands singes qui se transmettrait d'individu à individu en progressant vers le sud-ouest puis retournerait vers l'est depuis 1996 (Figure 15D). Les épidémies humaines apparaîtraient sur le front de cette vague lors de contact entre les hommes et les singes [392].

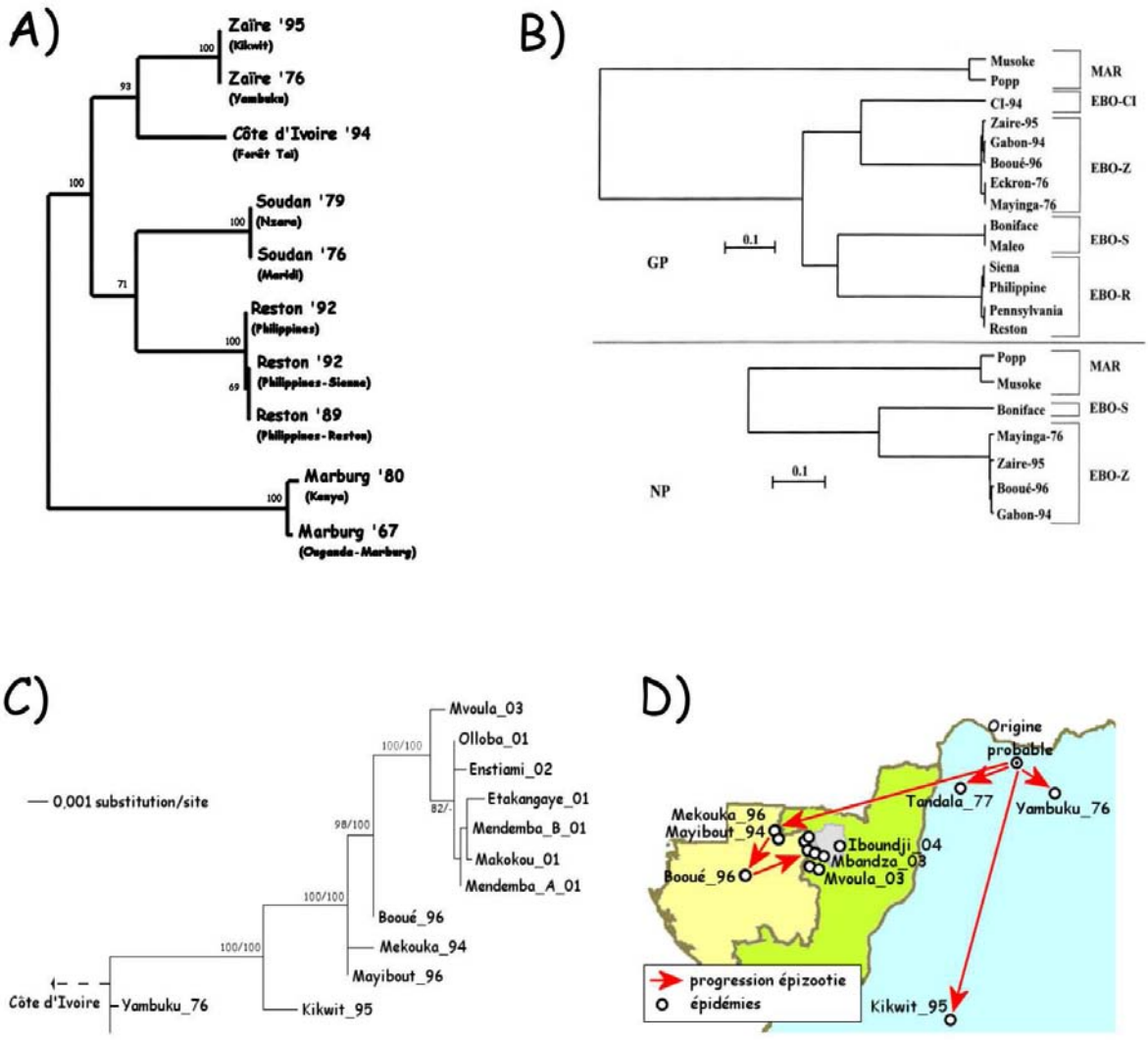


Figure 15 : Analyses phylogénétiques des souches d'*Ebolavirus*. A) Relations phylogénétiques pour les séquences nucléotidiques concaténées du gène de la GP (régions conservées N- et C-terminales). L'arbre, obtenu avec la méthode du Maximum de Parcimonie, permet de distinguer les 3 espèces EBOV des souches de MARV, chaque espèce EBOV représente une lignée monophylétique [123]. B) Analyse phylogénétique sur les séquences prédites d'acides aminés de la GP et la NP. L'arbre, obtenu par la méthode du Maximum de Vraissemblance, montre l'appartenance à l'espèce *Zaïre* des souches responsables des épidémies de 1994-96 au Gabon [25]. C) Analyse phylogénétique sur les séquences nucléotidiques du gène de la GP (excepté une région de 576pb dont l'alignement est incertain). L'arbre, construit avec la méthode du Maximum de Vraissemblance, met en évidence la descendance des souches plus récentes de la première souche isolée à Yambuku en 1976. D) Représentation spatiale de la progression d'EBOV. La corrélation entre la date d'apparition de nouveaux cas de FHVE et la distance géographique par rapport aux autres cas permet d'émettre l'hypothèse d'une épizootie persistante dans les populations de grands singes qui propageraient le virus selon une vague [392].

Problématique

Le risque de nouvelle épidémie de FHVE est constant dans les régions tropicales de l'Afrique, et ses conséquences seraient désastreuses sur les populations de grands singes déjà menacées. Il devient donc urgent de comparer les 2 hypothèses d'émergence avec le maximum de données afin d'établir de meilleures prédictions et stratégies de contrôle. L'information maîtresse manquante à notre compréhension de l'épidémiologie et l'évolution d'EBOV est indéniablement la caractérisation des souches virales circulant parmi les espèces sauvages sensibles.

Grâce aux données uniques collectées sur une période de 5 ans, nous avons pu décrire les premiers isolats de l'espèce ZEBOV obtenus à partir de carcasses de grands singes de la région frontalière Gabon/Congo, ainsi que les 2 dernières épidémies de FHVE humaines.

MATÉRIEL et MÉTHODES

I. Laboratoire P4

La manipulation d'agents pathogènes aussi dangereux que EBOV pour l'individu et la communauté requiert le plus haut niveau de sécurité biologique. Le CIRMF dispose d'un laboratoire de biosécurité de niveau 4, plus communément appelé P4. Il s'agit d'un espace de travail isolé du monde extérieur par 3 sas successifs. Le 1er sas est un simple local dans lequel est un autoclave à double-entrée. Le 2è sas est une salle d'habillement, dont la pression est inférieure à la pression atmosphérique et supérieure à celle du sas suivant. On y revêt une combinaison jetable couvrant le corps entier, des sur-chaussures, un masque anti-poussière et 3 paires de gants en latex. Avant d'entrer dans l'espace de travail, on s'équipe dans le dernier sas d'un masque qui crée une surpression autour du visage grâce à de l'air filtré par des filtres absolus. A la sortie de l'espace de travail, on ôte la combinaison potentiellement contaminée dans ce 3è sas.

L'espace de travail comporte tout le matériel d'un laboratoire (hotte à flux laminaire, étuve à CO_2, centrifugeuse, microscope optique relié à un système vidéo, congélateurs et réfrigétateur, bonbonne d'azote liquide…). De plus, il est équipé d'un isolateur de virus hermétique. Cette boite à gants (ou bulle) est en pression négative par rapport à l'espace de travail et au petit sas présent à son entrée, lui-même en dépression par rapport à l'espace de travail. L'air qui y circule est filtré par 2 filtres absolus. Enfin, l'autre entrée de l'autoclave double-face est scellée hermétiquement dans le mur séparant l'espace de travail du 1er sas, ainsi, les déchets produits dans l'espace de travail et le 3è sas peuvent être décontaminés et sortis en toute sécurité.

Par mesure de sécurité supplémentaire dans cette région où les pluies et orages sont fréquents, le laboratoire P4 est relié à un onduleur d'une autonomie de 30 minutes, qui prend le relais entre le secteur général et un groupe électrogène en cas de coupure de courant généralisée.



Figure 16 : photographies de l'isolateur hermétique du laboratoire P4 du CIRMF, et du travail en combinaison et masque.

II. Matériel biologique

II.1. Chaîne des évènements : du prélèvement au labo

Lors d'épidémies humaines de FHVE, le sang des patients ou des cas contacts était collecté dans des tubes EDTA qui étaient laissés à sédimenter la journée. Lorsque le plasma était séparé du sang total, il était aliquoté et stocké dans une bonbonne d'azote liquide jusqu'au retour au laboratoire du CIRMF, distant de 600 à plus de 1 000 km. Les prélèvements *post-mortem* de peau étaient conservés soit dans du RNA later soit en tubes

secs dans des glacières refroidies par des pains de glace, ainsi que les tampons de prélèvement de salive.

Au laboratoire, les sérums étaient décongelés, aliquotés en tubes de 1ml puis conservés à –80°C jusqu'à utilisation. Les tampons de prélèvement étaient lavés dans du PBS (Phosphate Buffer Saline), lequel était aliquoté et stocké à –80°C avec les tubes de nécropsies.

Les prélèvements animaux étaient collectés soit dans des tubes secs soit dans des tubes contenant du RNA later, puis transportés au CIRMF dans un triple emballage en accord avec les recommandations de l'ONU relatives au transport de matières infectieuses (Annexe 1)

II.2. Prélèvements d'origine humaine

Les séquences de la glycoprotéine des souches virales responsables des épidémies de 2001-2003 proviennent de la banque de gènes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) sous les numéros d'accession suivants :

Nom, souche	GP	NP
Ivory coast ebolavirus	U28006	
Reston ebolavirus		
Pennsylvania 1989	AF034645	
Reston 1989		U23152
Sudan ebolavirus		
Ouganda 2000	AY729654	
Boniface 1976		AF173836
Zaire ebolavirus		
Mayinga 1976	AF086833	AF086833
Kikwit 1995	L11365	AF054908
Mekouka 1994	U77384	Y09358
Booué 1996	AY058898	AY058895
Mendemba B 2001	AY526098	
Olloba 2001	AY526099	
Etakangaye 2001	AY526100	
Makokou 2001	AY526101	
Entsiami 2002	AY526102	
Mvoula 2003	AY526104	
Mendemba A 2001	AY526105	

Les souches virales responsables des épidémies de 2003 et 2005, ainsi que le gène codant la NP des souches virales ci-dessus, ont été caractérisées à partir de sérums humains prélevés lors d'épidémies et conservés au CIRMF à –80°C.

II.3. Prélèvements animaux

Un réseau de surveillance des mortalités animales a été mis en place en 2001 en collaboration avec les Ministères gabonais et congolais de la Santé, et ceux des Eaux et Forêts ainsi qu'avec le WWF (World Wildlife Fund), le WCS (Wildlife Conservation Society) et ECOFAC (Écosystèmes Forestiers d'Afrique Centrale).

Des carcasses d'animaux ont depuis été retrouvées dans 2 sites principaux, l'un à Ekata, village situé à une soixantaine de kilomètre de Mékambo, chef lieu du département de la Zadié dans la province de l'Ogooué Ivindo (Gabon) et l'autre dans la Cuvette Ouest de la République du Congo, notamment au district de Mbomo et dans le sanctuaire de Lossi où la population de primates (Gorilles, Chimpanzés et Céphalophes) a baissé de presque 50% [26].

Les espèces animales échantillonnées, ainsi que leur date et lieu de découverte sont résumés dans le tableau III. Parmi ces prélèvements, seulement 25 proviennent de grands singes (19 gorilles et 6 chimpanzés). En combinant les méthodes de diagnostic, l'infection par EBOV a été confirmée pour 13 gorilles, 3 chimpanzés et une antilope. Cependant, en raison de l'état de décomposition avancée des carcasses, les gènes codant la NP et la GP (séquence entière de 2031 nucléotides (nt) ou courte de 538 nt) ont pu être amplifiés à partir des prélèvements de 6 gorilles et 1 chimpanzé. Ces prélèvements sont surlignés dans le tableau III.

Les coordonnées GPS des carcasses sont indiquées dans le tableau IV et localisées sur la figure 17.

Tableau III : Mortalité animale dans la région frontalière du Gabon/République du Congo entre 2001 et 2006.

n°	Espèce	Date	Localisation	Échantillons	Diagnostic
1	Chèvre	17 déc. 01	Olloba (RC)	Muscle, peau	-
2	Genet	18 déc. 01	Malouma (Gabon)	Muscle, peau	-
3	Gorille	20 déc. 01	Ekata (Gabon)	Muscle, peau	+
4	Genet	21 jan 02		Peau formol	-
5	Genet	13 fév. 02	Ekata (Gabon)	Muscle, peau	-
6	Gorille	23 mars 02	Grand Etoumbi (Gabon)	Moelle osseuse	+
7	Sitatounga	04 avr 02		Muscle	-
8	Gorille	30 avr 02	Ekata (Gabon)	Os broyé	+
9	Gorille	30 avr 02	Ekata (Gabon)	Os broyé	+
10	Gorille	03 déc. 02	Lossi (RC)	Muscle, peau	+
11	Gorille	03 déc. 02	Lossi (RC)	Muscle, peau	+
12	Gorille	03 déc. 02	Lossi (RC)	Os	+
13	Gorille	03 déc. 02	Lossi (RC)	Os	+
14	Chimpanzé	04 déc. 02	Lossi (RC)	Muscle, peau	+
15	Chimpanzé	04 déc. 02	Lossi (RC)	Muscle, peau, foie	+
16	Antilope	03 déc. 02	Lossi (RC)	Os	-
17	Antilope	04 déc. 02	Lossi (RC)	Os	+
18	Chimpanzé	03 fév. 03	Lossi (RC)	Muscle	+
19	Gorille	03 fév. 03	Lossi (RC)	Muscle	+
20	*C. cephus*	03 fév. 03	Lossi (RC)	Muscle	-
21	Faucon	03 fév. 03	Lossi (RC)	Muscle	-
22	Gorille	juin 03	Mbandza (RC)	Muscle	+
23	Gorille	Déc. 03	Odzala (RC)	Peau	-
24	Gorille	10 mai 04	Lokoué (RC)	Moelle osseuse	+
25	Gorille	sept 04	Ouesso (RC)	Peau	-
26	*C. cephus*	20 mai 04	Conkuati (RC)	Intestin	-
27	Chimpanzé	mai 04	Conkuati (RC)	Peau	-
28	Antilope	11 juin 04	Lopé (Gabon)	Muscle	-
29	Antilope	18 juin 04	Lopé (Gabon)	Peau	-
30	Buffle	23 avr 04	Offoué (Gabon)	Intestin	-
31	Buffle	23 oct 04	Petit Loango (Gabon)	Peau	-
32	Buffle	25 oct 04	Petit Loango (Gabon)	Peau	-
33	Buffle	oct 04	Petit Loango (Gabon)	Moelle osseuse	-
34	Éléphant	Oct. 04	Petit Loango (Gabon)	Peau	-
35	Gorille	Nov. 04	Gamba (Gabon)	Os	-

36	Gorille	23 nov. 04	Dja (Cameroun)	Peau	-

Tableau III : suite

n°	Espèce	Date	Localisation	Échantillons	Diagnostic
37	Gorille	jan 05	Dja (Cameroon)	Os	
38	Chimpanzé	jan 05	Dja (Cameroon)	Os	
39	Chimpanzé	jan 05	Dja (Cameroon)	Muscle	-
40	Gorille	juin 05	Odzala (RC)	Peau	-
41	Gorille	juin 05	Odzala (RC)	Muscle	+
42	Gorille	juin 05	Odzala (RC)	Muscle	+
43	Gorille	juil 05	Nouabalé-Ndoki (Gabon)	Peau	-
44	Antilope	20 juin 03	Lossi (RC)	Peau	-
45	Gorille	20 juil 05	Niangui (Sangha, RC)	Peau	-
46	Éléphant	29 nov. 05	Lopé (Gabon)	Muscle	-
47	Chimpanzé	07 juin 06	Nouabalé-Ndoki (Gabon)	Muscle	-
48	Chimpanzé	Nov. 06			-
49	Gorille	23 jan 07	Louame (Sangha, RC)	Peau	-

Tableau IV : Coordonnées GPS des gorilles et du chimpanzé à partir desquels l'ARN viral a pu être amplifié (prélèvements surlignés dans le tableau III) ainsi que les coordonnées des deux dernières épidémies humaines en 2003 et 2005.

Animaux	Région	Coordonnées GPS		Date
GOR1_Ekata_nov2001	Zadié	0.7055 N	14.2747 E	Nov. 2001
GOR1_Lossi_déc2002	Lossi	0.2395 N	14.4938 E	Dec 2002
GOR2_Lossi_déc2002	Lossi	0.2354 N	14.4839 E	Dec 2002
CH_Lossi_fév2003	Lossi	0.2387 N	14.4885 E	Feb 2003
GOR_Mbandza_juin2003	Mbandza	0.6987 N	14.7029 E	Juin 2003
GOR1_Odzala_juin2005	Odzala	0.5166 N	15.0732 E	Juin 2005
GOR2_Odzala_juin2005	Odzala	0.5116 N	15.0667 E	Juin 2005
Mbandza_nov2003	Mbomo	0.6765 N	14.5583 E	Nov. 2003
Etoumbi_mai2005	Etoumbi	0.0350 N	14.8910 E	May 2005

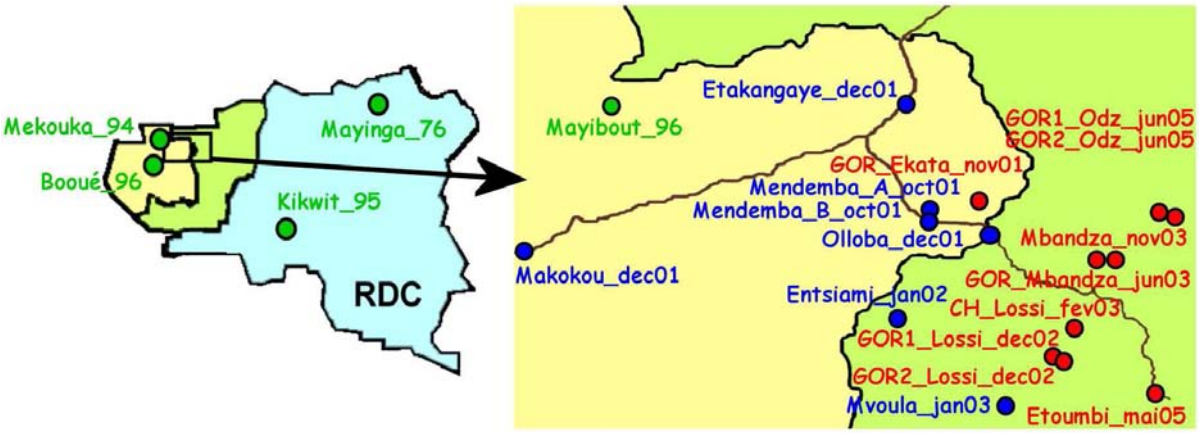


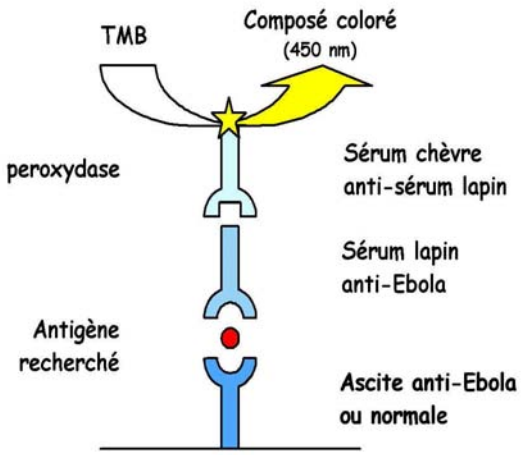
Figure 17 : Localisation de toutes les souches *Zaïre ebolavirus* d'origine humaine et animale isolées depuis 1976. La source (GOR pour gorille, CH pour chimpanzé, rien pour humain), la localisation et la date de prélèvement sont indiqués.

III. Méthodes de diagnostic

III.1. Sérologie

a. Dosage des antigènes circulants

Principe : Les antigènes circulants dans le sang sont détectés grâce à un mélange d'anticorps spécifiques fixés à la plaque ou libre. Ce dernier est reconnu par un anticorps spécifique conjugué à la peroxydase. La détection des antigènes se fait grâce à la transformation par la peroxydase du substrat en composé coloré.



Protocole :

- Fixation d'un mélange de 7 anticorps monoclonaux murins dirigés contre EBOV dilués au 1/1000è sur les plaques ELISA. Parallèlement, fixer un mélange d'anticorps monoclonaux murins normaux qui constituera le

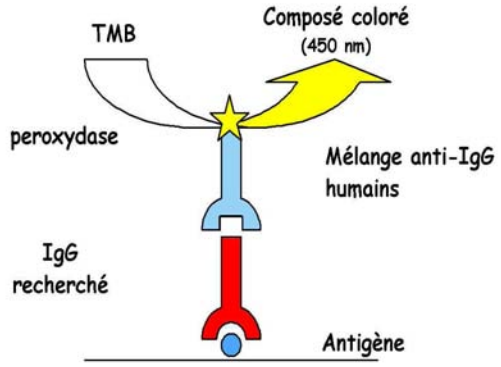
témoin négatif. La plaque est incubée 12 à 14h à +4°C.

- La plaque est lavée avec du PBS-T : phosphate buffer saline pH 7 + Tween 20 0,01%.
- Les échantillons sont dilués en cascade au ¼, 1/16^{è}, 1/64^{è} et 1/256^{è} dans du PBS-T-L (5% lait dans du PBS-T), puis distribués sur la plaque, qui sera incubée 2h à température ambiante.
- Une fois la plaque lavée, le sérum polyclonal de lapin anti-Ebola est dilué au 1/1500^{è} et distribué dans les puits. L'incubation dure 1h à température ambiante.
- Lavage puis incubation 1h à température ambiante avec le sérum de chèvre anti-sérum de lapin conjugué à la peroxydase, dilué au 1/10 000^{è} dans du PBS-T-L contenant 2% de sérum normal de chèvre
- Révélation avec le substrat TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine, TMB Microwell Peroxydase system Dymex Thermo Bioanalysis, Suède). Lorsque du bruit de fond apparaît dans les puits témoins négatifs, la réaction est arrêtée avec 100 µl par puits d'HCl 2 M.
- La densité optique (DO) est lue à la longueur d'onde de 450 nm grâce à un lecteur de plaques (LP400, sigma).

Le résultat équivaut à la comparaison des densités optiques entre les puits où le mélange d'anticorps monoclonaux anti-Ebola ont été fixés et ceux où ont été fixés les anticorps normaux.

b. Dosage des Immunoglobulines G

Principe : Les Immunoglobulines (Ig) G sont détectés grâce à leur capacité de reconnaissance et de fixation aux antigènes, fixés que la plaque. La peroxydase, conjuguée à un anticorps anti-IgG, permet de visualiser la réaction par la transformation du substrat en composé coloré.



Protocole :

- Les antigènes et contrôles négatifs sont dilués au 1/1.000è dans du PBS et incubés 12 à 14h à +4°C. Les antigènes correspondent à un lysat de cellules Vero E6 infectées par EBOV. Les contrôles négatifs sont des lysats de cellules Vero E6 saines.
- Lavage puis incubation 12-14h à +4°C des échantillons dilués au 1/100è, 1/400è, 1/1600è et 1/6400è dans du PBS-T-L.
- Lavage puis incubation 2h à température ambiante d'anticorps polyclonaux dirigés contre les IgG humains conjugués à la peroxydase, dilués au 1/4000è dans du PBS-T-L.
- Lavage puis révélation avec le substrat TMB pour lecture de la DO à 450 nm.

c. Détection d'antigènes par immunofiltration

L'objectif de cette technique est de pouvoir effectuer des diagnostics dans des conditions de terrain à partir de prélèvements non invasifs.

Ce test est basé sur une technique d'immunofiltration utilisant des anticorps monoclonaux (mAc) dirigés contre la protéine de matrice (VP40) de toutes les espèces connues d'EBOV. Les anticorps ont déjà été testés avec succès pour les méthodes d'ELISA conventionnelles [109].

Cette technique repose sur le principe de l'ELISA : un premier mAc anti-VP40 fixé à la colonne permet de capturer l'antigène ; qui sera reconnu par un second mAc marqué à la biotine. Le résultat est lu par spectrophotométrie après réaction enzymatique.

Protocole :

- Incuber 30min les prélèvements (sérum et urine) dans une solution à 1% de SDS afin de dénaturer et inactiver les particules virales ;

- Diluer le sérum à 1/4 (v/v) avec le tampon de dilution (0,01M PBS, 5% BSA (Bovine Serum Albumine), 0,05% Tween 20). Diluer l'urine selon un ration 9:1 (v/v) avec le tampon de dilution (0,1M PBS, 50% BSA, 0,5% Tween 20) ;
- Filtrer les prélèvements d'urine dilués avec un filtre à 1,2 µm ;
- Les échantillons dilués sont passés sur la colonne ;
- Laver avec 750µl de tampon de lavage (0,01M PBS, 0,1% BSA, 0,05% Tween 20, 0,2% BND) ;
- Déposer 500 µl d'anticorps secondaire marqué à la biotine (10 µg/ml, dilué dans 100 mM de potassium phosphate buffer, 1,5% caséine, 0,05% Tween 20, 0,1% BND, pH 4,9) ;
- Déposer sur la colonne 500 µl de streptavidine conjuguée à la peroxydase (Senova, Jena, Allemagne, 2 µg/ml, dilué dans 100mM potassium phosphate buffer, 1,5% caséine, 0,05% Tween 20) ;
- Laver 2 fois la colonne avec 750 µl de tampon de lavage, puis une fois avec 750 µl de tampon de substrat (100mM NaCl, 0,03% BND) ;
- La réaction est initiée par l'ajout de 500µl de TMB puis stoppée par 750 µl de tampon de substrat ;
- Le résultat est obtenu par lecture de la DO à 510nm.

III.2. Amplification d'un fragment ARN

a. Extraction de l'ARN

à partir d'organes

Le RNeasy Mini Kit (Qiagen) permet d'isoler l'ARN à partir de tissus d'origine animale par fixation de l'ARN sur une membrane à base de gel de silice. L'échantillon est d'abord broyé dans un tampon de lyse très dénaturant, contenant de l'isothiocyanate de guanidine (GITC), un inactivateur de RNases. Le lysat est déposé dans une colonne QIAshredder et centrifugé afin d'être homogénéisé. L'éthanol ajouté permet de créer les conditions adéquates à la fixation de l'ARN sur la membrane. Les contaminants sont éliminés par 3 lavages successifs par 2 tampons différents. L'ARN est enfin élué par de l'eau RNase-free.

Protocole :

- Broyer l'échantillon dans un mortier avec 400 µl de tampon RLT additionné de10 µl de β-Mercaptoethanol par 1 ml de tampon. Mettre le broyat dans une colonne QIAshredder et centrifuger 2 min à vitesse maximale.
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% au lysat clarifié, mélanger par pipetage. Déposer sur une colonne RNeasy et centrifuger 15 s à 13 000 tr/min. L'ARN est fixé à la membrane, jeter l'éluat.
- Laver la membrane avec 700 µl de tampon RW1 et centrifuger 15 s à 13 000 tr/min. Répéter l'opération par 2 lavages de 500 µl de tampon RW2 suivis de centrifugation pendant 15 s et 2 min, respectivement.
- Eluer l'ARN dans un nouveau tube en centrifugeant 1 min à 13 000 tr/min avec 80 µl d'eau RNase free.

L'ARN est prêt à être utilisé ou stocké à -80°C.

à partir de sérum

Le QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) a été élaboré pour extraire, en 3 étapes, l'ARN viral grâce à la combinaison des propriétés de fixation d'une membrane à base de gel de silice et de la vitesse de centrifugation.

L'échantillon est d'abord lysé en conditions dénaturantes qui permettent d'inactiver les RNases, protégeant ainsi l'intégrité de l'ARN. Le « carrier RNA » présent dans le tampon de lyse, augmente la fixation de l'ARN viral sur la membrane et limite son éventuelle dégradation. Le lysat, déposé sur la colonne, est soumis à une centrifugation permettant à l'ARN de se fixer sur la membrane. Les conditions de salinité et de pH sont adaptées à la fixation de l'ARN mais pas des contaminants tels que les protéines. Ces derniers sont éliminés par 2 étapes successives de lavages par 2 tampons différents qui n'affectent pas la fixation de l'ARN sur la membrane. L'ARN est enfin élué par de l'eau RNase-free contenant 0,04% d'azide de sodium empêchant la prolifération microbienne.

Protocole :

- Ajouter 140 µl de plasma dans un tube contenant 560 µl de tampon AVL additionné du « carrier RNA ». Mélanger rapidement au vortex et incuber 10 min à température ambiante.

- ❖ Ajouter 560 µl d'éthanol absolu, vortexer, et déposer sur la colonne. Centrifuger 3 min à 13 000 tr/min, jeter le filtrat.
- ❖ Déposer 500 µl de tampon AW1 sur la colonne. Centrifuger 1 min à 13 000 tr/min.
- ❖ Répéter l'opération avec le tampon AW2. Centrifuger 2 min à 13 000 tr/min.
- ❖ Eluer l'ARN dans un nouveau tube en centrifugeant 1 min à 13 000 tr/min avec 80 µl d'eau ppi.

L'ARN peut être utilisé de suite ou stocké à -80°C.

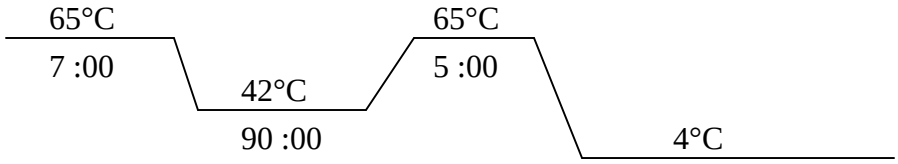
b. Transcription inverse

Afin d'éviter toute contamination des pièces et réactions, les amplifications se font dans 3 pièces différentes : une pour la préparation du milieu réactionnel, une deuxième consacrée à la préparation des échantillons et la troisième pour l'amplification et la détection.

La transcription inverse permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN viral, dans le but de l'amplifier.

L'ARN est d'abord dénaturé 7 minutes à 65°C. Le milieu de réaction est ensuite ajouté. Il est composé de DTT (0,1 M), d'un inhibiteur de RNases, d'une amorce oligo-dT (500 µg/ml), de 10 mM de chaque dNTP, d'un tampon (contenant 250 mM Tric-HCl, pH 8,3 à température ambiante, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) et de la transcriptase inverse (superscript II, Invitrogen).

La réaction de transcription inverse suit le programme suivant :



L'ADNc est prêt à être utilisé pour une réaction d'amplification.

c. Amplification des gènes

La Polymerase Chain Reaction (PCR), réaction de polymérisation en chaîne, permet d'amplifier de façon exponentielle une région précise du génome, comprise entre les amorces utilisées. La Figure 18 schématise l'amplification d'un fragment d'ADN.

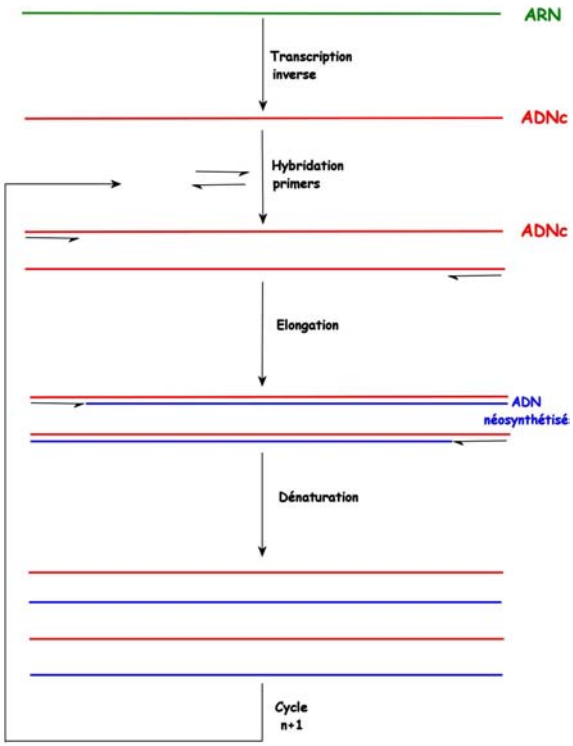
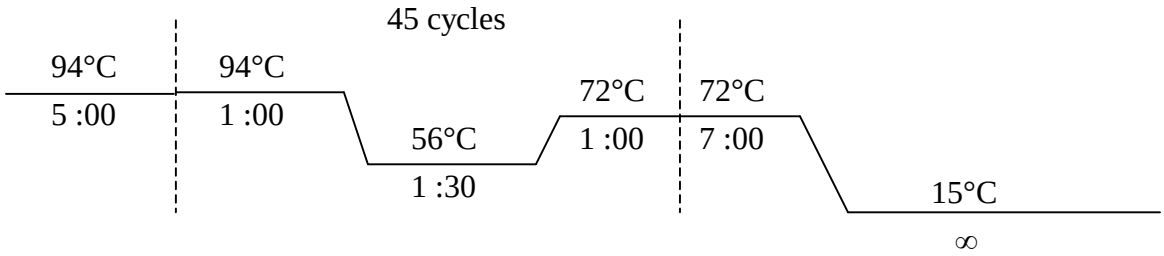


Figure 18 : Principe de l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces spécifiques s'hybrident au brin d'ADN complémentaire (ADNc) issu de la transcription inverse. Pendant l'étape d'élongation, la polymérase synthétise un nouveau brin complémentaire au brin matrice sur lequel elle s'est hybridée. L'étape de dénaturation permet de séparer les brins pour l'étape d'hybridation du cycle suivant. Chaque cycle produit 2^n brins d'ADN, avec n le nombre de copies initiales.

✍ suite à transcription inverse

L'ADNc est ajouté au milieu réactionnel comprenant : 5 µl de tampon d'incubation (10 mM Tric-HCl, pH 9 à 25°C, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% Triton x100, 0,2 mg/ml BSA), 1 µl d'un mélange de dNTP, 1 µl du mélange d'amorces (20 µM), 0,5 µl (2,5 U) de Taq DNA polymérase (Qbiogene), de l'eau en quantité suffisante pour 50 µl.

L'amplification se déroule en 45 cycles de 3 étapes représentées sur le diagramme suivant. Un cycle se compose d'une étape de dénaturation à 94°C permettant de séparer les 2 brins d'ADN, suivie de l'étape d'hybridation des amorces. La température dépend du Tm des amorces utilisés. Pour amplifier le gène de la polymérase (gène L), la température d'hybridation était de 46°C. Pour les amplifications des gènes de la nucléoprotéine (NP), de la glycoprotéine (GP) ; les températures d'hybridations étaient respectivement de 52 et 56°C. Enfin, l'étape d'élongation pendant laquelle la Taq polymérase synthétise le nouveau brin d'ADN.

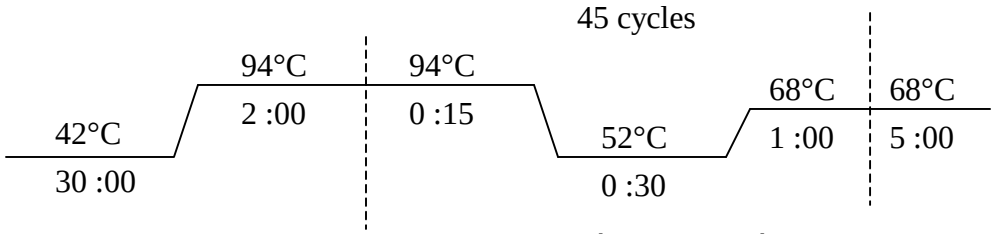


- **one-step RT-PCR**

Les amplifications du gène de la NP ont en partie été réalisées avec le kit SuperScript III One-step RT-PCR System with Platinum® *Taq* High Fidelity (invitrogen). Le mélange réactionnel comprend la SuperScript III, transcriptase inverse conçue pour réduire l'activité RNase H et augmenter la stabilité à température ambiante, ainsi qu'un mélange enzymatique composé d'un recombinant de Taq ADN polymérase, enzyme possédant un système de relecture et une activité 3'-5' exonucléase, et d'anticorps dirigés contre la polymérase qui permettent de bloquer son activité à température ambiante, assurant également un départ « hot-start » de la PCR.

Dans un tube, mettre 25 µl de mélange réactionnel (fourni dans le kit, contenant 0,4 mM de chaque dNTP et 2,4 mM de $MgSO_4$), 2 µl d'amorces sens et anti-sens (20 µM), 1 µl de mélange enzymatique, et l'ARN. Compléter avec de l'eau jusqu'à 50 µl.

Le diagramme suivant représente les étapes de l'amplification :



La réaction se compose d'une transcription inverse à 42°C immédiatement suivie par la première dénaturation à 94°C de la PCR. Les 3 étapes de la PCR sont plus courtes, la durée de l'étape d'élongation est fonction de la taille du fragment à amplifier (1 min par kb).

- **Amorces et détermination de la température d'hybridation**

Afin d'hybrider les amorces à la température optimale, des mises au point de la température sont nécessaires. A partir de la température de fusion théorique calculée en fonction de la séquence de l'amorce (Tm = 2 (A+T) + 4 (G+C)), des amplifications sont

faites à différentes températures comprises entre Tm-5° et Tm+5°. Les Tm des amorces étant tous proches, les amplifications ont donc été faites à 46°, 50°, 52°, 54° et 56°C.

La température utilisée pour l'étape d'hybridation des PCR suivantes sera celle pour laquelle le produit de PCR est le plus abondant, sans bande parasite ni dimères d'amorces ou traces laissées par la migration sur gel.

Les amorces utilisées, leur température d'hybridation ainsi que les tailles des fragments amplifiés sont résumés dans le tableau V.

d. Électrophorèse sur gel d'agarose

Quatre µl de produit de PCR sont déposés avec 3 µl de tampon de dépôt (bleu de bromophénol et glycérol) sur un gel à 1,25% d'agarose (2 g d'agarose dans 160 ml de tampon TBE (121,14 g Tris + 51,32 g acide borique + 3,72 g EDTA)).

En polymérisant, l'agarose va former des mailles par lesquelles les produits de PCR soumis au champ électrique de la migration vont passer et seront séparés en fonction de leur taille, évaluée grâce à un marqueur de taille/quantité (Low DNA Mass Ladder, invitrogen).

Tableau V : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant la GP et la NP, leurs températures d'hybridation et la taille des fragments résultants.

Gènes	**Amorces (5' à 3') Sens / Antisens**	**Temp. (°C)**	**Fragment (pb)**
Protéine L PCR 1	TATMGRAATTTTTCYTTYTCATT ATGTGGTGGGYTATAAWARTCACTRACAT	46	420
Protéine L PCR nichée	GCWAAAGCMTTYCCWAGYAAYATGATGG ATAAWARTCACTRACATGCATATAACA	52	297
GP 1 PCR 1	GATGAAGATTAAGCCGACAG CTGTTCTGCGATGATTGTTG	56	1 428
GP 1 PCR nichée	GTGAGCGTAATCTTCATCTC TTGTTCAACTTGAGTTGCCT	56	1 388
GP 2 PCR 1	TGCAATGGTTCAAGTGCACA AAGAGATAACTAGATTGATG	56	1 242
GP 2	CAAGGAAGGGAAGCTGCAG	56	1 159

PCR nichée	GAATCACATTGGCTATGTTT		
GP diagno PCR 1	GAAGGTGTCGTKGCATTTCTGAT CCTTGAYTGTGCACTTGAACCA	50	494 (589)
GP diagno PCR nichée	TGAGAGAGCCGGTCAATGCAAC GAGGAATTTTCTGAAGCCATG		362 (447)
NP 1 PCR 1	TTTGCAAGTCTATTCCTTCCG CCGTTTTCCGAGTAACTCT	52	971
NP 2 PCR 1	GATCCGACTGACTCACAGGATA GGCTCATCCTTCATCATATGAT	50	671 (692)
NP 2 PCR nichée	TGGTCCTATTCGATCTAGACGA ATGTGGCGATACATCTCCTCAA		517

e. Purification du produit de PCR sur gel

Les produits de PCR ont été purifiés sur gel grâce au kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Le tampon QG fournit dans le kit a été conçu pour solubiliser l'agarose et fournir les conditions de pH et salinité optimales pour la fixation de l'ADN à la membrane de silice de la colonne. La présence d'un indicateur coloré permet de vérifier que le pH est dans la fourchette optimale, ainsi que la correcte solubilisation des morceaux d'agarose.

Les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose, les bandes correspondantes aux produits sont découpées, pesées et incubées 10 min à 50°C dans 3 volumes de tampon QG. Lorsque le gel est complètement dissous, ajouter 1 volume d'isopropanol et mélanger. Déposer le mélange sur la colonne et centrifuger 1 min à 13 000 tr/min. L'ADN s'adsorbe sur la membrane, les produits indésirables, tels les amorces, sels, enzymes, nucléotides libres, agarose, bromure d'éthidium, sont élués. Laver deux fois avec 500 µl de tampon PE et centrifugation 1 min à 13 000 tr/min. Le produit de PCR est élué dans 80 µl d'eau ppi par centrifugation 2 min à 13 000 tr/min.

III.3. Isolement viral

a. Culture de cellules Vero E6

Les cellules Vero sont des cellules immortalisées de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*). Ce sont des cellules adhérentes.

Composition du milieu de culture à 10% SVF : 450 ml milieu simple DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 50 ml SVF (Sérum de Veau Fœtal décomplémenté), 5 ml Glutamine (compris dans DMEM), pyruvate de sodium (compris dans DMEM), 450 mg/l glucose (compris dans DMEM), 500 µl de PSN (penistreptomycine)

- **Décongélation des cellules**

Sortir de l'azote liquide et mettre l'ampoule rapidement dans la glace le temps de préparer le plan de travail, puis au bain-marie pendant quelques minutes.

Mettre dans tube 15 ml contenant 10 ml de SVF 50% dans du milieu simple. Ce lavage permet de mieux éliminer le DMSO qui se fixe aux parois des cellules. Centrifuger 10 min à 1 200 tr/min, jeter le surnageant et recommencer l'opération.

Suspendre les culots dans 5 ml de milieu DMEM à 20% SVF le temps que les cellules reprennent et mettre dans boîte de culture 25 cm^3. Incuber à 37°C, 5% CO_2.

- **Repiquage des cellules**

Enlever le milieu de culture et laver avec 3 ml de Versène deux fois pendant 5 min. Mettre 1 ml de Trypsine, incuber à 37°C pendant 3 min maximum afin que les cellules se détachent de la paroi tout en évitant l'effet toxique de la Trypsine sur les cellules.

Reprendre les cellules dans 10 ml de milieu simple et centrifuger 10 min à 1400 tr/min. Jeter le surnageant et recommencer l'opération.

Reprendre le culot dans du milieu DMEM à 10% SVF en fonction de la dilution des cellules. Incuber à 37°C ; 5% de CO_2.

b. Infection des cellules par le virus Ebola

Cela correspond à l'inoculation d'un tapis cellulaire préalablement vidé du milieu de culture avec un sérum infecté par EBOV. L'infection des cellules Vero se réalise dans le laboratoire P4.

Diluer le sérum infecté au 1/10è dans un milieu de culture d'infection contenant 2,5% de SVF. Mettre 200µl du sérum dilué dans une boîte de culture de 25 cm^3 contenant un tapis de cellules Vero préalablement vidée de son milieu et incuber 1 heure à 37°C, 5%CO_2.

Après incubation, ajouter 5 ml de milieu d'infection à 2,5% SVF.

Les cultures infectées sont observées au microscope tous les jours afin de repérer la sortie du virus des cellules après réplication, se situant souvent vers le 5è jour post-infection et caractérisé par un « lâcher de ballon » correspondant à une forte mortalité cellulaire.

L'isolement viral a également été tenté à partir d'échantillons de carcasses animales. Dans ces cas, un aliquot de prélèvement de muscle était broyé dans du PBS puis déposé sur le tapis de cellules Vero.

IV. Caractérisation des souches par PCR

IV.1. PCR des gènes GP, NP et L

Les gènes codant la GP, la NP et la polymérase étaient amplifiés selon le protocole décrit précédemment (voir III.2. Amplification d'un fragment ARN).

IV.2. Séquençage et analyses phylogénétiques

Le séquençage des produits de PCR était effectué par la société GeneCust (4 rue Pierre Fontaine, 91058 Évry Cedex, France).

Les séquences obtenues étaient visualisées et vérifiées grâce au logiciels BioEdit et Chromas. Elles ont ensuite été alignées grâce à un serveur utilisant le logiciel ClustalW (http://www.clustalw.genome.jp). Les données utilisées pour les analyses phylogénétiques comprenaient 21 séquences complètes du gène GP (2031 nt), 24 séquences partielles (538 nt) et 18 séquences partielles codant la NP (1448 nt). Les séquences des autres espèces *Ebolavirus* (*Reston*, *Soudan* et *Côte d'Ivoire*) ont été inclues afin d'enraciner les arbres phylogénétiques de l'espèce *Zaïre*.

Des analyses phylogénétiques préliminaires ont été effectuées par le logiciel MEGA 3.1 [393] qui permet la construction d'arbres selon les méthodes du maximum de parcimonie et du plus proche voisin. Les analyses bayésiennes étaient menées grâce au logiciel MrBayes v3.1 [394].

L'âge de séparation entre les 2 lignées ZEBOV et entre les autres nœuds de l'arbre était estimé grâce au programme BEAST v1.4 (accessible à l'adresse suivante : http://beast.bio.ed.ac.uk.). Seules les séquences de ZEBOV et leur date de prélèvement étaient utilisées.

RÉSULTATS

I. Réponse internationale à l'épidémie de Mbandza

Mi-novembre 2003, suite à la confirmation par le CIRMF de l'infection par ZEBOV d'un cas suspect à Mbomo, RC, une équipe de l'Unité des Maladies Virales Émergentes (UMVE), dont j'ai fait partie, a rejoint les équipes médicales déjà en place pour aider au diagnostic de l'épidémie.

Une réponse internationale à une épidémie se divise en plusieurs niveaux. À Brazzaville, la capitale du Congo, la réponse est organisée par le comité national de lutte contre les épidémies, présidé par le Ministre de la santé et de la population. Ce comité est composé des représentants des ministères de la santé et de la population, de l'administration du territoire, de la défense, de l'économie forestière, des représentants de la Croix-Rouge congolaise et des partenaires qui ont participé au contrôle de l'épidémie, dont l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et Médecins Sans-Frontières (MSF Pays-Bas pour cette flambée).

Sur le terrain, un comité de coordination technique et scientifique assurait la coordination de la réponse par le biais de 5 commissions dédiées à : la surveillance épidémiologique et la mobilisation sociale ; la prise en charge des cas, diagnostic et laboratoire ; l'hygiène, assainissement et funérailles ; la logistique ; et le soutien psychosocial.

Tous les matins, des membres de la commission surveillance épidémiologique et mobilisation sociale sillonnaient la ville armés de porte-voix, répétaient les consignes d'hygiène et de protection à suivre, et suivaient les personnes contact de cas suspects ou confirmés. Les cas étaient définis en 4 catégories : un cas « alerte » est une personne présentant une forte fièvre à début brutal ou mort subitement avec hémorragie, diarrhée sanglante ou hématurie ; un cas « suspect » est une personne qui a été en contact avec un cas probable ou confirmé et qui présente au moins 3 symptômes spécifiques ; un cas « probable » est une personne qui présente les symptômes caractéristiques d'une FHVE, évalués par un médecin, ou une personne liée épidémiologiquement avec un cas « confirmé en laboratoire ».

Les malades, quels qu'ils soient, étaient pris en charge au sein de l'hôpital de Mbomo. Les patients aux symptômes spécifiques de la FHVE étaient isolés, ceux qui refusaient d'être pris en charge dans le pavillon d'isolement étaient remis à leur famille avec, lorsque les conditions le permettaient, du matériel de protection et une formation pour l'utiliser

correctement. La commission hygiène, assainissement et funérailles était chargée des inhumations dans le respect des mesures de protection et des temps forts des rituels pour aider au travail de deuil des familles.

Le diagnostic était assuré par l'UMVE dans les laboratoires du CIRMF à Franceville. Notre rôle était de stocker et acheminer les prélèvements de cas contact, suspects et probables, et d'en réaliser le diagnostic un fois arrivés à Franceville. Nous avons également apporté notre aide aux deux équipes venues mettre au point des outils de diagnostic rapides et adaptés aux conditions de terrain. Il s'agit du test par immunofiltration mis au point par un représentant de l'Institut de Microbiologie de Munich, Allemagne ; et d'un diagnostic par RT-PCR en temps réel réalisé par une équipe du Laboratoire National de Microbiologie de Winnipeg, Canada. Les structures sanitaires locales étant peu fonctionnelles, les conditions de terrain n'étaient pas toujours idéales pour les manipulations. Ainsi, l'équipe de Winnipeg a plus d'une fois été obligée de se brancher sur une batterie de véhicule pour faire fonctionner sa PCR en temps réel.

II. Diagnostic

II.1. Diagnostic par immunofiltration

La mise au point de la méthode de diagnostic par immunofiltration est le résultat d'une collaboration avec l'Institut de Microbiologie de Munich, Allemagne, et le Laboratoire National de Microbiologie de Winnipeg, Canada.

En vue de ce test, des prélèvements de sérum, urine, salive, sueur ou larmes ont été collectés à partir de cas probables ou suspects, ainsi que leurs contacts, lors de l'épidémie de novembre-décembre 2003 en République du Congo. Deux prélèvements sanguins intracardiaques ont également été obtenus à partir de cas probables décédés (cas 1 et 2, Tableau VI).

L'antigène viral était capturé et détecté efficacement dans les deux prélèvements post-mortem. Par contre, les prélèvements, quels qu'ils soient, des cas suspects et des contacts se sont révélés être négatifs, même aux faibles dilutions (Figure 19).

Les résultats obtenus par immunofiltration ont été confirmés par RT-PCR en temps réel et par détection d'anticorps et capture d'antigènes par ELISA.

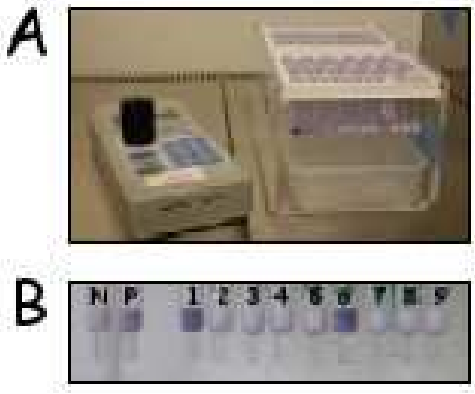


Figure 19 : Diagnostic par immunofiltration. **A)** Photomètre et colonnes utilisées sur le terrain. **B)** Résultats d'un test sur le terrain. N = témoin négatif ; P = témoin positif, ZEBOV, souche Mayinga ; 1 à 9 = sérums à tester. Les sérums 1 et 6 réagissent positivement, les autres ne présentent pas d'antigène ZEBOV. L'observation visuelle est confirmée par lecture photométrique.

Le test de validation de la technique d'immunofiltration a donné lieu à la publication suivante (Annexe 2) :

Lucht A., Formenty P., Feldmann H., Götz M., Leroy E., Bataboukila P., Grolla A., Feldmann F., Wittmann T., Campbell P., *et al.* Development of an Immunofiltration-based Antigen Detection Assay for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Infections, *J. Infect. Dis.* (Sous presse)

II.2. Diagnostic par ELISA

Lorsqu'un prélèvement suspect arrive au CIRMF pour diagnostic, ou dans le cadre d'une épidémie, les échantillons sont aliquotés dans le laboratoire P4, un aliquot de sérum est inactivé 60 min à 56°C puis sorti du laboratoire pour détection d'IgG et capture d'antigène par ELISA. L'ARN est extrait dans le laboratoire P4 à partir d'un autre aliquot de sérum.

Le tableau VII présente les diagnostics antigènes et détection d'IgG de quelques sérums obtenus lors de l'épidémie de Mbandza, RC, en novembre 2003. Le diagnostic des prélèvements *post-mortem* étaient utilisé dans la gestion des cas. La confirmation en laboratoire permet de discerner les non-cas des cas probables (personne présentant des symptômes compatibles avec la FHVE, évalués par un médecin, ou une personne décédée présentant un lien épidémiologique avec un cas confirmé). Il en est de même pour les cas suspects (cas contact présentant au moins trois des symptômes spécifiques ou des saignements inexpliqués) prélevés en période de symptômes.

Les prélèvements n°1 montrent l'évolution du diagnostic en fonction du devenir de la maladie. Le premier prélèvement 9 jours après le début des symptômes est positif en

antigène capture et négatif pour la détection d'IgG. Vingt jours après le début des symptômes, alors que la patiente était en voie de guérison, l'antigène n'est plus détectable, et des IgG sont présents.

Tableau VI : Comparaison du diagnostic par immunofiltration avec les méthodes de RT-PCR en temps réel et ELISA sur des prélèvements de cas suspects ou probables et leurs contacts lors de l'épidémie de Mbandza, RC, en 2003.

N°	Sexe	Age (ans)	Cas	Jour post-symptôme	DO Immunofiltration / interprétation	RT-PCR	Capture Antigène ELISA	Détection Anticorps ELISA	Résultat
1	F	5	Probable	7	2,158 / +	NT	+	-	Confirmé
2	M	22	Probable	8	1,671 / +	+	+	-	Confirmé
3	M	19	Suspect	6	0,223 / -	-	-	-	Non-cas
4	M	1	Suspect	8	0,260 / -	-	-	-	Non-cas
5	M	6	Suspect	10	0,218 / -	-	-	+	Convalescent
6	M	31	Suspect	10	0,150 / -	-	-	+	Convalescent
7	M	26	Suspect	14	0,078 / -	-	-	-	Non-cas
8	F	23	Suspect	15	0,141 / -	-	-	-	Non-cas
9	F	18	Suspect	15	0,259 / -	-	-	+	Convalescent
10	F	22	Suspect	16	0,065 / -	-	-	+	Convalescent
11	F	20	Suspect	16	0,108 / -	-	-	-	Non-cas
12	F	40	Suspect	18	0,190 / -	-	-	-	Non-cas
13	F	14	Suspect	18	0,128 / -	-	-	-	Non-cas
14	F	22	Suspect	20	0,299 / -	-	-	+	Convalescent
15	F	38	Suspect	20	0,084 / -	-	-	-	Non-cas
16	M	?	Contact		0,145 / -	-	-	-	Non-cas
17	F	?	Contact		0,241 / -	-	-	-	Non-cas
18	M	43	Contact		0,127 / -	-	-	-	Non-cas
19	F	?	Contact		0,073 / -	-	-	-	Non-cas
20	M	?	Contact		0,094 / -	-	NT	NT	Non-cas

F = Féminin ; M = Masculin ; Immunofiltration réalisée sur le terrain par l'équipe de l'Institut de Microbiologie de Munich, Allemagne ; RT-PCR réalisées sur le terrain par l'équipe du Laboratoire National de Microbiologie, Winnipeg, Canada ; NT = non testé.

Tableau VII : capture d'antigène et détection d'anticorps sur des sérums obtenus lors de l'épidémie de Mbandza, RC, en 2003.

Numéro	Sexe	Age	Cas	DDS	Prélèvement	Ag	IgG
1	F	22		15 nov. 03	24 nov. 03	+	-
			Convalescent		5 déc. 03	-	+
2	F	50	Décès (24 nov.)	18 nov.03	24 nov. 03	+	-
3i	M	24	Décès (23 nov.)	15 nov. 03	23 nov. 03	+	-
4	M	40	Décès (23 nov.)	14 nov. 03	24 nov. 03	+	-
5	M	25	Décès (21 nov.)	16 nov. 03	22 nov. 03	+	-
6	F	8	Décès (23 nov.)	17 nov. 03	24 nov. 03	+	-
7	M	40	Décès (10 nov.)	06 nov. 03	11 nov. 03	+	-
8	M	26	Décès (24 nov.)	13 nov. 03	24 nov. 03	+	+
9	M	16	Décès (29 nov.)	20 nov. 03	24 nov. 03	+	-

F = Féminin ; M = Masculin ; DDS = Date de Début des Symptômes ; Ag = Capture d'antigène ; IgG = détection d'Immunoglobuline G. Les numéros ne correspondent pas à ceux attribués aux sérums testés par immunofiltration.

II.3. Diagnostic par RT-PCR

Enfin, l'infection par EBOV était confirmée plus spécifiquement par l'amplification du gène L codant la polymérase.

La figure 20 montre la migration sur gel d'agarose des produits de PCR nichée pour quatre patients diagnostiqués positifs par les méthodes ELISA. La bande inférieure correspond à l'amplicon de 391pb.

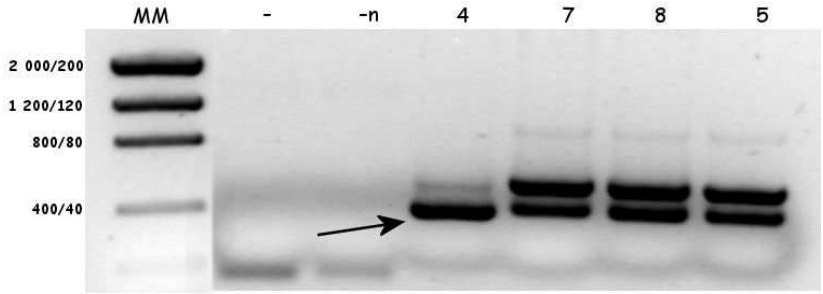


Figure 20 : Migration sur gel d'agarose des produits d'amplification nichée du gène L pour les prélèvements diagnostiqués positifs par capture d'antigène par ELISA. La bande correspondant à l'amplicon, d'une taille de 391pb, est indiquée par une flèche. La bande supplémentaire présente dans les lignes 5, 7 et 8 est due à une amplification non spécifique. MM : échelle de masse moléculaire ; - : eau ; -n : eau de la PCR nichée ; 4, 5, 7, 8 : cas décrits dans le tableau VII.

Le même protocole a été appliqué aux prélèvements issus de carcasses animales trouvées en forêt. En raison de la décomposition rapide en milieu tropical, plusieurs échantillons diagnostiqués positifs par ELISA ou PCR sur le gène L n'ont pas pu être amplifiés sur le gène de la GP, probablement à cause de la trop grande dégradation de l'ARN viral (voir tableau III).

Le diagnostic est également réalisé sur des prélèvements de malades présentant des symptômes correspondant à la FHVE et provenant de régions endémiques. L'infection par EBOV est recherchée par amplification des gènes L et GP. Un diagnostic de l'infection par le virus de Marburg est également effectué par amplification du gène VP35 (figure 21).

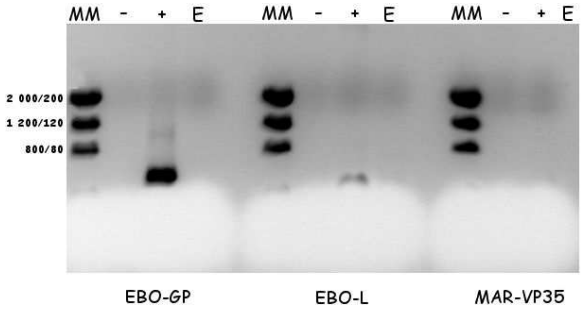
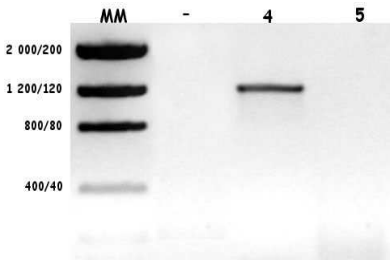


Figure 21 : Diagnostic de l'infection par EBOV par RT-PCR sur les gènes L et GP et de l'infection par MARV sur le gène VP35. MM : échelle de masse moléculaire ; - : eau ; + : témoin positif ; E : échantillon à tester.

II.4. Infection des cellules Vero



Dans le but d'obtenir de plus grandes quantités de matériel viral, des cellules Vero ont été infectées par des sérums positifs. L'infection était contrôlée par capture d'antigène et/ou PCR sur des aliquots post-infection. Plusieurs passages sur cellules Vero étaient parfois nécessaires pour que certains prélèvements infectent efficacement les cellules. La figure 22 montre un exemple d'isolement efficace du virus sur un prélèvement humain et l'absence d'infection cellulaire par un second sérum humain, prélevé et stocké dans des conditions similaires. Plusieurs ml de milieu de culture infectée ont pu être obtenus à partir du sérum du patient 4.

Figure 22 : Contrôle de l'infection de cellules Vero par migration sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène de la GP (2è ORF, 1242pb) à partir des surnageants aliquotés le 4è jour post-infection. MM : échelle de masse moléculaire ; - : eau ; 4 et 5 : surnageants de culture infectée par les sérum des patients 4 et 5 (tableau VII).

II.5. Mise en évidence de souches atypiques

La combinaison de ces différentes méthodes de diagnostic a permis faire ressortir le diagnostic de certains prélèvements. En effet, lors de l'épidémie humaine de 2002 à Mékambo, Gabon, une chaîne épidémiologique a présenté un taux de mortalité de 50%, au lieu des 80% spécifique à ce sous-type. Cette souche se comportait différemment des autres : une grande quantité d'antigènes a été détectée par ELISA, mais aucune amplification par PCR ni aucun isolement sur cellules Vero n'étaient possibles. Trois souches au profil identique ont été découvertes à partir d'échantillons prélevés sur des carcasses d'un gorille (Mbandza, juin2003) et de deux chimpanzés (mère et enfant, Lossi, déc2002).

De par leur comportement différent, ces souches ont été qualifiées d'« atypiques ».

III. Séquençage de gènes de protéines virales

III.1. Séquences du gène codant la glycoprotéine

Les séquences de longs fragments des régions codantes des gènes de la GP (2030 des 2166 nt) ont été obtenues à partir des prélèvements obtenus lors des épidémies humaines et de la plupart des prélèvements d'origine animale. Seules les souches infectant 3 carcasses de grands singes n'ont pu être amplifiées ni séquencées entièrement, en raison de la dégradation de l'ARN viral. L'amplification et le séquençage des prélèvements GOR_Mbandza_jun03, GOR1_ et GOR2_Odz_jun05 a donc été effectué sur une petite zone variable de 538 nt de la première ORF de la GP.

Les séquences obtenues sont clairement différentes les unes des autres.

Les séquences inédites de la GP ont été déposées dans la banque de gènes sous les numéros d'accession suivants :

- Séquences GP totale (2030 nt) : EU051634 (Etoumbi_mai05) ; EU051635 (Mbandza_nov03) ; EU051630 (GOR1_Lossi_dec02) ; EU051631

(GOR2_Lossi_dec02) ; EU051632 (GOR_Ekata_nov01) ; EU051633 (CH_Lossi_fev03) ;

- Séquences GP partielles (538 nt) : EU051636 (GOR_Mbandza_jun03) ; EU051637 (GOR1_Odzala_jun05) ; EU051638 (GOR2_Odzala_jun05).

a. Comparaison des souches d'origine humaine et animale

Les séquences déterminées à partir des prélèvements des épidémies humaines et des carcasses animales ont été alignées et comparées avec les séquences déjà publiées dans la banque de gènes (Figure 23). L'alignement des séquences partielles et totales de la GP montre que toutes ces séquences appartiennent à l'espèce *Ebolavirus zaire*, et qu'elles sont toutes différentes les unes des autres.

Lorsque les séquences sont comparées deux à deux, de nombreuses substitutions sont observées. Cependant, l'alignement des séquences met en valeur la présence de signatures moléculaires. Elles sont définies comme des nucléotides (ou acides aminés) communs à toutes les souches d'un groupe et qui diffèrent du nucléotide (ou acide aminé) commun à toutes les souches de l'autre groupe au même site. Sur les 538 nt de la séquence partielle, 9 signatures nucléotidiques sont observées, donnant lieu à 4 substitutions d'acides aminés dans la séquence prédite (Tableau VIII). Les signatures nucléotidiques sont surlignées sur la figure 23 et les modifications d'acides aminés sont indiquées au-dessus des séquences.

Les séquences de la GP peuvent donc être classées en deux groupes selon les signatures nucléotidiques :

- Le groupe A qui comprend les séquences issues des premières épidémies humaines, à savoir Mayinga_76, Mekouka_94, Kikwit_95, Booué_96 et Mayibout_96 (séquences en vert dans la figure) ainsi que les séquences issues des épidémies humaines de 2001 à 2003 (en bleu dans la figure), nommées Mendemba_A_oct01, Mendemba_B_oct01, Makokou_dec01, Olloba_dec01, Etakangaye_dec01, Entsiami_jan02 et Mvoula_jan03 ;

- Le groupe B (en rouge), qui est composé des séquences issues des deux dernières épidémies humaines de 2003 et 2005 (Mbandza_nov03 et Etoumbi_mai05) ainsi que des séquences issues de carcasses animales (GOR_Ekata_nov01, GOR1_Lossi_dec02, GOR2_Lossi_dec02, CH_Lossi_fev03, GOR_Mbandza_jun03, GOR1_Odz_jun05 et GOR2_Odz_jun05).

Tableau VIII : Signatures moléculaires nucléotidiques entre les séquences des groupes A et R et les séquences du groupe B.

Nucléotide*	**Groupes A+ R**		**Groupe B**	
630	TCT	Ser S	TCC	Ser S
690	ACA	Thr T	ACG	Thr T
747	ACA	Thr T	ACG	Thr T
757	CTG	Leu L	TTG	Leu L
784	ACA	Thr T	GCA	Ala A (262)
804	AAT	Asn N	AAC	Asn N
949	AAC	Asn N	GAC	Asp D (317)
992	GGG	Gly G	GAG	Glu E (331)
997	AAC	Asn N	TAC	Tyr Y (333)

*Numérotation à partir du 1er nucléotide de l'amplicon et 1er acide aminé de la séquence prédite

Figure 23: Alignement des séquences partielles et totales codant pour la glycoprotéine (GP, 538 et 2031 nt). Les substitutions de nucléotides sont surlignées en jaune. Trois groupes peuvent être distingués : en vert, le groupe A composé de souches humaines apparues entre 1976 et 1996 ; en rouge, le groupe B contenant les souches isolées de carcasses animales et les souches responsables des deux dernières épidémies humaines ; en bleu, le groupe R composé de souches humaines isolées entre 2001 et 2003. En noir sont les séquences d'autres espèces (MARV, REBOV, CIEBOV et SEBOV). Les points correspondent aux identités de nucléotides. Les changements entraînés par les substitutions de nucléotides dans la séquence aminoacide prédite sont signalés au dessus de l'alignement et indiquent la position de l'acide aminé changé.

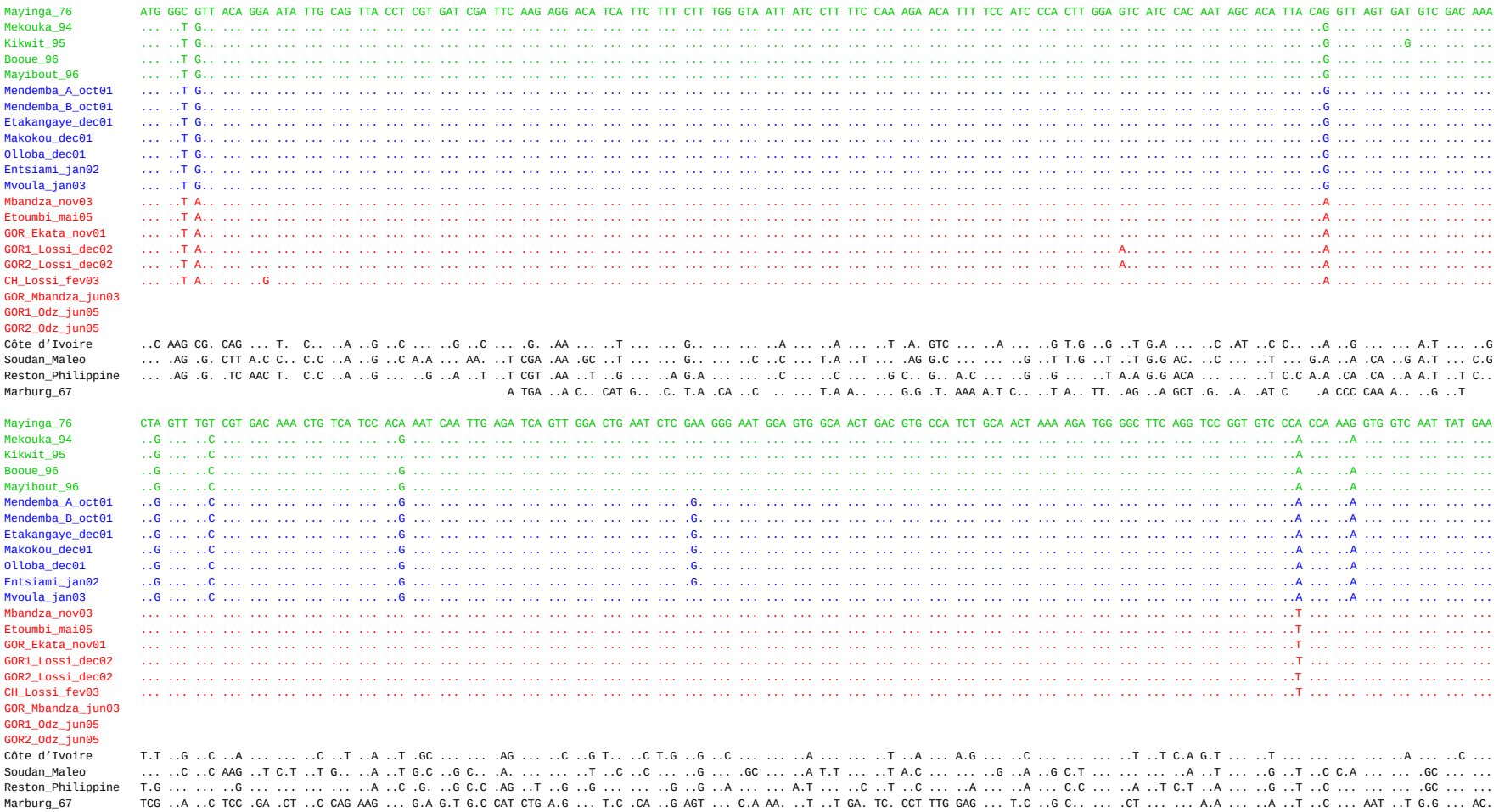


Figure 23 : suite

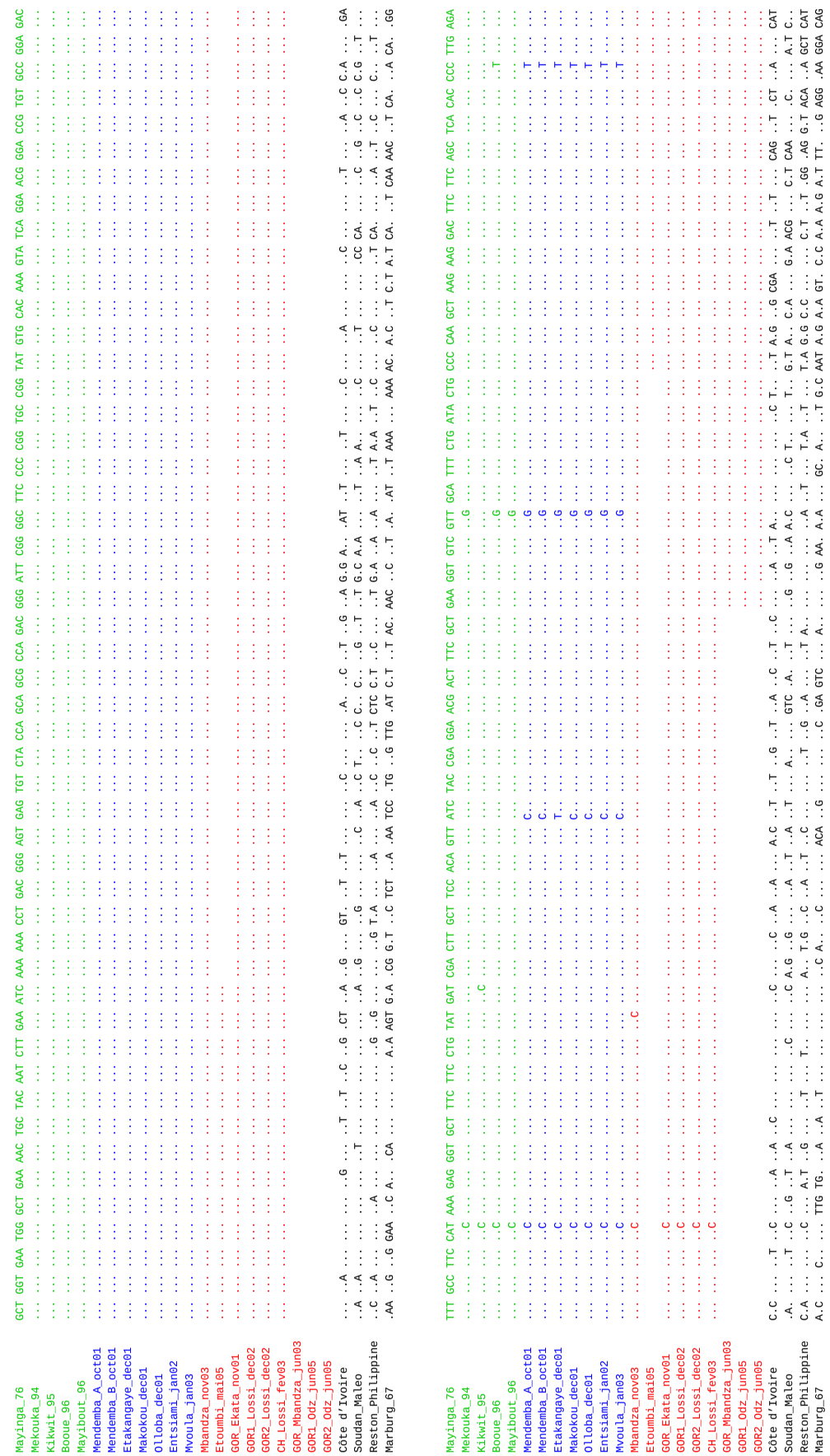


Figure 23 : suite

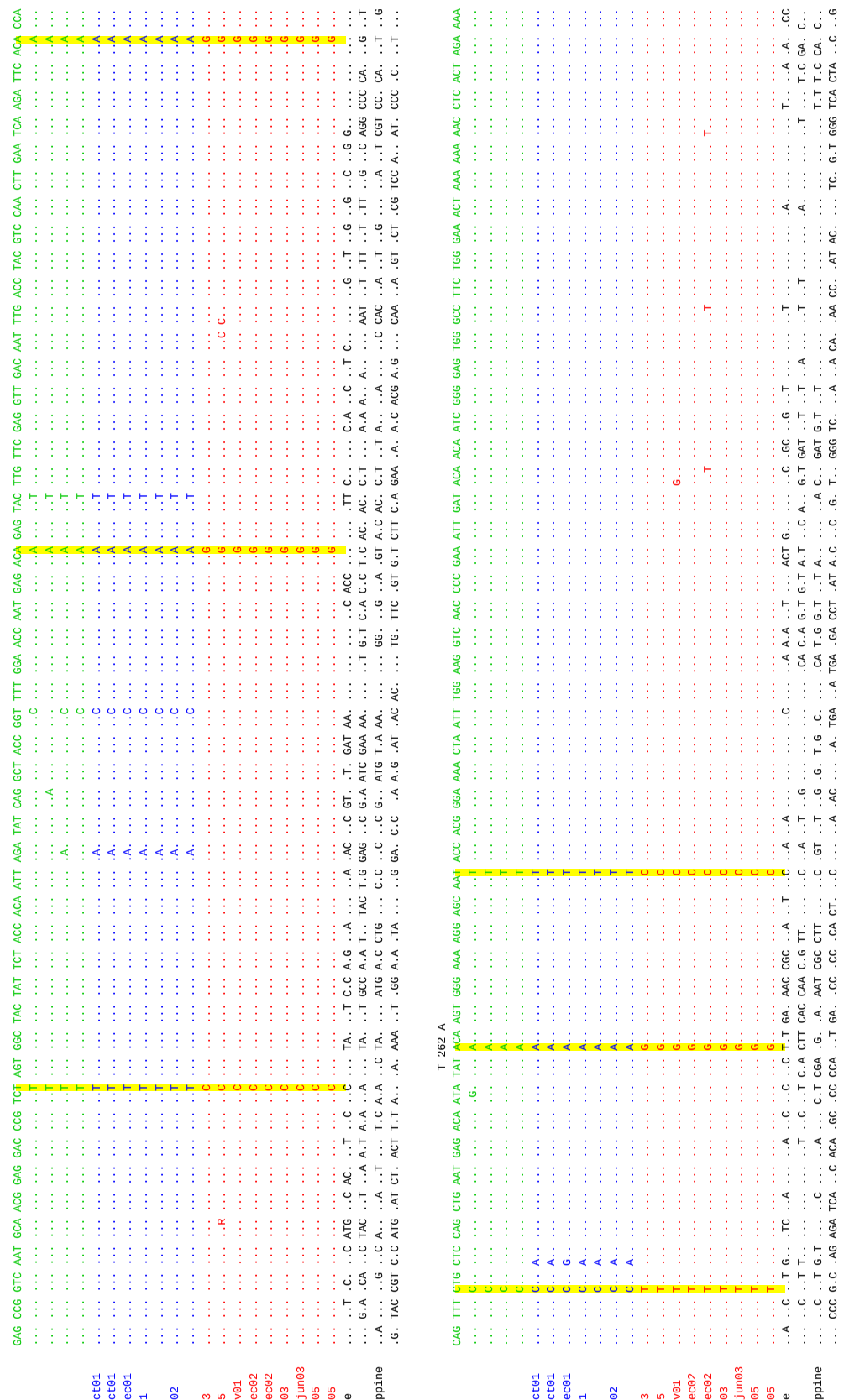


Figure 23 : suite

Figure 23 : suite

```
Mayinga_76          GCA ACT CAA GTT GAA CAA CAT CAC CGC AGA ACA GAC AAC GAC AGC ACA GCC TCC GAC ACT CCC TCT GCC ACG ACC GCA GCC GGA CCC CCA AAA GCA GAG AAC ACC AAC ACG AGC AAG AGC ACT GAC TTC CTG GAC CCC GCC ACC ACA ACA
Mekouka_94          ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Kikwit_95           ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.T A.C ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Booue_96            ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Mayibout_96         ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Mendemba_A_oct01    ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Mendemba_B_oct01    ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Etakangaye_dec01    ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Makokou_dec01       ... ..C ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Olloba_dec01        ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Entsiami_jan02      ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Mvoula_jan03        ... .T. ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... C.. .C. ... ... A.. ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... .C. ... ... ... ... G.. A.. ... CT. ... ... ... ... ... ... ..A ...
Mbandza_nov03       ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
Etoumbi_mai05       ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
GOR_Ekata_nov01     ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
GOR1_Lossi_dec02    ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
GOR2_Lossi_dec02    ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
CH_Lossi_fev03      ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... .C. ... ... ... ... ... ... ..G ...
GOR_Mbandza_jun03
GOR1_Odz_jun05
GOR2_Odz_jun05
Côte d'Ivoire       AGC ..C AC. CAG CCT GCC A.G AC. AC. ..C CA. CCA .C. A.. ... ... .AA ..G ACG ..A .TA AAC C.   AA CAT CAG AG. CCT ..A GT. G.G ... CG. G.   .. .T. CA. CC. C.C G.T C.C C.A CA. .AC AGA AA  ... ..G   C CG.
Soudan_Maleo        T.C ..C ATC .GG AC. GG. .TG AG. TC. ..C CA. AT. CTG AGT TC. T.. C.G A.. ATG G.A ..A AGC C.T GA. ..T CAG A.. TCC A.A A.C T.C A.. CCA ..A  .T .C. .GT GAT G.C CA. CGA .GA AC. AAC A.. A.. A.. GAG .A. CTC
Reston_Philippine     G .AC A.C CGA AC. AC. ..G ..  TC. .TT GA. ... TC. CC. CCA T.G ..G AG. A.. GAG A.A AT. .A. CAC T.. .AG ATG AAT ..G ATC C.. .GC TC. ..    . ... T.C GC. C.. ... C.A C.G AC. AA. AC. A.  ... .G. ..C CAC
Marburg_67          ... CAA AC. ACA CG. A.G GCC .CA .CA CA. CGG C.. C.A ATA T.A CA. TGG G.A TTT .AC .AG ..C C.. CAC C.. CA. C.. .AC .A. A.. .C. T.T TGT .TA TT  TCA GAA ..A ..C GAA GTA TC. .CT GGA .GG AAG ..G ..A TGT TTC

Mayinga_76          AGT CCC CAA AAC CAC AGC GAG ACC GCT GGC AAC AAC AAC ACT CAT CAC CAA GAT ACC GGA GAA GAG AGT GCC AGC AGC GGG AAG CTA GGC TTA ATT ACC AAT ACT ATT GCT GGA GTC GCA GGA CTG ATC ACA GGC GGG AGA AGA ACT CGA
Mekouka_94          ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ..A ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Kikwit_95           ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ..A ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... G.. ...
Booue_96            ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Mayibout_96         ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ..A ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Mendemba_A_oct01    ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Mendemba_B_oct01    ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Etakangaye_dec01    ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Makokou_dec01       ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Olloba_dec01        ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Entsiami_jan02      ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .AA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Mvoula_jan03        ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A.. A.. ... ... ... ..A ... .GA ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Mbandza_nov03       ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Etoumbi_mai05       ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
GOR_Ekata_nov01     ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
GOR1_Lossi_dec02    ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ...
GOR2_Lossi_dec02    ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... G.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
CH_Lossi_fev03      ... ... ... ... T.. ... .?. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ... ..G ... ..G ... G.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
GOR_Mbandza_jun03
GOR1_Odz_jun05
GOR2_Odz_jun05
Côte d'Ivoire       .C. TGG ... G.. A.. CC. A.C CA. T.C CAG ... .G. C.. TGC .GC ..G TGC AT. C.A A.. .CC .T. CAC C.. GA. GA. A.T GGA .CT ... ..C C.G ..G ..C ..A ..A CGG ..G ..G A.. AAT ..C C.G ... ..A TCC ... ... .GC  ..
Soudan_Maleo        TCC TGG .TC ... A.. ..  A.. C.. A.. CT. .C. .C. C.G .GA ATA T.A ... .CG GTT AA. ACT .TT T.G ..A CAA GA. ACA .GC AAC ..T C.. ..A ..T TCA ..A G.A A.A ..T A.T CTT ..G AGC C.T GG. CTT  C. .A. .CG .GC A..
Reston_Philippine   ..C AT. .CC G.T G.. CC  AG. C.. ..A A.A G.. GG. ... .GC AGC A.A . . .GA ... A.C CC. .GA ..C ..A GC. GAA A.T C.. .CC ..A ..C .C. .TA ... ..A G.A AG. AAG ..A ..T .AT TCA C.G .GT CC. ACC ..G .A. .AA A.C
Marburg_67          CT. TT. TGG .CG GGT TAA T.T G.T C.A ATT G.T TTG .T. CAG TTC ..A AC. A.G ..G ATC TTT ..T GAA T.T TCT .CT ..T GCT TCG .CT GA. .GA T.A .CA TGC C.C C.C CA. TAT CAG TTT AAC T.T .TC CTA CTA .T. TA. TGA AA.
```

Figure 23 : suite

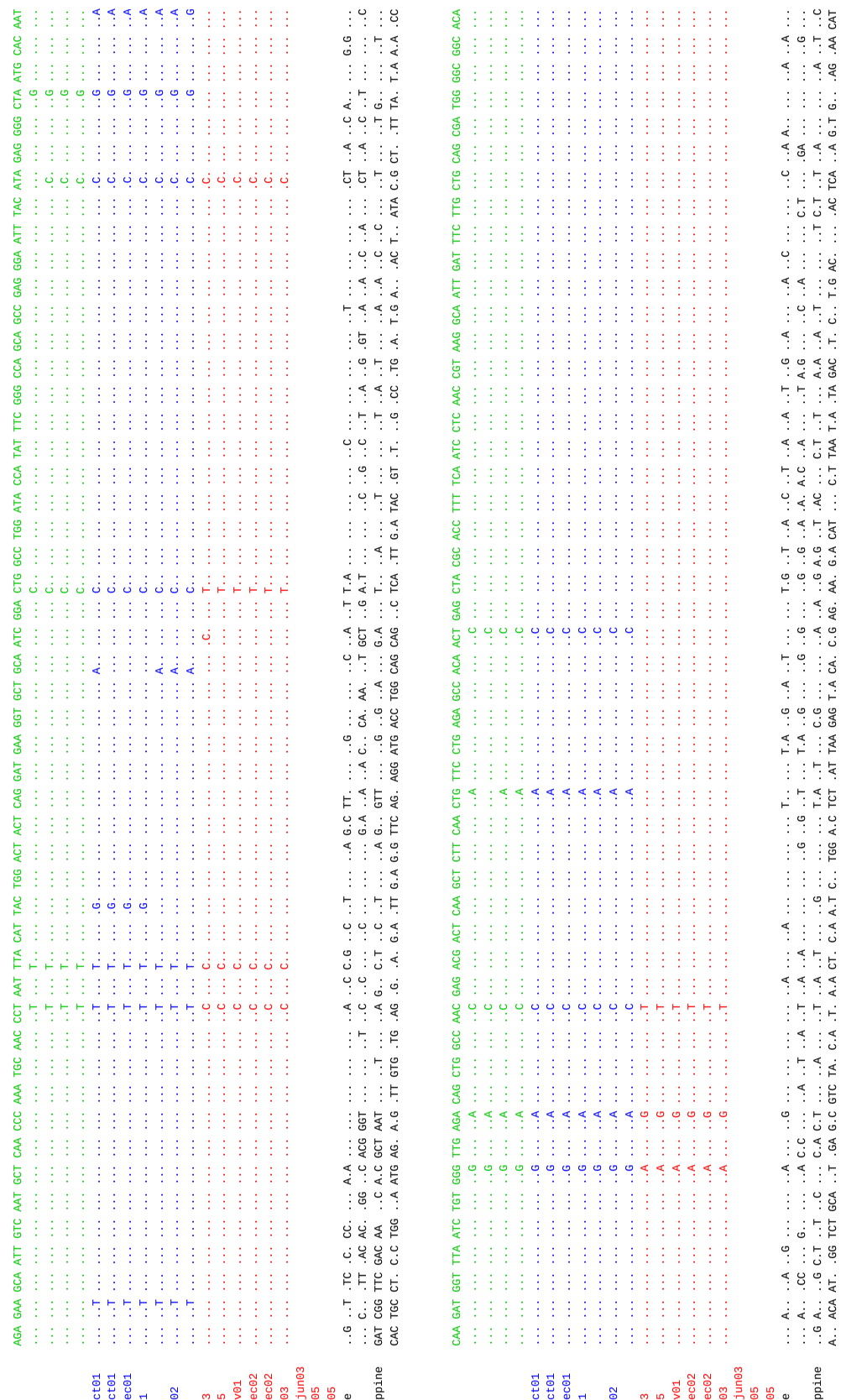


Figure 23 : suite

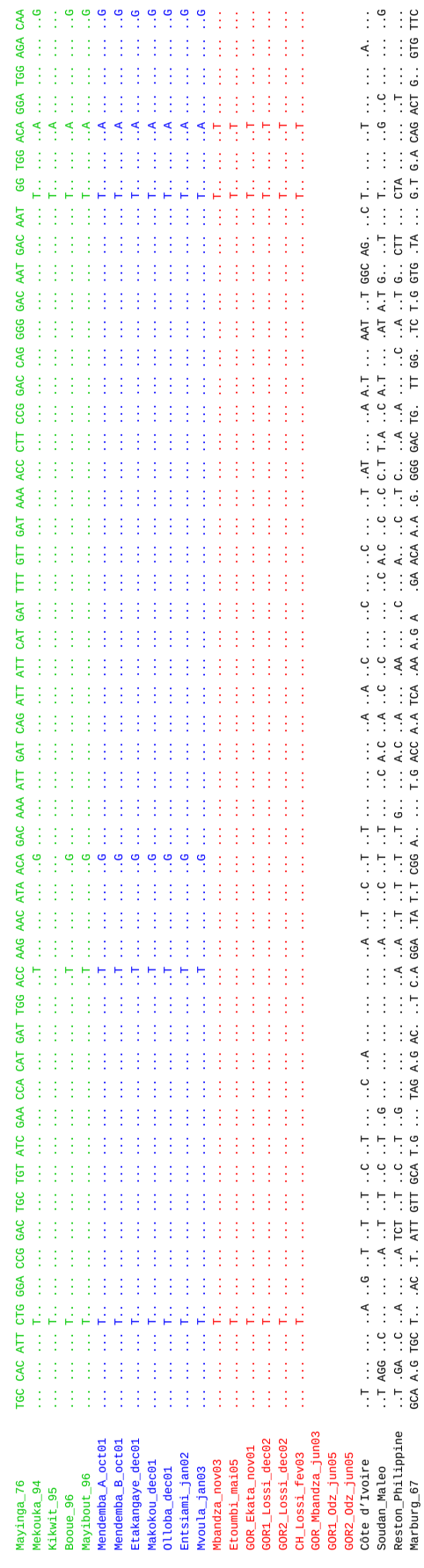
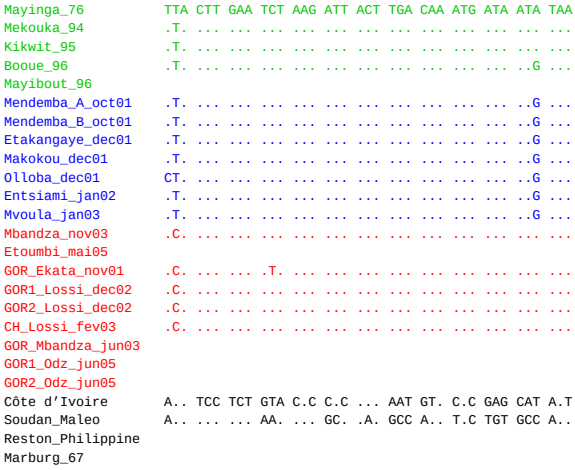


Figure 23 : fin



b. Cas des gorilles de Lossi

En décembre 2002, deux carcasses de gorilles ont été trouvées dans la forêt du Sanctuaire de Lossi. Elles étaient situées à quelques mètres l'une de l'autre et appartenaient certainement au groupe de gorilles qui habite cette partie de la forêt. Leur état de décomposition suggérait des dates de décès très proches, et par conséquent des infections simultanées.

Lors de l'alignement des séquences codant le gène de la GP partielle de toutes les séquences (Figure 23), des substitutions nucléotidiques ont été observées entre les séquences issues de ces deux carcasses. L'alignement des deux séquences met en évidence 11 substitutions qui entraînent 5 modifications dans les séquences prédites d'acides aminés (Tableau IX et Figure 24).

La présence de deux souches différentes dans les carcasses suggère que les animaux n'ont pas été contaminés par la même source.

Tableau IX : Substitutions nucléotidiques et aminoacides entre les deux séquences de la GP issues des gorilles 1 et 2 de Lossi, RC.

Nucléotide*	**GO1**		**GO2**	
849	ACA	Thr T	ACT	Thr T
867	GCC	Pro P	GCT	Pro P
886	AAC	Asn N	TAC	Tyr Y (296)
996	ACC	Thr T	ACG	Thr T
1006	ACT	Thr T	TCT	Ser S (336)
1163-64	AGG	Arg R	ACC	Thr T (388)
1165-66	GCT	Ala A	CAT	His H (389)
1447	ACC	Thr T	GCC	Ala A (483)
1998	ATC	Ile I	ATT	Ile I

*Numérotation à partir du 1er nucléotide de l'amplicon et du 1er acide aminé de la séquence prédite.

Figure 24 : alignement des séquences nucléotidiques des gorilles 1 et 2 de Lossi. Les substitutions sont surlignées en jaune. Les changements d'acides aminés sont indiqués au-dessus des séquences.

```
GOR1_Lossi_dec02 ATG GGT ATT ACA GGA ATA TTG CAG TTA CCT CGT GAT CGA TTC AAG AGG ACA TCA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 TTC TTT CTT TGG GTA ATT ATC CTT TTC CAA AGA ACA TTT TCC ATC CCA CTT GGA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 ATC ATC CAC AAT AGC ACA TTA CAA GTT AGT GAT GTC GAC AAA CTA GTT TGT CGT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAC AAA CTG TCA TCC ACA AAT CAA TTG AGA TCA GTT GGA CTG AAT CTC GAA GGG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 AAT GGA GTG GCA ACT GAC GTG CCA TCT GCA ACT AAA AGA TGG GGC TTC AGG TCC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GGT GTC CCT CCA AAG GTG GTC AAT TAT GAA GCT GGT GAA TGG GCT GAA AAC TGC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 TAC AAT CTT GAA ATC AAA AAA CCT GAC GGG AGT GAG TGT CTA CCA GCA GCG CCA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAC GGG ATT CGG GGC TTC CCC CGG TGC CGG TAT GTG CAC AAA GTA TCA GGA ACG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GGA CCG TGT GCC GGA GAC TTT GCC TTC CAC AAA GAG GGT GCT TTC TTC CTG TAT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAT CGA CTT GCT TCC ACA GTT ATC TAC CGA GGA ACG ACT TTC GCT GAA GGT GTC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GTT GCA TTT CTG ATA CTG CCC CAA GCT AAG AAG GAC TTC TTC AGC TCA CAC CCC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 TTG AGA GAG CCG GTC AAT GCA ACG GAG GAC CCG TCC AGT GGC TAC TAT TCT ACC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 ACA ATT AGA TAT CAG GCT ACC GGT TTT GGA ACC AAT GAG ACG GAG TAC TTG TTC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAG GTT GAC AAT TTG ACC TAC GTC CAA CTT GAA TCA AGA TTC ACG CCA CAG TTT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 TTG CTC CAG CTG AAT GAG ACA ATA TAT GCA AGT GGG AAA AGG AGC AAC ACC ACG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
                                                          N 296 Y
GOR1_Lossi_dec02 GGA AAA CTA ATT TGG AAG GTC AAC CCC GAA ATT GAT ACA ACA ATC GGG GAG TGG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ...
```

Figure 24 : suite

```
                                                T 336 S
GOR1_Lossi_dec02 GCC TTC TGG GAA ACT AAA AAA AAC CTC ACT AGA AAA ATT CGC AGT GAA GAG TTG
GOR2_Lossi_dec02 ..T ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 TCT TTC ACA GCT GTA TCA AAC GGA GCC AAA GAC ATC AGT GGT CAG AGT CCG GCG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 CGA ACT TCT TCC GAC CCA GAG ACC TAC ACA ACA ACT GGA GAC CAC AAA ATC ATG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... T.. ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GCT TCA GAA AAT TCC TCT GCA ATG GTT CAA GTG CAC AAT CAA GGA AGG GAA GCT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GCA GTG TCG CAT CTG ATA ACC TTT GCC ACA ATC TCC ACG AGT CCT CAA TCC CCT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
                                                RA 388-9 TH
GOR1_Lossi_dec02 ACA ACC AAA CCA GGT CAG GAC AAC AGC AGG GCT AAT ACA CCC GTG TAT AAA CTT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... .CC CA. ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAC ATC TCT GAG GCA ACT CAA GTT GAA CAA CAT CAT CGC AGA ACA GAC AAC GAC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 AGC ACA GCC TCC GAC ACT CCC CCC GCC ACG ACC GCA GCC GGA CCC CCA AAA GCA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAG AAC ATC AAC ACG AGC AAG AGC GCT GAC TCC CTG GAC CCC GCC ACC ACG ACA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 AGT CCC CAA AAC TAC AGC GAG ACC GCT GGC AAC AAC AAC ACT CAT CAC CAA GAT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
                                                                T 483 A
GOR1_Lossi_dec02 ACC GGA GAA GAG AGT GCC GGC AGC GGG AAG CTG GGC TTG ATT ACC AAT ACT ATT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G.. ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GCT GGA GTC GCA GGG CTG ATC ACA GGC GGG AGA AGA ACT CGA AGA GAA GCA ATT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GTC AAT GCT CAA CCC AAA TGC AAC CCC AAT CTA CAT TAC TGG ACT ACT CAG GAT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAA GGT GCT GCA ATC GGA TTG GCC TGG ATA CCA TAT TTC GGG CCA GCA GCC GAG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GGA ATT TAC ACA GAG GGG CTA ATG CAC AAT CAA GAT GGT TTA ATC TGT GGA TTG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 AGG CAG CTG GCC AAT GAG ACG ACT CAA GCT CTT CAA CTG TTC CTG AGA GCC ACA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 ACT GAG CTA CGC ACC TTT TCA ATC CTC AAC CGT AAG GCA ATT GAT TTC TTG CTG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

Figure 24 : fin

```
GOR1_Lossi_dec02 CAG CGA TGG GGC GGC ACA TGC CAC ATT TTG GGA CCG GAC TGC TGT ATC GAA CCA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 CAT GAT TGG ACC AAG AAC ATA ACA GAC AAA ATT GAT CAG ATT ATT CAT GAT TTT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GTT GAT AAA ACC CTT CCG GAC CAG GGG GAC AAT GAC AAT TGG TGG ACT GGA TGG
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 AGA CAA TGG ATA CCG GCA GGT ATT GGA GTT ACA GGC GTT ATA ATT GCA GTT ATC
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..T

GOR1_Lossi_dec02 GCT TTA TTC TGT ATA TGC AAA TTT GTC TTT TAG TTT TTC TTC AGA TTG CTT CAT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GGC AAA GCT CAG CCT CAA ATC AAT GAG ATT AGG ATT TAA TTA TAT GGA TCA CTT
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

GOR1_Lossi_dec02 GAA TCT AAG ATT ACT TGA CAA ATG ATA ATA TAA
GOR2_Lossi_dec02 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

III.2. Séquences du gène codant la nucléoprotéine

Un autre fragment (1448 des 2216 nt) a été amplifié et séquencé. Il se situe dans la région codante de la NP, gène moins variable que celui de la GP et exprimé en plus grande quantité.

Les séquences inédites de la NP ont été déposées dans la banque de gènes sous les numéros d'accession suivants : EU051639 (Mayibout_96) ; EU05164 (Mendemba_A_oct01) ; EU051641 (Mendemba_B_oct01) ; EU051642 (Etakangaye_dec01) ; EU051643 (Olloba_dec01) ; EU051645 (Mvoula_jan03) ; EU051644 (Entsiami_jan03) ; EU051646 (Yembelengoye_jan03) ; EU051647 (Etoumbi_mai05) ; EU051648 (Mbandza_nov03) ; EU051649 (GOR1_Lossi_dec02) ; EU051650 (GOR2_Odz_jun05)

La comparaison deux à deux des séquences codant pour la NP montre que toutes les souches sont différentes, ainsi qu'on l'a vu avec les séquences de la GP. De même, l'alignement des séquences met en évidence des substitutions communes à toutes les souches d'un groupe comparé à la substitution commune aux souches de l'autre groupe (Figure 25). Sur l'alignement de la figure 25, les signatures nucléotidiques sont surlignées, et les modifications d'acide aminé consécutives sont indiquées au-dessus des séquences. Ainsi, 15 substitutions nucléotidiques qui entraînent 5 modifications d'acides aminés peuvent être recensées (Tableau X).

Cependant, la composition des groupes a changé. En effet, les séquences composant le groupe A qui partagent le même nucléotide à un site donné sont restreintes pour le gène de la NP aux seules séquences humaines isolées entre 1976 et 1996 (en vert sur la figure). Les séquences issues des épidémies humaines de 2001 à 2003 (en bleu) partagent maintenant les mêmes substitutions que les séquences d'origine animale (en rouge). Un troisième groupe est donc formé, le groupe R, qui est composé des séquences humaines Mendemba_A_oct01, Mendemba_B_oct01, Makokou_dec01, Etakangaye_dec01, Entsiami_jan02, Olloba_dec01 et Mvoula_jan03.

Tableau X : Signatures moléculaires nucléotidiques entre les séquences du groupe A et les séquences des groupes B et R.

Nucléotide*	**Groupe A**		**Groupes B + R**	
231	GTA	Val V	GTC	Val V
291	ACC	Thr T	ACT	Thr T
468	AGT	Ser S	AGC	Ser S
507	CAA	Gln Q	CAG	Gln Q
528	GAG	Glu E	GAA	Glu E
558	GAG	Glu E	GAA	Glu E
717	GCG	Ala A	GCA	Ala A
981	AAT	Asn N	AAC	Asn N
986	TCG	Ser S	TTG	Leu L (329)
1082	CAC	His H	CGC	Arg R (361)
1122	AAT	Asn N	AAC	Asn N
1129	AGA	Arg R	GGA	Gly G (377)
1224	AGC	Ser S	AGT	Ser S
1268	GGA	Gly G	GAA	Glu E (423)
1356	CAA	Gln Q	CAG	Gln Q

Numérotation à partir du 1er nucléotide de l'amplicon et 1er acide aminé de la séquence prédite.

Figure 25 : Alignement des séquences partielles codant pour la nucléoprotéine (NP, 1448 nt). Les substitutions de nucléotides sont surlignées en jaune. Trois groupes peuvent être distingués : en vert, le groupe A composé de souches humaines apparues entre 1976 et 1996 ; en rouge, le groupe B contenant les souches isolées de carcasses animales et les souches responsables des deux dernières épidémies humaines ; en bleu, le groupe R composé de souches humaines isolées entre 2001 et 2003. En noir sont les séquences d'autres espèces (REBOV et SEBOV). Les points correspondent aux identités de nucléotides. Les changements entraînés par les substitutions de nucléotides dans la séquence aminoacide prédite sont localisés au dessus de l'alignement et indiquent la position de l'acide aminé muté.

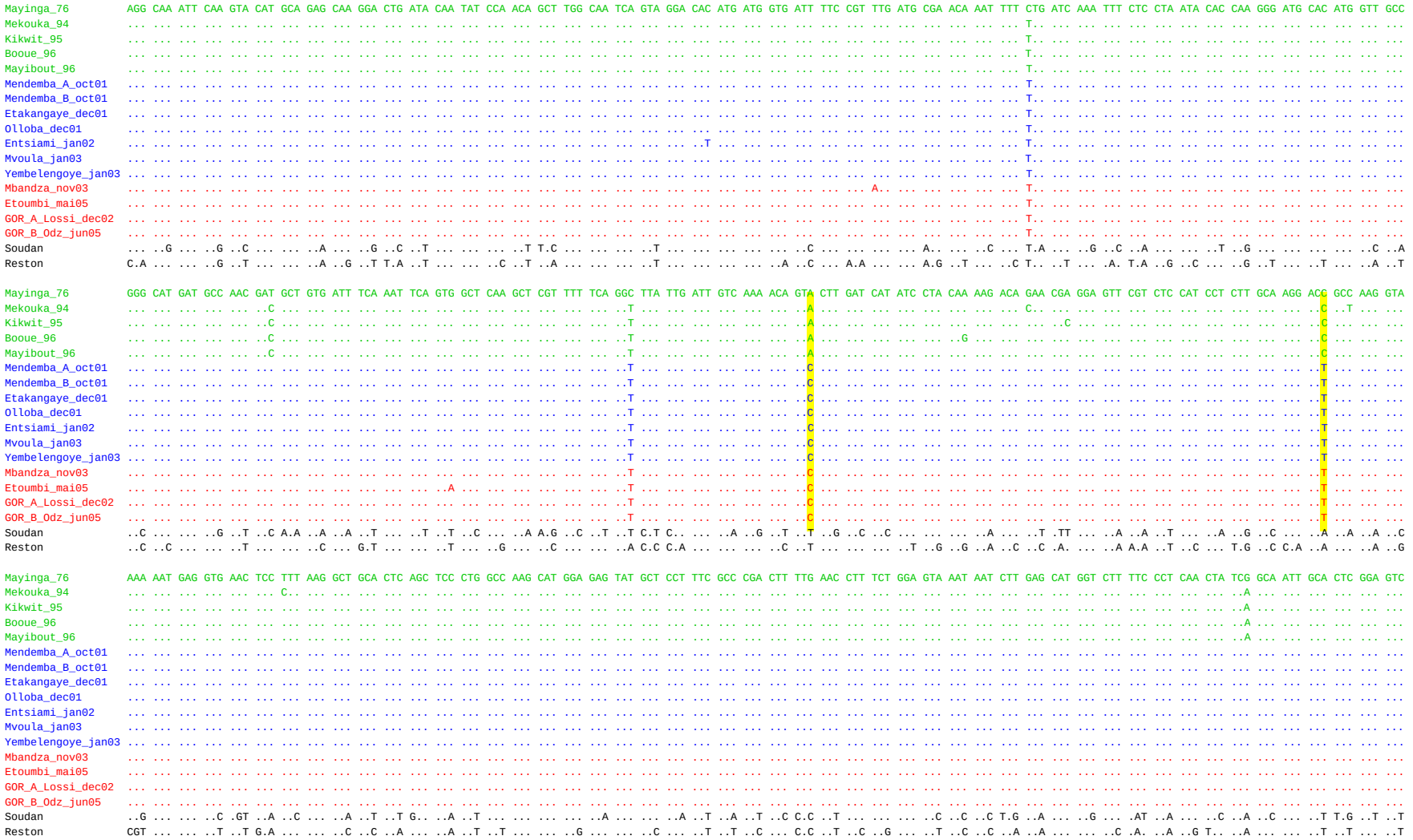


Figure 25 : suite

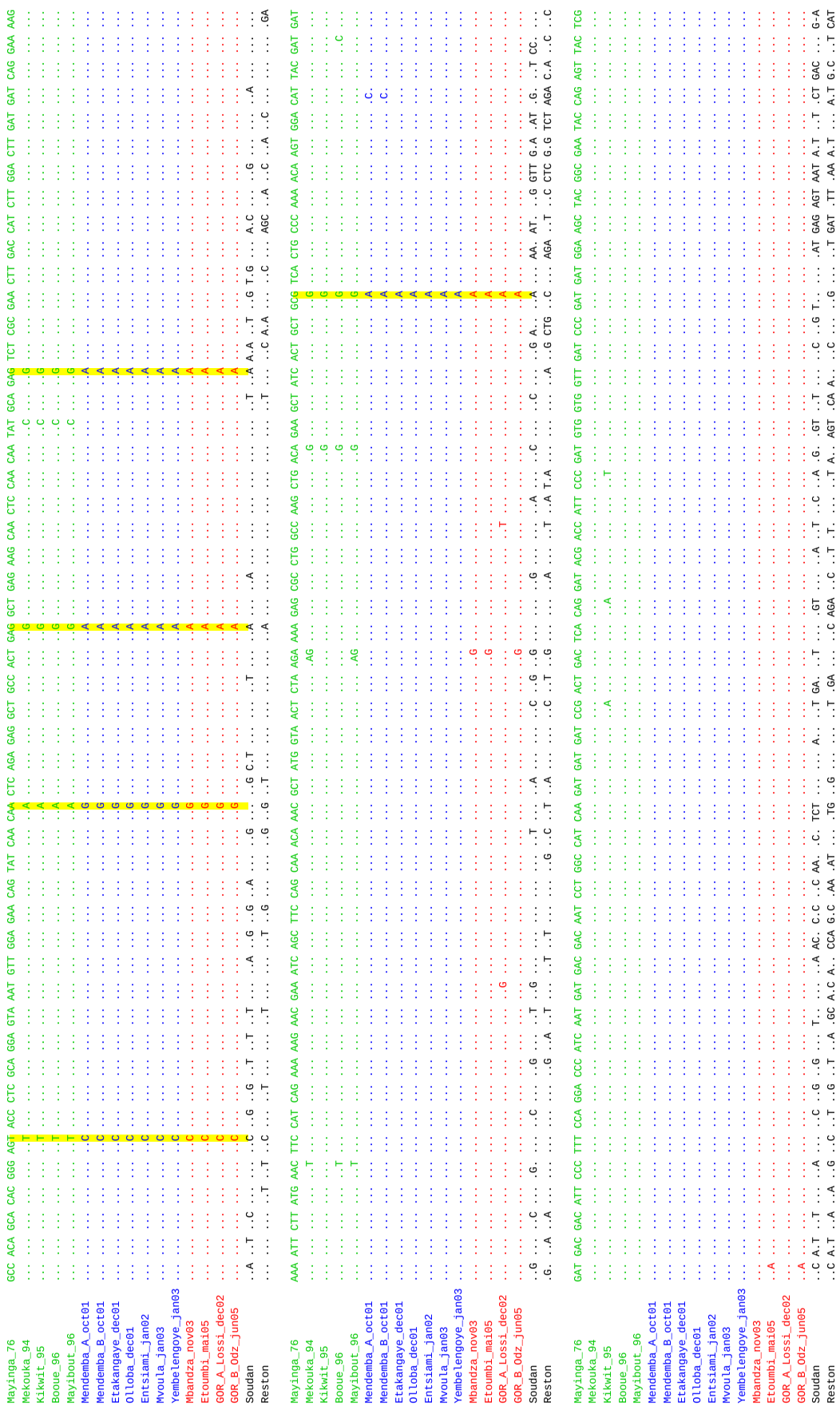


Figure 25 : suite

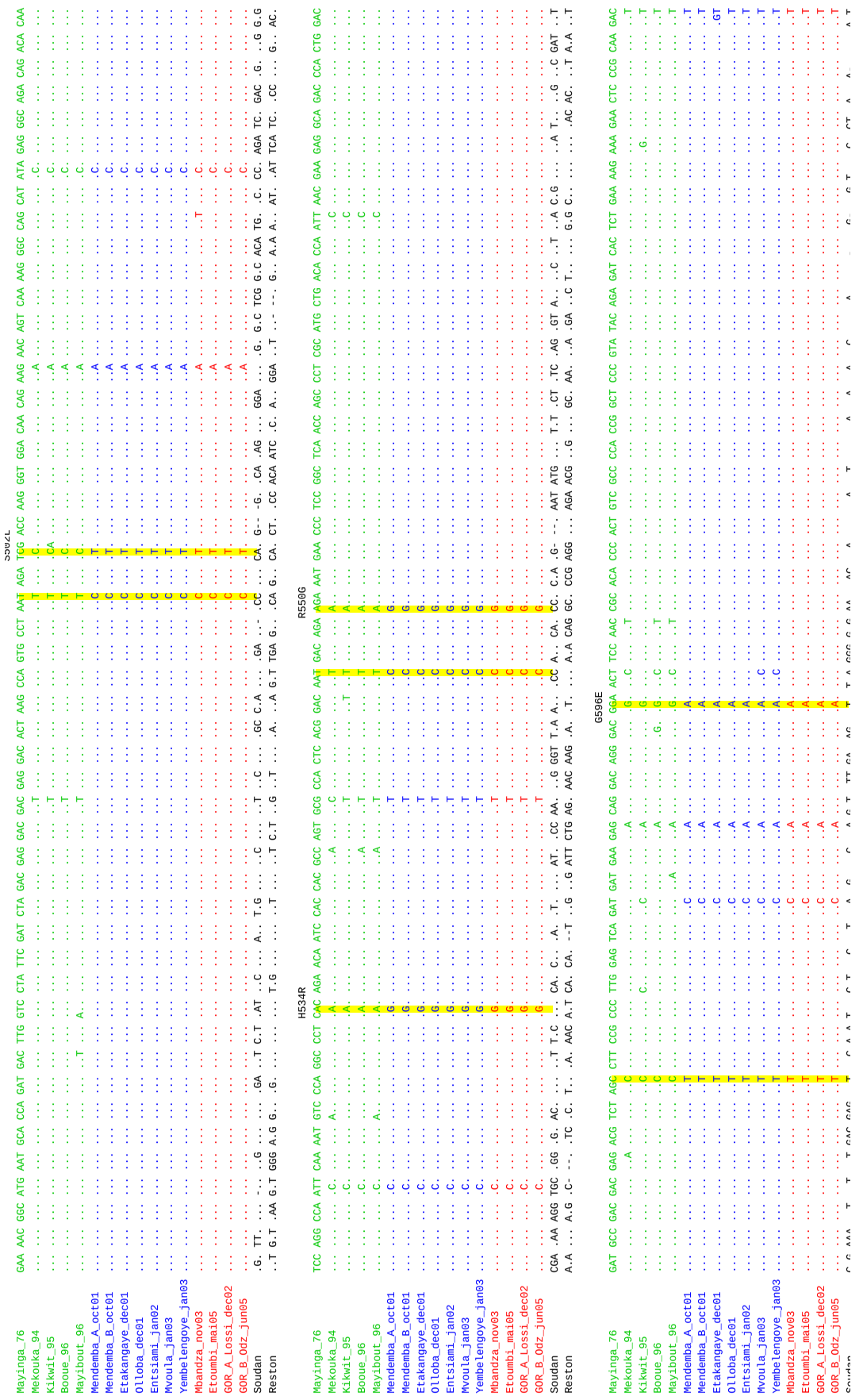
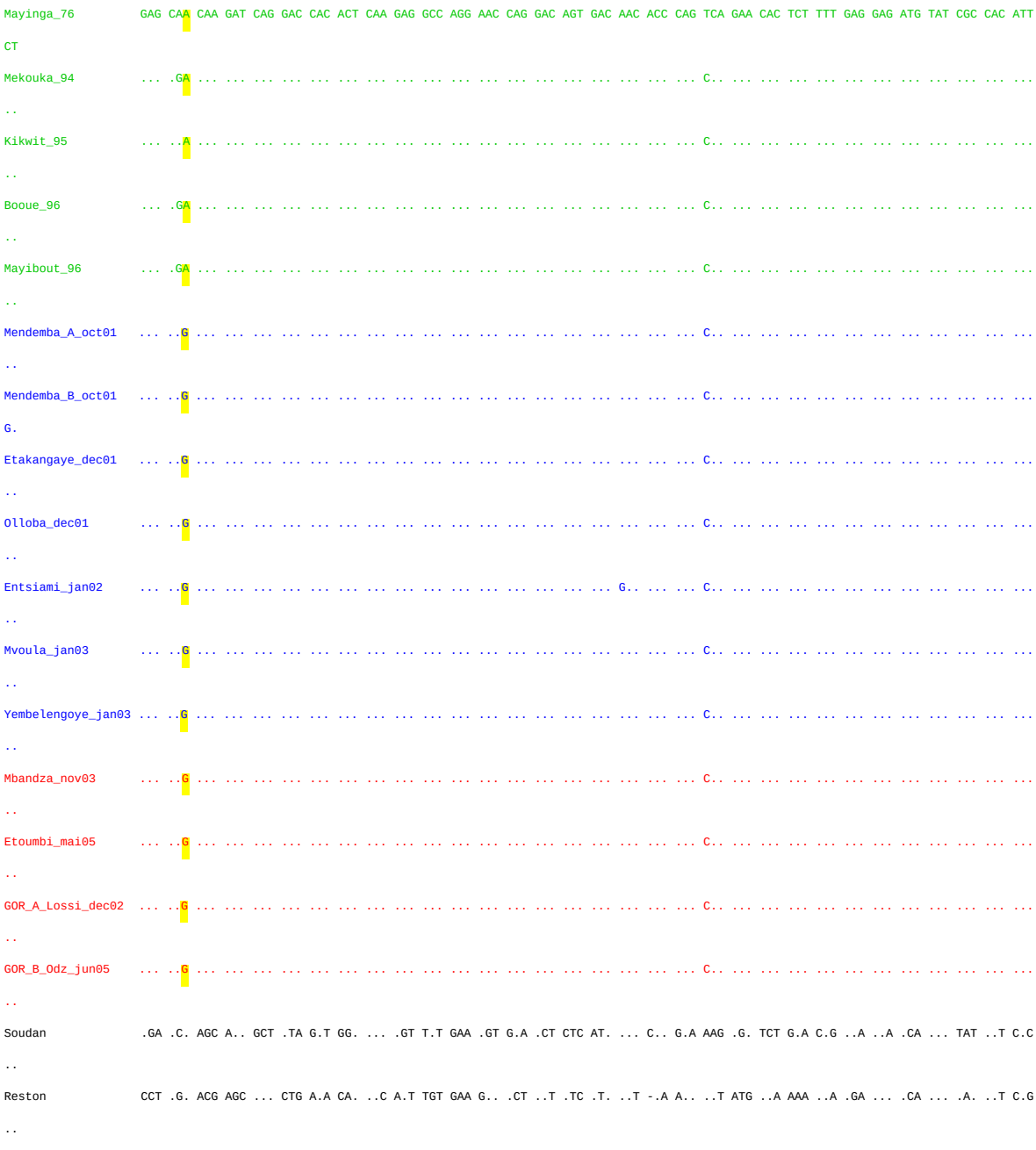


Figure 25 : fin



IV. Analyses phylogénétiques

Enfin, les relations phylogénétiques des souches ont été comparées par la construction d'arbres basés sur les gènes de la GP puis de la NP (Figure 26) selon 4 méthodes différentes : les méthodes bayésienne, du maximum de vraissemblance (ML), du maximum de parcimonie (MP) et du plus proche voisin (NJ). Toutes les méthodes aboutissaient à des arbres similaires.

L'arbre A de la figure 26 est construit à partir des séquences totales de la GP grâce au logiciel MrBayes. Il fait ressortir la séparation des souches en deux lignées dont la composition est celle déterminée par les signatures moléculaires : les souches humaines composent le groupe A, toutes les souches descendent les unes des autres en fonction du temps (date de prélèvement) et de la plus ancienne, Mayinga_76 ; les souches d'origine animale et celles des deux dernières épidémies humaines forment un nouveau groupe distinct dans l'espèce *Zaïre*. A l'intérieur de ce nouveau groupe, les trois souches originaires de carcasses trouvées à Lossi (les deux gorilles GOR_Lossi_dec02 et CH_Lossi_fev03) se groupent ensemble, les souches des deux gorilles étant plus proches.

La séparation entre les deux lignées est soutenue par les fortes probabilités postérieures bayésiennes et les valeurs de bootstrap en ML indiqués au niveau des nœuds.

L'arbre B a été construit selon la méthode NJ à partir des séquences partielles de la GP. La topologie est similaire à celle obtenue avec les autres méthodes (arbre A). La séparation en deux groupes est également retrouvée. Les trois séquences GOR1_Odz_jun05, GOR2_Odz_jun05 et GOR_Mbandza_jun03, dont la totalité de la GP n'est pas disponible, se situent avec les autres souches d'origine animale. Ces séquences partielles sont plus proches des souches issues des dernières épidémies humaines que des souches de Lossi qui forment un cluster à part.

L'arbre C de la figure 26 est quand à lui basé sur les séquences de la NP. En accord avec l'arbre basé sur la GP, les souches issues des deux dernières épidémies humaines et d'origine animale forment un groupe phylogénétiquement distinct des souches isolées entre 1976 et 1996. Toutefois, les positions des souches humaines isolées entre 2001 et 2003 (constituant le groupe R, en bleu) diffèrent entre les deux arbres. Alors que les souches du

groupe R étaient apparentées aux souches du groupe A dans l'arbre basé sur la GP (Figure 26A, B), elles se positionnent avec les souches du groupe B dans l'arbre basé sur la NP (Figure 26C). L'incongruence des souches du groupe R suggère fortement l'existence d'un événement de recombinaison entre les souches des groupes A et B, dont les positions dans les arbres sont stables, et qui se serait produit entre 1996 et 2001.

La topologie des arbres fait ressortir un ordre temporel des séquences. En effet, les souches de la lignée A ont été isolées entre 1976 et 1996, celles du groupe R sont responsables d'épidémies humaines entre 2001 et début 2003. Dans la lignée B, les gorilles de Lossi ont été découverts fin 2002-début 2003, les autres souches ont été isolées à partir de novembre 2003.

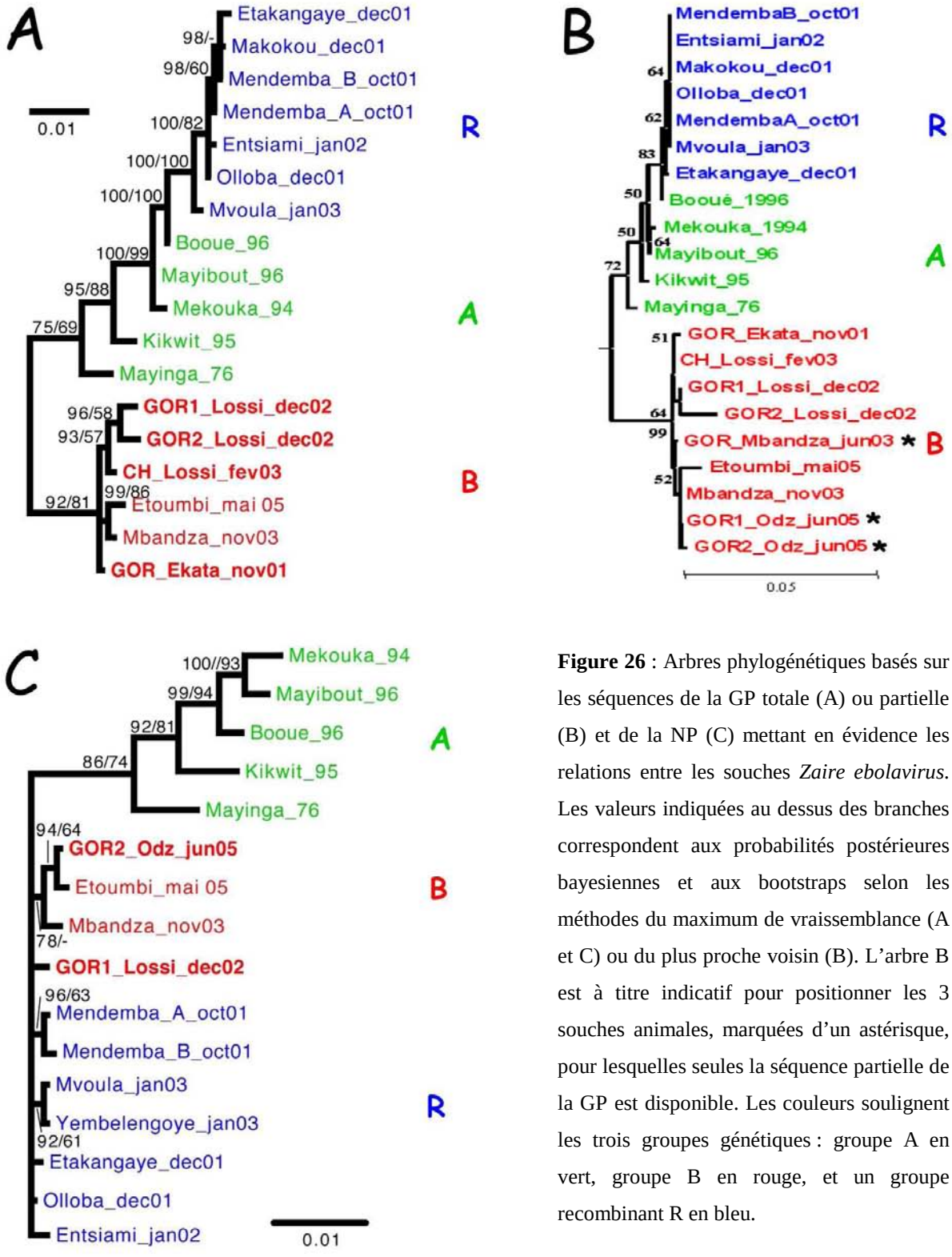


Figure 26 : Arbres phylogénétiques basés sur les séquences de la GP totale (A) ou partielle (B) et de la NP (C) mettant en évidence les relations entre les souches *Zaire ebolavirus*. Les valeurs indiquées au dessus des branches correspondent aux probabilités postérieures bayesiennes et aux bootstraps selon les méthodes du maximum de vraissemblance (A et C) ou du plus proche voisin (B). L'arbre B est à titre indicatif pour positionner les 3 souches animales, marquées d'un astérisque, pour lesquelles seules la séquence partielle de la GP est disponible. Les couleurs soulignent les trois groupes génétiques : groupe A en vert, groupe B en rouge, et un groupe recombinant R en bleu.

V. Etude de la variabilité

Les diversités génétiques ont été calculées sur la base des gènes GP et NP par comparaison des séquences par paires.

Les diversités génétiques obtenues à l'intérieur d'un groupe sont plus faibles que les diversités obtenues par comparaison de deux groupes (Tableau XI). Ainsi, les divergences nucléotidiques et aminoacides basées sur la GP à l'intérieur des groupes A et B (1,02 et 2,23 % pour le groupe A ; 0,53 et 0,94 % pour le groupe B) sont plus faibles que les divergences entre les deux groupes (2,86 et 6,1% entre A et B). On observe également que la diversité du groupe R comparé au groupe A est plus faible que sa diversité comparée au groupe B (1,18 et 2,73% entre R et A contre 3,56 et 8,15 % entre R et B). Ce résultat confirme la distribution des signatures moléculaires, qui groupait les séquences du groupe R avec celles du groupe A.

Bien que ces différences soient plus subtiles sur la base de la NP, les divergences suivent la même tendance. Les divergences à l'intérieur des groupes A et B (1,29 et 1,12 % pour A ; 0,25 et 0,34 % pour B) sont plus faibles que les divergences entre les deux groupes (2,23 et 1,70 %). De même, la divergence plus faible entre les groupes R et B (0,25 et 0,32 %) comparée à la divergence entre les groupes A et R (2,15 et 1,62 %) confirme les signatures moléculaires communes aux séquences R et B.

La différence observée entre les divergences à l'intérieur des groupes et les divergences entre les groupes confirme l'existence de trois groupes de séquences.

Tableau XI : Divergences génétiques à l'intérieur et entre les groupes de séquences aux niveaux nucléotidique et aminoacide basées sur les séquences de la GP (partielle) et de la NP. La moyenne, la gamme et l'erreur standard (ES) sont indiquées pour chaque groupes. Les calculs ont été menés sur les alignements de séquences présentés en figures 22 et 24.

		Nucléotides			Acides aminés		
		Moyenne	**Mini-Maxi**	**ES**	**Moyenne**	**Mini -Maxi**	**ES**
GP	Groupe A	1,02	0,19-1,77	0,14	2,23	0,35-3,49	0,38
	Groupe B	0,53	0,18-1,48	0,12	0,94	0,16-3,20	0,27
	Groupe R	0,22	0,05-0,42	0,06	0,41	0,16-0,83	0,16
	A vs R	1,18	0,42-2,24	1,8	2,73	1,16-4,82	0,52
	A vs B	2,86	2,04-3,46	0,36	6,1	3,20- 7,69	0,98
	R vs B	3,56	3,15-3,92	0,44	8,15	7,64-8,97	1,19
NP	Groupe A	1,29	0,55-1,86	0,20	1,12	0,62-1,66	0,32
	Groupe B	0,25	0,07-0,34	0,10	0,34	0,21-0,62	0,19
	Groupe R	0,15	0,07-0,27	0,06	0,22	0,21-0,42	0,12
	A vs R	2,15	1,79-2,55	0,33	1,62	1,04-2,08	0,42
	A vs B	2,23	1,86-2,55	0,33	1,70	1,04-2,29	0,43
	R vs B	0,25	0,14-0,35	0,08	0,32	0,21-0,62	0,13

VI. Datation de la séparation des groupes

Les âges de séparation des différents groupes et clusters observés dans les arbres phylogénétiques ont été estimés en combinant une analyse phylogénétique bayésienne basée sur une horloge moléculaire et les dates d'échantillonnage (Figure 26).

L'âge de la séparation des deux lignées suggéré par la topologie de l'arbre phylogénétique est confirmé par l'analyse. Les lignées A et B se seraient séparées en 1975 (intervalle de confiance entre 1972 et 1976), peu de temps avant la première apparition du virus. L'estimation sur la base de la NP aboutit à une date similaire : 1971 (intervalle entre 1955 et 1976).

La période de recombinaison avancée à partir de l'analyse phylogénétique est confirmée par l'intervalle de confiance estimé. Que ce soit basé sur la GP ou la NP, la recombinaison daterait des années 1998-2000, la date moyenne associée à l'ancêtre commun le plus récent la situant fin 1999.

Plus récemment, à l'intérieur de la lignée B, l'ancêtre commun des souches Lossi et des autres souches animales daterait du début de l'année 2000.

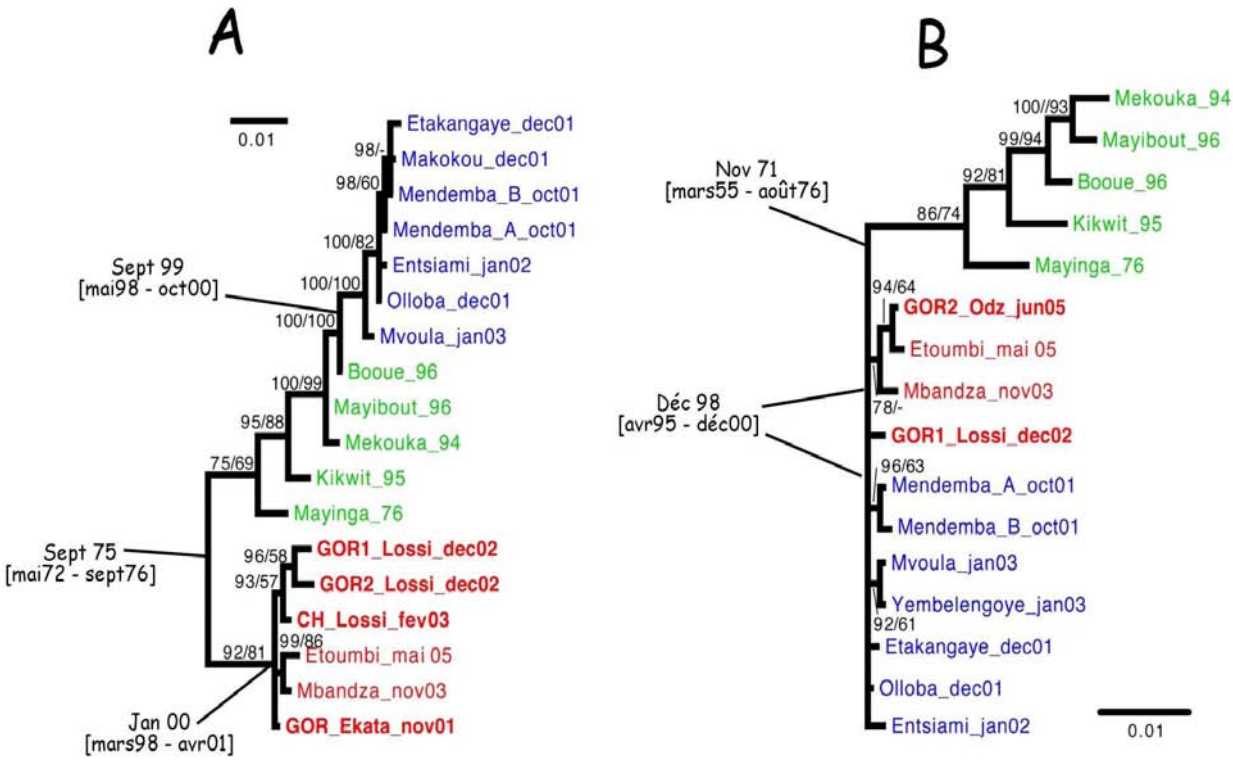


Figure 26 : Estimation de l'âge des nœuds critiques, représentant les ancêtres communs les plus récents de certains groupes de séquences. Les dates ont été estimées pour les gènes GP (A) et NP (B) grâce à une méthode bayésienne à horloge moléculaire. L'intervalle de confiance (95% de probabilité) est indiqué entre crochets sous la date moyenne associée à l'ancêtre commun le plus récent.

DISCUSSION

Depuis la première apparition de la fièvre hémorragique à virus Ebola, chaque épidémie humaine a été associée à une souche virale. Afin de mieux comprendre l'évolution du virus, il est nécessaire de caractériser les souches responsables de nouvelles épidémies.

D'autre part, les populations de grands singes sont durement touchées par ZEBOV, dont les épizooties ont décimé plus de la moitié des effectifs [31]. L'observation de l'augmentation de la mortalité animale avant une épidémie humaine [33] a entraîné la création en 2001 d'un réseau de surveillance des mortalités animales en collaboration avec les ministères gabonais et congolais de la forêt et de l'environnement et les organismes Wildlife Conservation Society (WCS) et Programme de Conservation et Utilisation Rationnelle des Écosystèmes Forestiers en Afrique Centrale (ECOFAC) [32]. Toutes les carcasses non tuées par prédation trouvées dans les parcs nationaux gérés par ces organismes sont prélevées et les échantillons sont envoyés au CIRMF pour diagnostic.

Cette étude a pour but de caractériser les nombreux échantillons humains et animaux obtenus à partir de 2001 lors des épidémies et grâce au réseau de surveillance des mortalités animales. Les résultats obtenus éclairent d'un jour nouveau les connaissances sur l'évolution et l'épidémiologie de ZEBOV.

I. Mise au point d'un outil diagnostic

Lorsque l'épicentre d'une épidémie de FHVE est proche du CIRMF, une équipe de l'Unité des Maladies Virales Émergentes part sur le terrain. L'équipe collecte des prélèvements et les achemine à Franceville où le diagnostic sera réalisé dans les laboratoires du CIRMF. Cependant, les flambées ne sont pas toujours proches d'un centre de référence, et un outil de diagnostic adapté aux conditions de terrain serait un atout majeur dans la détection rapide des cas. La mise au point du diagnostic par immunofiltration répond à cette attente.

Bien que moins sensible que la RT-PCR, la méthode par immunofiltration montre une sensibilité équivalente à la détection d'antigènes par ELISA [101, 107], avec l'avantage de la rapidité et de la facilité d'exécution. Cette méthode est basée sur une technique

précedemment évaluée pour la détection d'anticorps [395] et de protéines du sérum [396]. Ce test s'est révélé spécifique pour les antigènes ZEBOV. Il permet également de détecter les antigènes SEBOV, et ne présente que très peu voire aucune réaction croisée avec les antigènes REBOV et CIEBOV. Il est important de rappeler que les espèces ZEBOV et SEBOV étant les seules responsables des victimes humaines de FHVE, à l'exception du cas unique causé par CIEBOV [10], la détection des antigènes de ces deux espèces est majeure pour la santé publique.

La limite de détection du test par immunofiltration observée lors de la mise au point est en accord avec la virémie moyenne détectée en phase symptomatique (10^6 pfu/ml, avec des pics à 10^8 ou 10^9 pfu/ml) [105]. La concordance de la sensibilité et de la virémie moyenne, ainsi que les essais de diagnostic effectués lors de l'épidémie de 2003 en RC suggèrent que cette méthode pourrait apporter une solution aux difficultés de diagnostic pour les épidémies éloignées des centres de référence [29]. De plus, l'inactivation des échantillons biologiques par le SDS a montré une meilleure sensibilité par rapport aux échantillons natifs. Les conditions de biosécurité étant difficilement adaptées au terrain, une méthode de diagnostic sur échantillons inactivés possède un avantage considérable sur les autres méthodes de détection de l'antigène.

Le dernier avantage de l'immunofiltration réside dans sa compatibilité avec les modes de prélèvements non-invasifs. En effet, lors des épidémies passées au Gabon et en RC, les populations sont devenues de plus en plus réticentes au prélèvement sanguin. Les croyances culturelles, la peur de la sorcellerie ou du risque d'infection nosocomial par la réutilisation de seringues contaminées amenèrent les populations à dénigrer les prélèvements sanguins [397]. La mise en évidence de EBOV dans les fluides séminal et vaginal, dans les larmes et la salive [58, 398] ouvre la voie du diagnotsique aux prélèvements non-invasifs, obtenus plus facilement dans de meilleures conditions sécuritaires. De plus, grâce à la possibilité d'utiliser l'immunofiltration sur de gros volumes (jusqu'à 10ml), la sensibilité de la technique pourrait être élevée, même si la concetration d'EBOV est généralement plus faible dans l'urine et la salive que dans le sérum.

En conclusion, un outil de diagnostic rapide et adapté aux conditions de terrain a été developpé. Cette technique implique une inactivation simple des échantillons biologiques

et des résultats précis sont disponibles en 30 minutes, sans équipement lourd ni électricité. Avec les avancées dans la recherche d'un traitement contre la FHVE [154, 399, 400], le diagnostic et le suivi précoces deviennent plus importants. Ce test pourrait se révéler utile pour le diagnostic précoce lors des épidémies futures et pourrait être adapté pour la détection d'autres agents pathogènes tels que MARV.

II. Caractérisation de nouvelles souches virales

Au commencement de cette étude, seules 12 séquences de la GP étaient disponibles dans les banques de gènes, ainsi que 6 séquences de la NP. Sept d'entre elles furent caractérisées par l'Unité des Maladies Virales Émergentes du CIRMF. Toutes étaient issues de prélèvements humains obtenus lors d'épidémies entre 1976 et 2003.

Entre octobre et décembre 2003, puis entre avril et juin 2005, deux nouvelles épidémies de FHVE furent déclarées en République du Congo (RC). L'appartenance de ces isolats viraux à l'espèce *Ebolavirus zaïre* fut confirmée par plusieurs méthodes de diagnostic, dont l'amplification et le séquençage du gène codant la GP.

D'autre part, la surveillance des mortalités animales entre 2001 et 2006 a permis de prélever 47 animaux morts, dont 18 gorilles et 5 chimpanzés. Les méthodes de diagnostic ont identifié 12 gorilles et 3 chimpanzés infectés par ZEBOV (Tableau III et [32]). Cependant, les conditions de température et d'humidité de la forêt équatoriale entraînent une décomposition rapide des carcasses et du matériel génétique. De ces grands singes positifs, seules les souches de 6 gorilles et un chimpanzé ont pu être séquencées.

Les séquences totales et partielles codant la GP et la NP viennent augmenter les données disponibles pour l'étude de l'évolution du virus Ebola. Parmi elles sont les premières séquences d'origine animale à être publiées.

III. Les souches de ZEBOV sont divisées en deux lignées génétiques

Jusqu'à ce jour, les connaissances sur l'évolution de ZEBOV étaient exclusivement basées sur les données moléculaires obtenues à partir d'infections humaines et impliquaient le seul gène de la GP. Les souches representaient une seule lignée avec une relation de descendance en fonction du temps [25, 392].

La caractérisation des souches d'origine animale fait apparaître une deuxième lignée génétique, composée des séquences animales et des deux épidémies humaines les plus récentes.

La séparation est marquée par la présence de signatures moléculaires (nucléotides communs aux séquences d'une lignée et différents des nucléotides communs à l'autre lignée au même site). Trente signatures nucléotidiques (soit 13 acides aminés spécifiques) sont présentes dans la séquence codant la GP ainsi que 15 signatures nucléotidiques (soit 4 modifications d'acides aminés) dans la séquence de la NP.

Cette séparation est également appuyée par la diversité observée entre les séquences de la lignée A (d'origine humaine) et celles de la lignée B nouvellement décrite. En effet, la distance moyenne entre les lignées est nettement supérieure à la distance moyenne à l'intérieur de chaque lignée. De plus, la distance minimale pour le gène de la GP entre les lignées A et B (2,04 et 3,20% aux niveaux nt et aa, respectivement) est supérieure à la distance maximale à l'intérieur de chaque lignée (1,77 et 1,48% au niveau nt A et B ; 3,49 et 3,20% au niveau aa). Cette tendance est moins marquée mais présente pour le gène de la NP.

Les divergences calculées sur les séquences GP et NP entre les différentes souches ZEBOV paraissent faibles par rapport aux distances observées chez le VIH et le virus de la fièvre de Crimée-Congo. Pour ce dernier, les segments M (codant la glycoprotéine) de différentes souches virales présentent 31% de différences dans leurs séquences nucléotidiques et 27% dans les séquences déduites d'acides aminés [244]. D'un autre côté, les divergences calculées dans cette étude correspondent aux distances observées pour le

virus de la fièvre de la Vallée du Rift, où les séquences nucléotidiques diffèrent au maximum de 4,5% [238].

Des distances aussi faibles sont pourtant significatives lorsque les génomes viraux sont très stables. En effet, une étude précédente centrée sur une zone variable du gène de la glycoprotéine (GP) a montré que ZEBOV isolé pendant l'épidémie de 1995 à Kikwit est génétiquement stable au cours de l'épidémie et des chaînes de transmission [58]. De même, il n'y a aucune variation dans les séquences nucléotidiques de la GP et la NP parmi des isolats de patients convalescents, décédés ou asymptomatiques [25]. Ainsi, la séquence de Booué_96 diverge de seulement 1 à 1,7% avec les séquences antérieures, pourtant séparées d'environ 3 000km et de près de 20 ans [25].

Enfin, l'analyse des séquences couplée à leur date d'échantillonnage supporte la séparation en deux lignées et confirme la datation de cet événement avant la première apparition de ZEBOV en 1976. Supposant que le virus évolue à un taux constant, le taux d'évolution correspondant de 8 10^{-4} substitutions/site/an déduit des analyses phylogénétiques est similaire aux taux généralement trouvés chez les virus à ARN [84, 401]

III.1. Évolution des virus à ARN responsables de fièvres hémorragiques

Plusieurs lignées phylogénétiques sont également retrouvées chez les autres virus responsables de fièvres hémorragiques chez l'homme.

L'étude de la séquence du petit fragment révèle trois lignées phylogénétiques dans le groupe antigénique des *Arenavirus* du Nouveau Monde, et plusieurs lignées distinctes parmi les isolats du virus Pirital (Vénézuela) [402, 403]. Selon le virus étudié, l'évolution peut ou pas être liée à la géographie, l'hôte rongeur ou le potentiel épidémique chez l'homme [404].

De même, les séquences des *Hantavirus* (famille *Bunyaviridae*) Tula et Puumala sont divisées en 2 et 7 lignées groupées selon une distribution géographique [257, 405]. Le

virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (*Nairovirus*) est lui aussi divisé en lignées géographiques [244].

Les exemples de plusieurs lignées phylogénétiques existent aussi chez les *Mononégavirales*, virus dont l'ARN n'est pas segmenté. Les lyssavirus (*Rhabdoviridae*) d'une même zone géographique tendent à se grouper ensemble, de même que les virus isolés de la même espèce hôte [406].

Plus récemment, les séquences des génomes complets de *Marburgvirus* issus de multiples cas confirmés lors de l'épidémie Angola_2005 et d'une protéine virale issue de l'épidémie RDC_1998 ont été comparées aux séquences déjà connues. Ces études ont montré la séparation des séquences en deux lignées. La première lignée est composée des séquences d'Angola, l'autre des séquences de RDC. Ces dernières se divisent en 9 groupes phylogénétiques [278, 407].

La mise en évidence de plusieurs lignées phylogénétiques n'est donc pas une nouveauté parmi les virus à fièvre hémorragique ou les *Filoviridae*.

Cependant, les lignées précédemment décrites sont pour la plupart des lignées géographiques ou fonction de l'espèce hôte. Les lignées décrites pour l'espèce ZEBOV sont particulières car isolées dans la même zone géographique, à partir de carcasses animales ou de cas humains infectés auprès d'une source animale. Elles n'ont pas de relation avec les dimensions spatiale ou d'hôte. L'analyse phylogénétique montre au contraire une séparation des souches en fonction du temps.

III.2. Plusieurs lignées suggérées par les données épidémiologiques sans pouvoir être démontrées

Les différentes enquêtes de séroprévalence menées depuis les premières épidémies indiquent la circulation du virus Ebola en l'absence de cas cliniques. En effet, dans des régions sans passé épidémiques telles que le Cameroun, la République de Centreafrique (RCA) ou des villages non touchés de RDC, les enquêtes ont observé des taux d'anticorps IgG dirigés contre ZEBOV allant de 5,9 à 37,5% [36, 38-41].

De même, de fortes séroprévalences en anticorps dirigés contre ZEBOV ont été retrouvées dans les populations primates captives et exportées (43% d'anticorps réagissant aux filovirus REBOV, ZEBOV, et MARV) ou sauvages (12,9% des chimpanzés du Gabon, du Cameroun et de RCA ont des anticorps anti-EBOV) [408, 409].

La présence de taux de séroprévalence non nuls (voire élevés selon le groupe ethnique) suppose que les chimpanzés et les villageois vivent au contact du virus, ou de son réservoir naturel. L'absence de cas clinique suppose soit des cas isolés non reconnus, soit des infections non létales ou asymptomatiques chez les chimpanzés. L'infection asymptomatique a été démontrée chez l'homme lors d'épidémies due à l'espèce *Zaïre* ou d'épizooties dues à l'espèce *Reston* [3, 211].

Plusieurs souches moins virulentes ou non pathogènes pourraient circuler et former une (ou des) lignée(s) distinctes des souches hautement pathogènes. Un exemple de souches moins virulentes pourrait être ces souches dites « atypiques ». En effet, la chaîne épidémiologique dans laquelle a été isolé la souche atypique humaine ne présentait que 50% de mortalité dans une épidémie au taux de mortalité moyen de 80%. Leur profil particulier (positif pour la capture d'antigènes, mais négatif en amplification par PCR) suggère des mutations au niveau de la zone d'hybridation des amorces. Cependant, l'infection asymptomatique chez l'homme ne résulte pas de mutations, au moins dans les deux gènes testés [211].

En conclusion, les taux de séroprévalence d'anticorps dirigés contre ZEBOV dans des régions sans aucun passé épidémique supposent l'existence de souches peu ou pas pathogènes infectant les hommes et les grands singes.

III.3. Composition de la lignée B

Nous avons vu précédemment que d'autres virus à ARN peuvent être séparés en lignées phylogénétiques basées sur la géographie ou leur potentiel épidémique.

Dans le cadre de notre étude, toutes les souches ont été isolées dans la même zone géographique : les forêts et villages du nord-est du Gabon et de la Cuvette Ouest du Congo. D'autre part, le potentiel épidémique pour l'homme ou les grands singes ne peut être pris en compte. En effet, les épidémies humaines ont pour la plupart une source

animale. Les souches isolées lors d'épidémies humaines ont aussi infecté un ou plusieurs animaux avant de passer à l'homme.

Pourtant, toutes les souches d'origine animale se groupent dans cette lignée nouvellement décrite. Pourrait-il y avoir une corrélation entre la lignée génétique, l'espèce sensible et la virulence ? La lignée B contiendrait alors des souches de moindre pathogénicité dont l'existence est supposée par les études de séroprévalence. Si des différences de virulence chez les grands singes ne peuvent être étudiées, la lignée B comporte également deux souches responsables d'épidémies humaines. Or, ces deux épidémies étaient caractérisées par des taux de mortalité similaires aux épidémies précédentes (85% pour Mbandza_03 et 75% pour Etoumbi_05, comparés au 80% de moyenne pour cette espèce virale). Au niveau de l'infection chez l'homme, aucune différence de virulence n'est observée entre les souches des deux lignées.

Les souches de la lignée A pourraient-elles être moins pathogènes pour les grands singes ? Outre le fait que les épidémies humaines aient pour la plupart une source animale, les souches virales utilisées dans les protocoles de vaccination appartiennent à la lignée A (principalement la souche Mayinga_76). Or l'infection expérimentale de singes macaques par Mayinga_76 est mortelle dans 100% des cas [173]. Le fait qu'aucune souche de la lignée A n'ait été retrouvée dans une carcasse animale pourrait être imputé à un biais d'échantillonnage, la mortalité animale n'étant pas surveillée lors des premières épidémies.

III.4. Pourquoi la lignée B n'est-elle détectée qu'après 2001 ?

Les analyses phylogénétiques montraient que les deux lignées se seraient séparées avant la première apparition de ZEBOV en 1976. L'estimation de l'âge du nœud confirme cette hypothèse en datant de 1975 l'ancêtre commun le plus récent entre les deux lignées (l'intervalle de confiance allant de 1955 à 1976).

Pourquoi la lignée B n'est-elle détectée qu'après 2001, alors que les souches existent depuis plus de 30 ans ?

Là encore, un biais d'échantillonnage peut être invoqué. Cependant, une hypothèse plus plausible serait la non pathogénicité de l'ancêtre commun de la lignée. Les souches de cette lignée seraient devenues pathogènes suite à une accumulation de mutations ponctuelles. L'acquisition de la pathogénicité a été démontrée sur le modèle animal. En effet, des souches ZEBOV non létales pour des cochons d'Inde peuvent devenir mortelles lorsqu'elles subissent plusieurs passages sur les animaux [96]. Les souches non pathogènes peuvent alors facilement circuler sans être détectées, puisque toutes les souches identifiées à ce jour sont issues de cas cliniques ou de carcasses infectées.

Ces changements phénotypiques pourraient avoir eu lieu en relation avec la transmission du virus Ebola entre les espèces de chauve-souris supposées réservoir. En effet, les analyses phylogénétiques font apparaître un groupement des souches virales en fonction du temps. Les changements phénotypiques auraient pu se produire avant l'introduction de ZEBOV dans l'espèce (les changements génétiques entraînent le changement d'espèce hôte) ou après l'introduction (les changements génétiques sont la conséquence du changement d'hôte). Cependant, l'analyse des séquences partielles obtenues à partir de sérums de chauve-souris ont permis de remonter à un ancêtre commun récent, c'est-à-dire une récente séparation des lignées génétiques, et non une espèce réservoir ancestrale [84]. L'existence d'un ancêtre commun à toutes les séquences dérivées des chauves-souris frugivores est surprenante. L'origine commune des séquences de chauve-souris, et par là même la récente apparition des souches de la lignée B, pourraient être la conséquence d'un entonnoir génétique subit par le virus.

Une première possibilité émise lors d'une étude précédente [84] serait une diminution drastique du nombre de chauve-souris infectées vers 1999, qui entraînerait la perte de toutes les souches virales sauf une. Ceci pourrait expliquer l'apparition de la lignée B à partir de 2001, mais ne prend pas en compte les souches humaines apparues entre 2001 et 2003, qui, d'après l'arbre phylogénétique construit sur le gène de la GP, descendent des souches humaines plus anciennes de 1976 à 1996. Cette hypothèse serait plausible si la diminution de la population infectée était située vers le milieu de l'année 2003, puisque la dernière souche humaine de la lignée A a été isolée en janvier, et l'épidémie suivante a été causée par une souche de la lignée B (Mbandza, en novembre).

Bien qu'elle apporte des preuves complétant les études épidémiologiques précédentes et la mise en évidence d'une virémie transitoire lors d'infections expérimentales [28, 75], les trois espèces de chauve-souris frugivores identifiées pourraient ne pas être le seul réservoir de ZEBOV. L'existence d'une ancêtre commun pourrait alors être expliquée par l'introduction simultanée du virus à partir d'un réservoir encore inconnu dans les populations de chauves-souris frugivores et d'autres espèces animales, concomitant avec l'émergence du virus chez l'homme.

Cette hypothèse, qui n'exclue pas une espèce chauve-souris comme réservoir primaire, est supportée par l'étude des virus de la rage en Europe. En effet, il a été démontré que le passage d'une espèce réservoir à une autre peut être causé par de petits changements génétiques dans les séquences des Lyssavirus. Bien que le rôle déclencheur d'une pression environnementale ne soit pas encore clair, une forte densité d'hôte susceptible et la proximité d'une espèce donneuse pourraient être des facteurs écologiques majeurs dans le changement d'hôte des virus de la rage [406]. Le changement d'espèce pourrait être, comme nous l'avons vu précédemment, précédé ou suivi de mutations ponctuelles qui auraient permis aux souches de la lignée B d'acquérir leur pathogénicité. Dans cette hypothèse, les virus de la lignée B nouvellement introduits dans la populations domineraient les virus de la lignée A. Ceci pourrait expliquer pourquoi les humains et primates infectés depuis 2001 l'ont été avec des souches de la lignée B et des souches recombinantes.

IV. Évènement de recombinaison entre les lignées

Les arbres phylogénétiques construits sur les gènes de la GP et de la NP montrent une incongruence dans la topologie des souches isolées à partir des épidémies humaines entre 2001 et 2003 (nommées groupe R). La suspicion de recombinaison est appuyée par les distances génétiques entre les groupes. La distance entre les souches A et R est plus faible que la distance entre R et B dans le cadre de la GP. Sur la base de la NP, la distance entre A et R est au contraire plus grande que la distance entre R et B, impliquant que les souches du groupe R sont plus proches pour ce gène des souches de la lignée B. De même, les

signatures moléculaires sont communes aux séquences NP du groupe R et de la lignée B ; pour les séquences GP, le groupe R partage les mêmes signatures que la lignée A.

Ces éléments sont les premiers indices d'un événement de recombinaison au sein de la famille des Filoviridae. Le génome d'*Ebolavirus* étant constitué de 7 gènes disposés comme suit : 5'-leader-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-trailer-3', la recombinaison pourrait se dérouler dans la région comprise entre les gènes NP et GP.

La recombinaison de l'ARN est un processus qui joue un rôle important dans l'évolution de virus animaux ou de plantes par la génération de variabilité génétique, par élimination des mutations létales ou délétères, par la création de nouveaux génotypes, ou par l'acquisition de la pathogénicité [410, 411].

Contrairement à la recombinaison de l'ADN, qui implique généralement un ADN double-brin et qui se produit par coupure-jonction, ou plus rarement par changement de brin matrice lors de la réplication [412, 413], la recombinaison de l'ARN n'a été démontrée majoritairement que sur des ARN simple brins. Le mécanisme impliqué serait un saut de la polymérase d'un brin à un autre lors de la synthèse d'ARN [411]. La recherche d'incongruences dans les arbres phylogénétiques construits sur 79 gènes de 35 virus à ARN négatif a mis pour la première fois en évidence des évènements de recombinaison chez certains virus étudiés [414]. La fréquence de recombinaison des virus ARN est faible, soit car ce processus serait gêné par la présence d'un complexe ribonucléoprotéique, soit car la sélection naturelle éliminerait les variants les moins adaptés [415].

Toutefois, la recombinaison de l'ARN peut se produire en absence de réplication virale. La cotransfection de fragments d'ARN de poliovirus a conduit à l'assemblage d'un génome avant la génération de l'ARN polymérase virale. Les mécanismes impliqués ici seraient une ligation des extrémités ou des cross-overs internes au niveau de séquences chevauchantes [416]. Une autre étude a de même montré la génération d'un génome pestiviral suite à la recombinaison de deux fragments incapables de se répliquer seuls [417].

La recombinaison a fréquemment été démontrée chez les virus à ARN positif. Par exemple l'alphavirus de l'encéphalite équine occidentale (Western Equine Encephalitis virus) serait dérivé d'une recombinaison entre une souche orientale et une souche

apparentée au virus Sindbis [418]. De même, de forts indices de recombinaison ont été trouvés parmi les souches du sérotype DEN-1 du virus de la Dengue (*Flaviviridae*) [419].

Cela reste cependant un événement rare chez les virus à ARN négatif, qui n'a été démontré pour la première fois qu'en 1999 sur Tulavirus (genre *Hantavirus*, famille *Bunyaviridae*) [405]. Depuis, de nombreuses recombinaisons intra-segment ont été mises en évidence chez des virus à ARN segmenté ambisens. Dans le genre *Hantavirus*, des évènements de recombinaison ont été démontrés entre les lignées génétiques que forment les virus Puumala [257]. Une autre étude suggère que 3 *Arenavirus* du Nouveau Monde (Whitewater Arroyo, Tamiami et Bear Canyon) dériveraient d'un ancêtre commun issu de la recombinaison entre des virus de 2 des 3 lignées phylogénétiques séparant les *Arenavirus* sud-américains [402, 404].

Lors d'une épidémie de fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Est, deux nouveaux virus du groupe Bunyamwera (famille des *Bunyaviridae*, virus à ARN segmenté négatif), jusqu'alors non pathogènes pour l'homme, ont été associés à des cas cliniques. Ces deux virus seraient issus d'un réassortiment du segment M [420]. Toujours chez les *Bunyaviridae*, mais dans le genre *Nairovirus*, de multiples évènements de recombinaison ont été suggérés entre les différentes souches virales de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo [421].

Un autre événement de recombinaison concerne le gène de l'hémagglutinine (HA, protéine dont le rôle est majeur dans la pathogénicité) de l'*Orthomyxovirus* Influenza (ARN négatif simple brin). La HA de la souche virale responsable de la pandémie de « grippe espagnole » de 1918 serait issue d'une recombinaison entre les HA de virus humains et porcins [422]. Cependant, ce résultat est controversé par une seconde analyse qui attribue le profil d'évolution particulier de cet isolat à une variation du taux de substitution nucléotidique entre les différentes régions du gène de la HA [423].

Enfin, chez les virus à ARN non segmenté négatif, des évènements de recombinaison ont été démontrés pour deux Rubulavirus (famille des *Paramyxoviridae*) : les virus Mumps et de la maladie de Newcastle [414].

Nous venons de voir que la recombinaison est possible et existe à faibles taux chez différents virus à ARN. Cependant, pour qu'il y ait recombinaison, plusieurs conditions sont requises.

Tout d'abord, il faut que plusieurs lignées co-circulent dans une même région. Or, cette étude vient de montrer l'existence de 2 lignées phylogénétiques distinctes qui circulent dans la forêt de la région frontalière Gabon-Congo.

Ensuite, les souches virales doivent infecter un même hôte, dont le système immunitaire préviendrait toute infection secondaire et élimination du virus. Bien que non démontrée directement, cette condition est en théorie remplie. En effet, la faible virémie observée dans 3 espèces de chauve-souris frugivores suggère une infection persistante par le virus Ebola. Ces espèces partagent la même niche écologique et vivent à proximité les unes des autres, créant des opportunités de super-infection. Par ailleurs, plusieurs souches virales ont été détectées dans ces espèces [83].

Enfin, une fois dans l'hôte, les virus des différentes lignées doivent infecter une même cellule et s'y répliquer. Les souches virales et l'espèce hôte doivent accepter l'infection des cellules par plusieurs virus. Aucune étude de sur-infection n'a été menée sur le virus Ebola. Cependant, la proximité génétique des lignées A et B est compatible avec ce critère.

En conclusion, cette étude présente les premiers indices d'un événement de recombinaison au sein de la famille des *Filoviridae*. Ce résultat est d'une importance capitale dans le développement d'un vaccin. A cause de l'utilisation de souches virales atténuées pour la recherche de vaccin [137, 143], la possibilité d'une recombinaison entre ces souches atténuées et des souches sauvages pourrait avoir de très graves répercussions sur la santé publique.

V. Multi-émergence ou propagation ?

L'hypothèse de la propagation de ZEBOV repose sur la transmission du virus d'individu à individu dans les populations de grands singes. La surveillance du sanctuaire de Lossi permet de suivre l'évolution de l'épizootie de FHVE qui décime la population de gorilles et suggère la transmission de ZEBOV à l'intérieur du groupe familial et entre groupes voisins [33]. De ce point de vue, et en raison de la grande stabilité génétique de ZEBOV déjà étudiée [25, 58], les individus d'un même groupe ou localité devraient être infectés par des souches virales très fortement apparentées. Au contraire, les résultats présentés ici montrent que les séquences du gène de la glycoprotéine (GP) de deux gorilles découverts à

Lossi, appartenant au même groupe et probablement contaminés au même moment, différaient pour 11 sites nucléotidiques. De plus, ces deux séquences se groupent dans l'arbre phylogénétique avec une troisième issue d'un chimpanzé. Ces résultats contredisent l'hypothèse de la propagation et étayent celle de la multi-émergence par des évènements de contamination indépendants à partir de différentes sources réservoir [26].

D'un autre côté, si les données sont analysées du seul point de vue spatial, le nouveau groupe génétique mis en évidence par cette étude n'est retrouvé que dans une petite zone (qui ne chevauche presque pas celle des autres groupes génétiques) située à l'est de la région affectée quelques années plus tôt par les virus du groupe R. Si on ne tient compte que des données spatio-temporelles des épidémies humaines de 2003 et 2005, le profil correspond à la propagation vers l'est de ZEBOV [392]. Cependant, les données moléculaires montrent que ces récentes épidémies sont causées non pas par des virus descendant des virus isolés auparavant, mais par une nouvelle lignée génétique. Les flambées épidémiques ne peuvent donc pas être liées épidémiologiquement. Ce résultat contredit la notion d'une seule lignée virale propagée à travers la région Gabon-Congo depuis quelques années.

Les résultats obtenus lors de cette étude convergent vers des émergences multiples et indépendantes de ZEBOV et une longue persistance du virus dans la forêt de la région frontalière du Gabon-Congo. Toutefois, la faible divergence génétique entre les séquences virales implique une évolution parallèle récente et la même origine pour les lignées de ZEBOV. Bien que les virus de la nouvelle lignée B soient différents de ceux de la lignée A, la séparation des lignées est estimée avoir eu lieu dans les années 1970, et l'ancêtre commun au souches de la lignée B est daté de 1998. Forts de ces données temporelles, il devient difficile d'expliquer comment ZEBOV résiderait à long-terme dans les forêts équatoriales de la zone d'endémie. Non seulement les émergences des virus des lignées A et B se seraient directement suivies temporellement et spatialement, mais encore, les épidémies, qu'elles soient dues aux souches de la lignée A ou de la lignée B, suivraient le motif de diffusion vers l'est. Cela suggère l'existence de facteurs écologiques qui lieraient toutes les épidémies indépendamment du type génétique viral.

En conclusion, cette étude ne privilégie pas une hypothèse par rapport à l'autre. Un scénario plausible ferait intervenir une propagation des souches virales à l'intérieur de

l'espèce réservoir et la contamination des grands singes auprès de ce réservoir par de multiples contacts indépendants dans des conditions environnementales particulières. En effet, les mortalités animales ainsi que les flambées épidémiques apparaissent souvent à la fin de la saison sèche. Pendant cette période, les ressources alimentaires sont de plus en plus rares, et les populations de chauve-souris et de grands singes se retrouvent en compétition pour les mêmes fruits. C'est aussi pendant cette période que des changements comportementaux et physiologiques sont observés chez les trois espèces de chauve-souris suspectes. La rareté de la nourriture, les compétitions entre mâles et les mises bas groupées des femelles modifieraient la réponse immunitaire et favoriseraient la réplication du virus. La contamination des grands singes interviendrait alors au contact de la salive sur les fruits, du sang ou des tissus placentaires des chauve-souris [82, 83].

V. Perspectives

Nous venons de démontrer, pour la première fois, l'existence de deux lignées évolutives distinctes au sein de l'espèce *zaïre* du virus Ebola. Ces lignées auraient évolué de manière parallèle depuis leur séparation, estimée vers 1975, avant la première apparition de la fièvre hémorragique à virus Ebola. La particularité de la lignée nouvellement décrite réside dans sa composition : elle contient toutes les souches d'origine animale séquencées.

Les épidémies de 2001 à 2005 dans la région frontalière du Gabon et de la République du Congo se distinguent des autres flambées par de multiples chaînes épidémiques indépendantes et des épizooties concomitantes dans les populations de grands singes. La découverte de carcasses de gorilles et chimpanzés infectées par *Ebolavirus zaire* ouvre une nouvelle piste vers une meilleure connaissance de l'évolution de ZEBOV. Dans cette optique, les souches prélevées lors des dernières épidémies humaines, et celles prélevées sur des carcasses animales trouvées en forêt ont été caractérisées. Des fragments longs (2030 nt) du gène codant la glycoprotéine (GP) ou plus courts (538 nt) correspondant à une zone variable ont été amplifiés et séquencés, ainsi qu'un fragment (1448 nt) du gène codant la nucléoprotéine (NP).

Les analyses phylogénétiques menées par trois méthodes, la présence de signatures moléculaires et les distances génétiques calculées sur ces deux gènes font apparaître une séparation des souches avant la première apparition du virus. Basé sur le gène de la GP, l'arbre phylogénétique regroupe toutes les séquences d'origine animale dans la lignée nouvellement décrite, la lignée B, avec les séquences issues de victimes humaines des deux dernières épidémies. La lignée A comporte les séquences humaines déjà identifiées qui descendent les unes des autres en fonction du temps. Cependant, la topologie des souches d'origine humaine isolées entre 2001 et 2003 est différente pour l'arbre phylogénétique basé sur le gène de la NP. L'incongruence observée suggère fortement un événement de recombinaison entre les souches des deux lignées qui se serait produit il y a quelques années.

Ces données permettent de dégager plusieurs thèmes de recherche :

1. Afin de mieux comprendre l'évolution de ZEBOV, le génome complet des différentes souches pourra être séquencé. A ce jour, seules des souches de la lignée A (Mayinga et Kikwit) ont été entièrement caractérisées. Le séquençage de l'ensemble du génome de souches d'origine animale appartenant à la lignée B et de souches humaines recombinantes permettra d'améliorer les connaissances actuelles en génomique.

2. Les génomes des souches « atypiques » pourront également être séquencés dans leur ensemble. Pour cela, il est nécessaire d'isoler ces souches sur lignées cellulaires plus sensibles que les cellules Véro. En effet, les espèces REBOV et SEBOV infectent plus facilement les cellules MA104 et les monocytes sont des cibles primaires d'EBOV *in vivo*. Si le virus est isolé, le séquençage complet pourra être réalisé. La comparaison de leurs séquences avec celles de souches responsables d'épidémies au taux de mortalité plus élevé pourrait se révéler essentiel pour la compréhension des mécanismes de pathogénicité et la recherche d'une thérapie.

3. A partir des séquences complètes des génomes, le (ou les) point(s) de recombinaison pourra être déterminé grâce à des logiciels tels que SlimPlot. Cet outil informatique permet de comparer des séquences recombinées à des séquences parents. La séquence recombinée change de groupe parental au point de recombinaison. Les études préliminaires suggèrent un seul événement de recombinaison entre les gènes NP et GP, mais d'autres points de recombinaison pourraient exister dans le reste du génome.

4. L'existence d'une recombinaison est essentielle pour la recherche d'un vaccin. En effet, une recombinaison entre une souche virale atténuée exprimant la GP et une souche EBOV sauvage pourrait avoir de graves implications en santé publique. La détermination du point de recombinaison permettra, grâce aux connaissances des mécanismes de recombinaison, de limiter les risques lors de la production d'un vaccin.

5. Une étude pourra être menée afin de comparer les séquences obtenues sur carcasses animales avec les séquences issues de chauve-souris. En effet, les séquences codant la polymérase (gène L) de prélèvements de chauve-souris sont phylogénétiquement liées aux séquences isolées sur des prélèvements humains [84]. L'origine et la composition de la lignée B pourraient être élucidées grâce à la comparaison des souches de chauve-souris avec les souches de grands singes.

ANNEXE



Transport des produits biologiques
Document validé par les auteurs le 01.01.1997
guide sur la sécurité du transport des matières infectieuses et des échantillons de diagnostic

Genève - 1997 - ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ - Division des Maladies Émergentes et autres maladies transmissibles - Surveillance et Lutte
Document préparé par les Directeurs des Centres Collaborateurs pour la Biosécurité et par d'autres conseillers

Introduction
Les lignes directrices qui vont suivre s'appliquent au transport national et international des matières infectieuses et des échantillons Elles donnent des informations sur l'identification et le classement des marchandises à transporter ainsi que la méthode pour assurer un emballage et un transport sans danger. Elles soulignent l'importance d'établir de bonnes relations de travail entre les intervenants - l'expéditeur, le transporteur et le destinataire - afin de transporter le matériel dans de bonnes conditions de sécurité et de célérité.
Le personnel des postes, des compagnies aériennes et des sociétés de transport en général est préoccupé par la possibilité de se contaminer à la suite de l'exposition à des micro-organismes infectieux qui pourraient s'échapper de colis qui fuient, qui sont cassés ou mal emballés. L'emballage des matières infectieuses doit donc tenir compte de ces inquiétudes et être conçu pour minimiser les risques de dommages au cours du transport. En outre, l'emballage sert à assurer l'intégrité du matériel transporté et le traitement en temps utile des échantillons.
On n'a jamais signalé de cas de maladies imputables à la fuite d'échantillons pendant le trajet bien qu'on ait rapporté des incidents concernant l'emballage extérieur pour des produits convenablement emballés. L'expédition de matières infectieuses non étiquetées, non identifiées comme telles et mal emballées augmente à l'évidence les risques d'exposition pour toutes les personnes qui interviennent.
Le règlement international pour le transport des matières infectieuses, quel que soit le moyen de transport, repose sur les Recommandations du Comité d'experts des Nations Unies en matière de transport des marchandises dangereuses. L'Union postale universelle (UPU) reprend ces recommandations dans ses règlements, notamment en ce qui concerne l'emballage. L'Organisation de l'aviation civile internationale (OACI) et l'Association du transport aérien international (IATA) ont également intégré les recommandations des Nations Unies dans leurs réglementations respectives, ainsi que l'ont fait d'autres organisations internationales de transport. L'Organisation mondiale de la Santé joue un rôle consultatif auprès de ces organismes. Le présent document se veut un guide pratique pour faciliter l'observance des règlements internationaux actuels. Si, dans le futur, des modifications étaient apportées aux Recommandations des Nations Unies relatives au

transport des marchandises dangereuses dans le chapitre traitant des matières infectieuses et des échantillons de diagnostic, le présent guide serait modifié en conséquence.

Définitions
Pour la description des mesures de sécurité à appliquer au transport, les termes "matières infectieuses" et "produits infectieux" sont considérés comme synonymes. Le présent document utilisera le terme "matières infectieuses"

Matières infectieuses
Par matières infectieuses on entend les matières contenant des micro-organismes viables (bactéries, virus, rickettsies, parasites ou champignons), dont on sait ou dont on a des raisons de penser qu'ils provoquent des maladies infectieuses chez l'animal ou chez l'homme*.
En ce qui concerne l'emballage et les conditions de transport, les matières infectieuses comprennent :
1 . toutes les cultures qui contiennent ou qu'on soupçonne contenir un agent pouvant provoquer des infections ;
2. les échantillons humains ou animaux qui renferment un tel agent dans des quantités suffisantes pour provoquer l'infection si, en cas d'incident pendant le transport une exposition à ces échantillons survenait ;
3. les échantillons provenant d'un malade atteint d'une maladie grave d'origine inconnue ;
4. tous les échantillons, autres que ceux définis ci-dessus, qu'une personne qualifiée, par exemple un médecin, un chercheur, une infirmière, etc., désigne comme infectieux.
*** Cette définition est extraite des Recommandations de l'ONU relatives au transport des marchandises dangereuses. Elle ne couvre pas les prions, bien qu'ils soient considérés comme des agents infectieux.**

Échantillons de diagnostic
Par échantillons de diagnostic on entend toute matière humaine ou animale (y compris, mais pas exclusivement, les excréta, le sang et ses composants, les tissus et liquides tissulaires), prélevée à des fins de diagnostic, à l'exclusion des animaux vivants infectés. *On considère que les échantillons de diagnostic provenant de la pratique médicale ou de la recherche représentent une menace négligeable pour la santé publique.*
Les échantillons de diagnostic prélevés sur des patients chez qui l'on soupçonne une maladie infectieuse peuvent contenir des quantités limitées d'agents pathogènes. Très peu d'agents sont susceptibles de provoquer une infection à la suite d'un incident pendant le transport. *Si l'exposition accidentelle à l'échantillon durant le transport peut provoquer une infection, l'échantillon de diagnostic doit être emballé, étiqueté et transporté comme matière infectieuse.* Les échantillons de diagnostic recueillis au cours de l'enquête sur une flambée épidémique d'une maladie grave d'origine inconnue doivent être manipulés comme des matières infectieuses.

Emballage, étiquetage et documents de transport
A cause de la différence des risques inhérents aux matières infectieuses et aux échantillons de diagnostic, les prescriptions pour l'emballage, l'étiquetage et les documents de transport ne sont pas les mêmes. Les prescriptions pour l'emballage sont fixées par l'ONU et figurent dans les réglementations de l'OACI et de l'IATA au titre des Instructions d'emballage 602 et 650. Ces prescriptions sont sujettes à des modifications et à des remises à jour par ces organisations. Des emballages agréés par l'ONU sont disponibles dans le commerce.

Système de base du triple emballage
Ce système se compose de 3 couches successives telles qu'elles sont décrites ci-dessous :
1. Récipient primaire. Il contient la matière; il doit être étanche (ne pas fuir) et étiqueté. Il est enveloppé de suffisamment de matériau absorbant pour pouvoir absorber tout le liquide s'il venait à se casser.
2. Emballage secondaire. Il s'agit d'un deuxième récipient résistant, étanche (ne fuyant pas), destiné à renfermer et à protéger le(s) récipients) primaire(s). Plusieurs récipients primaires enveloppés peuvent être mis dans un récipient secondaire. Il faut alors utiliser suffisamment de matériau absorbant et de rembourrage pour caler les récipients primaires.

3. Un emballage extérieur. Le récipient secondaire est mis dans un emballage extérieur qui le protège ainsi que son contenu contre les détériorations externes (chocs ou eau) pendant le transit.

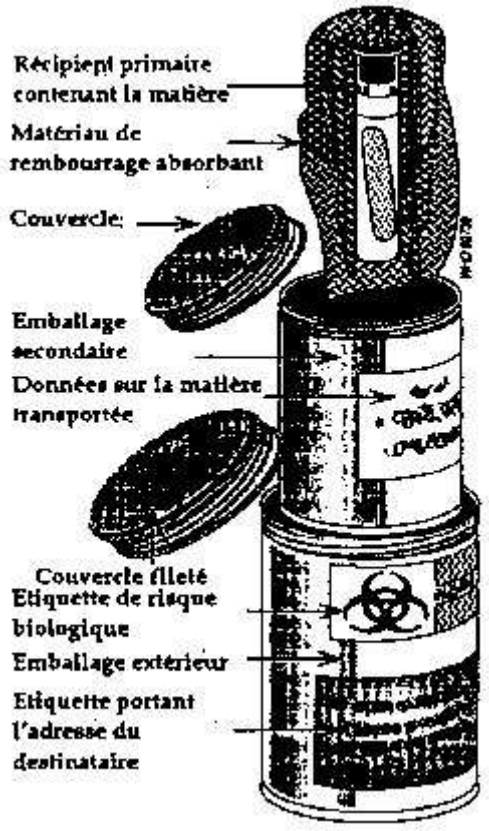


Figure 1 : Le triple emballage

On collera sur la paroi externe de l'emballage secondaire les formulaires donnant des indications sur l'échantillon, les lettres et toutes les informations identifiant ou décrivant l'échantillon ainsi que les informations identifiant l'expéditeur et le destinataire

Conditions requises pour les matières infectieuses
Le système du triple emballage s'utilise accompagné des spécifications, de l'étiquetage et de la documentation complémentaire suivante.

Les matières infectieuses ne peuvent être transportées que dans des emballages répondant aux normes de la classe 6.2 de l'ONU, conformément aux instructions d'emballage 602. Ceci garantit que les emballages ont passé avec succès les épreuves requises comportant des chutes libres d'une hauteur de 9 m et des tests de perforation. L'emballage extérieur doit porter le marquage spécifique de l'ONU (figure 2). Il est possible d'obtenir, auprès des

transporteurs, du ministère ou de l'administration nationale concernée (par exemple le ministère des transports, etc.), la liste des fournisseurs d'emballages agréés par l'ONU

Marquage spécifique pour les emballages
le marquage comprend :
le symbole des Nations unies pour les emballages
le type d'emballage
la mention "CLASSE 6.23
Les 2 derniers chiffres de l'année de fabrication de l'emballage
le nom de l'État ayant donné l'autorisation
Le code du fabricant

Les compagnies aériennes interdisent strictement le transport des matières infectieuses dans les bagages à main ou la valise diplomatique. La quantité maximale nette de matières infectieuses que peut contenir un emballage extérieur est de 50 ml ou 50 g si le transport est effectué par un avion de passagers. Autrement, la limite est fixée à 4 l ou 4 kg par colis pour les transports par avion cargo ou par d'autres moyens. Les récipients primaires dépassant 50 ml dans des emballages combinés doivent être placés de façon à ce que les fermetures soient vers le haut, et des étiquettes (flèches) indiquant "UP"' (HAUT) doivent être apposées sur 2 côtés opposés du colis. Les limites spécifiées pour le transport par avion de passagers ne s'appliquent pas au sang ou aux produits sanguins pour lesquels il n'y a pas de raison de croire qu'ils contiennent des matières infectieuses. Les récipients ne doivent cependant pas dépasser une contenance de 5OO ml chacun et le volume total de l'emballage extérieur ne doit pas être supérieur à 4

Étiquettes de risque pour les marchandises dangereuses
Des étiquettes de risque spécifiques doivent être apposées sur la paroi externe de chaque emballage extérieur pour toutes les marchandises dangereuses expédiées par fret aérien. Les étiquettes suivantes sont importantes pour les organismes collectionnant les cultures et les institutions expédiant des produits biologiques.

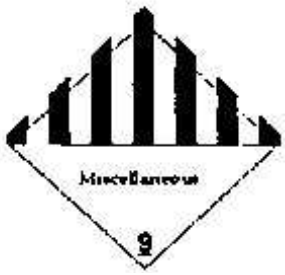
exemple : 

4IF/Classe 6.2/94
GB/2470

Étiquette de risque pour les matières infectieuses et pour les micro-organismes génétiquement modifiés répondant à la définition de l'IATA pour les matières infectieuses : Nom :Infectious Substance
(Matière infectieuse)
Dimensions minimales : 100 x 100 mm
Pour les petits colis : 50 x 50 mm
(noir et blanc)



Étiquette de risque pour les micro-organismes génétiquement modifiés non infectieux et pour le dioxyde de carbone à l'état solide (neige carbonique) :
Nom : Miscellaneous (Divers)
Dimensions minimales : 100 x 100 mm
Pour les petits colis : 50 x 50 mm (noir et blanc)

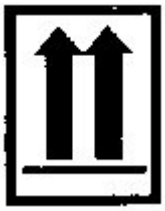


Étiquette de risque pour l'azote liquide



Nom : Non-flammable gas
(Gaz ininflammable)
Dimensions minimales : 100 x 100 min
Pour les petits colis : 50 x 50 mm (vert et blanc)

Les colis renfermant des cultures en milieu liquide d'organismes infectieux ou d'organismes génétiquement modifiés doivent être placés de façon à ce que le(s) système(s) de fermeture du (des) récipient(s) interne(s) soi(en)t tourné(s) vers le haut. La position verticale du colis sera indiquée par 2 étiquettes de "sens du chargement" (flèches noires ou rouges). Celles-ci doivent être apposées sur 2 côtés opposés de l'emballage. Il est également permis de fixer une étiquette "THIS SIDE UP" (Haut) ou "THIS END UP" (Tenir debout) sur la face supérieure du colis



Nom : Sens du chargement Dimensions minimales: 74 x 105 mm
(noir ou rouge et blanc)
Pour les petits colis de matières infectieuses, on peut réduire les dimensions de moitié.

Au cas où les expéditions ne renfermeraient que des produits lyophilisés, la quantité doit être indiquée en g ou en mg et pas en ml. On apposera les étiquettes de "SENS DU CHARGEMENT"' pour éviter tout retard.

Pour l'expédition de matières infectieuses, l'étiquetage de l'emballage extérieur doit comporter les éléments figurant dans la liste suivante.
1. L'étiquette internationale des matières infectieuses.
2. Une plaque-étiquette avec les renseignements suivants :
nom, adresse et numéro de téléphone du destinataire (ou du consignataire)
nom, adresse et numéro de téléphone de l'expéditeur (ou de son agent)
désignation officielle ONU de transport (Matières infectieuses pour l'homme, ou pour les animaux selon le cas), suivie du nom scientifique du produit
numéro ONU (Homme - UN2814, Animaux - UN2900)
température de conservation (éventuellement).
Si l'emballage extérieur est placé dans un suremballage (avec de la neige carbonique par exemple), le suremballage comme l'emballage extérieur doivent porter les informations mentionnées ci-dessus. Le suremballage doit porter une étiquette avec la mention suivante "INNER PACKAGES COMPLY WITH PRESCRIBED SPECIFICATIONS" (L'EMBALLAGE INTÉRIEUR CORRESPOND AUX NORMES REQUISES).
3 - Documents d'expédition obligatoires - ils sont fournis par le transporteur et apposés sur l'emballage extérieur:
la déclaration de l'expéditeur pour les marchandises dangereuses (la figure 4 en donne un exemple)
une liste de colisage ou une facture pro-forma comportant l'adresse du destinataire, le nombre de colis, le contenu détaillé, le poids, la valeur (remarque: déclarer "no commercial value" [sans valeur commerciale] si les articles sont fournis gratuitement)
la lettre de transport aérien, le cas échéant.
4 - L'autorisation d'importation/ d'exportation et/ou la déclaration si nécessaire.

5 - Si l'emballage extérieur renferme des récipients primaires de capacité cumulée dépassant 50 ml, au moins 2 étiquettes de "sens du chargement" (flèches) doivent être apposées sur des côtés opposés du colis afin de montrer sa position correcte.

Conditions requises pour les échantillons de diagnostic
Le système de base du triple emballage est utilisé avec les dispositions et normes d'étiquetage suivantes.
Les échantillons de diagnostic peuvent être transportés dans des emballages répondant aux instructions d'emballage 650. Le marquage spécifique ONU n'est pas requis.
Les récipients primaires peuvent contenir jusqu'à 500 ml chacun, le volume total du colis ne devant pas excéder 4 l.

L'étiquetage de l'emballage extérieur pour l'expédition d'échantillons de diagnostic doit comporter les éléments suivants.
1. Une plaque-étiquette avec les informations suivantes :
nom, adresse et numéro de téléphone du destinataire (ou du consignataire)
nom, adresse et numéro de téléphone de l'expéditeur (ou de son agent)
la déclaration suivante "Diagnostic Specimen Not Restricted, Packed in Compliance with Packing Instruction 650" (Échantillon de diagnostic, non réglementé, emballé conformément aux instructions d'emballage 650).
2. Documents d'expédition obligatoires - ils sont fournis par le transporteur et apposés sur l'emballage extérieur:
une liste de colisage ou une facture pro-forma comportant l'adresse du destinataire, le nombre de colis, le contenu détaillé, le poids, la valeur (remarque: déclarer "no commercial value" [sans valeur commerciale] si les articles sont fournis gratuitement)
la lettre de transport aérien, le cas échéant
3. L'autorisation d'importation et/ou d'exportation et/ou la déclaration si nécessaire.

Remarque : l'étiquette pour les matières infectieuses et la déclaration de l'expéditeur pour les marchandises dangereuses ne sont pas obligatoires pour les échantillons de diagnostic

Conditions requises pour la poste aérienne
Les matières infectieuses et les échantillons de diagnostic peuvent être envoyés en recommandé par la poste aérienne. On utilise alors le système de base du triple emballage avec les mêmes normes que pour les autres moyens de transport.
La mention "LETTRE" doit figurer à côté de l'adresse, de même que l'étiquette verte de déclaration de douane, requise pour les envois internationaux. Les échantillons de diagnostic doivent être identifiables au moyen de l'étiquette violette de l'UPU "PERISHABLE BIOLOGICAL PRODUCTS" (PRODUITS BIOLOGIQUES PÉRISSABLES). Les matières infectieuses doivent être identifiables au moyen de l'étiquette internationale pour les matières infectieuses (voir la figure 3). Elles doivent également s'accompagner du formulaire de déclaration de l'expéditeur pour les marchandises dangereuses (voir figure 4 à la fin du présent document).
A cause des restrictions locales ou internationales, il convient de prendre tout d'abord contact avec le bureau de poste local afin de s'assurer que les matières emballées seront bien acceptées par le service postal.

Réfrigérants
La neige carbonique ou la glace utilisées éventuellement lors d'une expédition doivent être mises à l'extérieur de l'emballage secondaire. Si l'on a recours à de la glace, celle-ci doit se trouver dans un conteneur étanche et l'emballage extérieur doit être étanche également.
A l'intérieur de l'emballage extérieur, l'emballage secondaire doit résister aux dommages qui pourraient éventuellement résulter de la fonte ou de la dissipation du réfrigérant. On ne doit pas mettre de neige carbonique à l'intérieur des récipients primaires ou secondaires à cause des risques d'explosion. Un suremballage (emballage extérieur isolant spécialement conçu à cet effet) peut être utilisé pour garder la neige carbonique. Dans ce cas, il doit permettre au dioxyde de carbone gazeux de s'échapper. Il faut alors observer les instructions d'emballage 904 de l'ONU.
Si l'on utilise de la neige carbonique pour les matières infectieuses, les détails doivent figurer sur la déclaration de l'expéditeur pour les marchandises dangereuses. L'emballage le plus extérieur doit en particulier porter l'étiquette de risque "MISCELLANEOUS" (DIVERS) pour la neige carbonique (voir figure 3).
Si l'on utilise de l'azote liquide comme réfrigérant, il convient de prendre à l'avance des dispositions spéciales avec le transporteur. Les récipients primaires doivent pouvoir résister à des températures extrêmement basses et il faut respecter les conditions d'emballage imposées par le transporteur. En particulier, l'emballage le plus extérieur doit porter l'étiquette "NON-FLAMMABLE GAS" (GAZ ININFLAMMABLE) (voir fig 3).

Transport local de surface
Les transports de spécimens du cabinet d'un médecin à un laboratoire, d'un hôpital à un laboratoire, ou d'un laboratoire à un autre sont des exemples de ce type de transport. Celui-ci peut être assuré par un hôpital, un laboratoire, un service de santé ou tout autre organisme ou bureau agréé.
Les principes de sécurité qui s'appliquent alors sont les mêmes que pour le transport aérien ou international - les matières ne doivent avoir aucune possibilité de s'échapper du colis dans les conditions normales de transport.

On observera les points suivants :
1. Les récipients contenant les spécimens doivent être étanches.
2. Si ces récipients sont des tubes, ils doivent être bouchés et mis sur des supports qui les maintiennent en position verticale.
3. Les récipients contenant les spécimens et les supports doivent être mis dans des boîtes en plastique ou en métal robustes et étanches, munies de couvercles fermant hermétiquement.
4. Le colis doit être calé dans le véhicule de transport.
5. Chaque colis doit être étiqueté conformément à son contenu.
6. Les formulaires de renseignements sur les spécimens et d'identification doivent accompagner chaque colis.
7. Dans chaque véhicule de transport doit se trouver un équipement pour intervenir en cas de déversement accidentel et comprenant : du matériau absorbant, un désinfectant chloré, une poubelle étanche et des gants ménagers réutilisables.

Remarque : Les points 1 à 7 décrits ci-dessus ne se substituent pas aux prescriptions locales ou nationales.

Planification du transport
L'expéditeur a la responsabilité d'assurer pour toutes les matières infectieuses et les échantillons de diagnostic l'exactitude de la désignation, de l'emballage, de l'étiquetage et de la documentation.
Le transport et le transfert efficaces des matières infectieuses exigent une bonne coordination entre l'expéditeur, le transporteur et le destinataire (le laboratoire qui reçoit l'envoi), pour assurer la sécurité des matières transportées et leur arrivée à destination en temps utile et en bon état. Cette coordination dépend de communications bien établies et d'une relation de partenariat entre les 3 parties en présence.
Chacun a des responsabilités spécifiques dans la réalisation du transport.

L'expéditeur
1 . Il conclut au préalable des arrangements avec le destinataire ; il se renseigne notamment pour savoir si un permis d'importation est requis.
2. Il conclut au préalable des arrangements avec le transporteur pour s'assurer que :
l'expédition sera acceptée et le colis transporté de manière appropriée
l'expédition (sans transbordement si possible) se fera par la voie la plus directe, en évitant une arrivée en fin de semaine.
3. Il prépare les documents nécessaires comprenant les autorisations, les documents de transport et d'expédition.
4. Il notifie au destinataire les arrangements pris pour le transport une fois qu'ils ont été conclus, suffisamment en avance par rapport à la date d'arrivée prévue.

Le transporteur
1. Il fournit à l'expéditeur les documents et les instructions d'expédition pour leur mise en œuvre.
2. Il conseille l'expéditeur pour emballer correctement les marchandises.
3. Il aide l'expéditeur à trouver la voie la plus directe qu'il confirme ensuite.
4. Il garde puis archive la documentation relative à l'expédition et au transport.
5. Il surveille que, pendant le transit, les colis expédiés sont bien maintenus dans les conditions requises.
6. Il notifie à l'expéditeur tout retard prévu (ou enregistré) dans le transit.

Le destinataire
1. Il obtient les autorisations nécessaires auprès des autorités nationales pour l'importation des matières.
2. Il fournit à l'expéditeur le(s) permis d'importation obligatoire(s), les autorisations et tous les autres documents requis par les autorités nationales.
3. Il s'organise pour réceptionner les colis efficacement et dans les meilleurs délais.
4. Il accuse immédiatement réception à l'expéditeur.

Les expéditions ne doivent pas partir avant que :
les arrangements aient été conclus à l'avance entre l'expéditeur, le transporteur et le destinataire
le destinataire ait eu la confirmation auprès des autorités nationales que les marchandises pouvaient légalement être importées
le destinataire ait confirmé qu'il n'y aurait aucun retard au moment de la livraison du colis à destination.

On trouvera des informations détaillées sur la conduite à tenir et les mesures de sécurité à prendre d'urgence en cas d'accident de transport dans le *Manuel de sécurité biologique en laboratoire,* deuxième édition (à paraître). Genève : Organisation mondiale de la Santé (pages 56 à 58)

PUBLICATIONS

1

Development of an Immunofiltration-based Antigen Detection Assay for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Infections

Andreas Lucht[1,3], Pierre Formenty[2], Heinz Feldmann[3], Marion Götz[1], Eric Leroy[4], Pierre Bataboukila[5], Allen Grolla[3], Friederike Feldmann[3], Tatiana Wittmann[4], Patricia Campbell[6], Catherine Atsangandoko[7], Paul Boumandoki[8], Ernst-Jürgen Finke[1], Peter Miethe[9], Stephan Becker[10,11], Roland Grunow[1,11]

[1]Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstrasse 11, D-80937 Munich, Germany; [2]Global Outbreak and Alert Response Team (GAR), Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, World Health Organization (CDS/CSR), World Health Organization, WHO-HQ, 20 Avenue Appia, CH-1211 Geneva, Switzerland; [3]Special Pathogens Program, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, and Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3R2, Canada, [4]Service Maladies Emergentes, Centre Internationale Recherches Médicales de Franceville, BP 769, Franceville, Gabon; [5]Service de Bactériologie, Laboratoire National de Santé Publique, B.P. 120, Brazzaville, Republic of Congo; [6]Médecins Sans Frontières, Plantage Middenlan 14, 1018 DD Amsterdam, Holland ; [7]ECOFAC Congo, B.P. 62, Avenue Foch, Brazzaville, Republic of Congo; [8]Ministère de la Santé et des la Population, B.P. 21101 Brazzaville, Republic of Congo; [9]Senova GmbH, Winzerlaer Straße 2,D- 07745 Jena, Germany; [10]Institute of Virology, Philipps-University, Robert-Koch-Straße 17, D-35037 Marburg, Germany; [11]Robert-Koch-Institut, ZBS 2/5, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany

Word count
Abstract: 155 words
Text: 3080 words

Footnote

(1) The authors either do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest

Peter Miethe works for Senova GmbH, Winzerlaer Straße 2,D- 07745 Jena, Germany

(2) Financial support was received from the following sources:

Bundesministerium der Verteidigung [Sonderforschungsauftrag 23Z1-S-439902]

Deutsche Forschungsgemeinschaft [Sonderforschungsbereiche 593 (B3) & 535 (A13]

Canadian Institutes of Health Research [MOP-43921]

Public Health Agency of Canada

(3) All or part of this information has been presented at the following conferences:

Filoviruses: Recent Advances and Future Challenges Symposium (September 2006).

(4) Correspondence and requests for reprints should be addressed to:

Name: Andreas Lucht, Pivitsteich 15,D-32791 Lage, Germany

Tel.: +495232/61647

Fax: +495221/126-163

E-mail: andreaslu@gmx.de

(5) The current affiliations and addresses of the authors have NOT changed since the completion of the study

Abstract

Ebola virus (EBOV) causes severe viral hemorrhagic fever (EHF) in regions of Central Africa where medical facilities are ill equipped and diagnostic capabilities are limited. To obtain a reliable test that can be easily implemented under these conditions, monoclonal antibodies to the EBOV matrix protein (VP40), which had previously been found to work in a conventional ELISA, were used to develop an immunofiltration assay for the detection of EBOV antigen in chemically inactivated clinical specimens. The assay was evaluated using defined virus stocks and specimens from experimentally infected animals. Its field application was tested during an EHF outbreak in 2003. Although the original goal was to develop an assay that would detect all EBOV species, in practice only the Zaire and Sudan species were detected. The assay represents a first generation rapid field test for the detection of EBOV antigen that can be performed in 30 minutes without electrical power or expensive or sensitive equipment.

Keywords: *Ebola virus, viral haemorrhagic fever, monoclonal antibodies, antigen detection, immunofiltration assay*

INTRODUCTION

Four different species of the genus *Ebolavirus* (EBOV),family *Filoviridae*, have been identified: *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), *Sudan ebolavirus* (SEBOV), *Cote d'Ivoire ebolavirus* (CIEBOV), and *Reston ebolavirus* (REBOV) [1]. SEBOV and ZEBOV strains cause a severe form of viral hemorrhagic fever (VHF) with case fatality rates ranging from 53-90%. In contrast, CIEBOV has only been implicated in a single clinical case of Ebola hemorrhagic fever (EHF) and REBOV seems of low virulence for humans [2,3].

At present, acute filovirus diagnostics are mainly based on RT-PCR technology and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), which can be supplemented by antibody detection assays [summarized in 3, 4, 5]. These assays are established in national and international reference laboratories equipped with the necessary biocontainment. However, rapid and less sophisticated methods are urgently needed for diagnostics in the field under rural or technically demanding conditions. In addition, cultural beliefs make the collection of blood difficult in many communities. Therefore, diagnostic tests that utilize more culturally acceptable clinical specimen such as urine are highly desirable.

The goal of this study was the development of a rapid, safe and reliable antigen-detecting assay for blood and urine. The assay was based on the immunofiltration technology using previously characterized EBOV-specific monoclonal antibodies (mAbs) directed against the matrix protein VP40 of all known EBOV species and had previously been found to work in a conventional ELISA [6]. In this newly developed assay one monoclonal antibody is bound to the column matrix to immobilize EBOV VP40; the second monoclonal antibody is biotin-labeled and used for detection of the bound viral antigen. VP40 is one of the most abundant proteins in viral particles [7] and, therefore an appropriate target for antigen detecting assays.

MATERIAL AND METHODS

Viral antigens: ZEBOV, strain Mayinga; SEBOV, strain Boniface; CIEBOV, strain Cote d'Ivoire; REBOV, strain Reston; and MARV, strains Musoke and Angola were grown in Vero E6 cells under biosafety level 4 (BSL4) conditions [8]. The titer of most virus stock was determined by TCID50 (infectious dose causing cytopathogenic effect (CPE) in 50% of

infected cultures) to be 4 x 107 TCID50/ml for ZEBOV, 1 x 105 TCID50/ml for SEBOV, 1 x 106 TCID50/ml for REBOV, and 5 x 106 TCID50/ml for MARV, strains Musoke and Angola). We were unable to determine a titer for CIEBOV as this stock did not produce visible CPE and a focus forming unit assay has not been developed. However, based on a RT-PCR assay using EBOV generic primers the titer was estimated to be approximately one log10 lower than REBOV (approx. 1 x 105 TCID50/ml). Viral stocks were inactivated either by boiling for 10 min in 1% sodium dodecylsulfate (SDS) or gamma-irradiation (10 Mrad) and were used to spike human serum and urine samples. In addition, antigen was prepared from infected animals. Balb/c mice (female, 5 weeks of age) were infected intraperitoneally with 1.5 x 103 plaque forming units (pfu) of the mouse-adapted strain of ZEBOV [9] in BSL4; Mock-infected BALB/c mice served as control animals. EDTA blood was collected from anaesthetized animals prior to euthanasia on days 2, 4 and 5 post infection by heart puncture and virus was inactivated by gamma-irradiation (10 Mrads). All animal experiments were performed in Winnipeg under an approved 'Animal Use Document' and following the guidelines of the 'Canadian Council on Animal Care'.

Monoclonal antibodies: Murine hybridoma cell lines producing mAbs directed to ZEBOV antigen had previously been used in an ELISA format [6]. Based on previous characterization, the mAbs 5F6 and 2C4 were selected for large scale production in the Tecnomouse system (Integra Biosciences, Lowell, MA, USA) using protein-free medium supplemented with high glucose (4.5 g/l), high glutamine (4 mM) and 150 mg/l gentamycin (all Life Technologies, Pairley, Scotland). The purification of the mAbs by protein G was performed using the mAb Trap GII Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany). Subsequently, the mAb 5F6 was labeled with biotin using a Biotin Labelling Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

Clinical specimens: Clinical specimens were collected during an EHF outbreak in Mbomo and Mbandza/RC, in December 2003 [10]. Samples were taken from two EHF cases (death at days 7 and 8 after onset of symptoms), which were confirmed by RT-PCR and antigen capture ELISA, thirteen suspected cases (days 6 to 20 after onset of symptoms), and five asymptomatic contacts (table 1). In total, the specimens collection included 20 sera, 14 urine, five saliva, two sweat and a one tear sample. In addition, 99 serum and 104 urine samples from healthy German donors and 88 serum samples from African donors (kindly provided by

Herbert Schmitz, Bernhard-Nocht-Institut Hamburg, Germany) were used as negative controls. Specimens were inactivated for serological testing by adding SDS to a final concentration of 1% and for RT-PCR analysis as described below (see RNA isolation).

Immunofiltration assay: A detailed description of the assay and the test performance is provided as Supplemental Online Material. Briefly, the column matrix was coated with 750 µl mAb 2C4 (20 µg/ml in carbonate buffer - 0,1 M Na2CO3/NaHCO3, pH 9.0). Serum specimens were incubated for 30 min with 1% SDS and diluted 1:4 (v/v) in sample dilution buffer (0.01 M PBS/5% BSA/0.05% Tween 20). Urine specimens were mixed 9:1 (v/v) with 10 x urine buffer (0.1 M PBS/50% BSA/0.5% Tween 20) and cleared through a 1.2 ⌈m syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). The diluted specimens were applied to the column matrix. The matrix was washed with 750 µl of wash buffer (0.01 M PBS/0.1% BSA/0.05% Tween 20/0.1% BND), incubated with 500 µl of biotin-labeled second mAb 5F6 (10 µg/ml, diluted in 100 mM potassium phosphate buffer/1.5% casein/0.05% Tween 20/0.1% BND) followed by 500 µl of streptavidin-HRP40 (Senova, Jena, Germany, 2 µg/ml, diluted in 100 mM potassium phosphate buffer/1,5% casein/0.05% Tween 20). The column was washed three times (2 x wash buffer and 1 x substrate buffer - 100 mM NaCl/0.03% BND) and HRP detection was initiated by adding 500 µl of TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine membrane peroxidase substrate; KPL, Gaithersburg, Maryland, USA). The entire assay was performed in approximately 30 minutes with all reagents supplied ready-to-use.

Confirmatory assays – IgG ELISA, antigen detection ELISA and RT-PCR: All clinical specimens collected in Mbomo and Mbandza, RC, were shipped to Franceville/Gabon where they were tested for EBOV-specific antigen and antibodies using established assays based on ELISA format [11, 12, 13]. For RT-PCR, RNA from both cell-cultured derived material and clinical specimens (140 µl) was isolated using the Viral RNA minikit from Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. Specimens/samples were analyzed using generic filovirus RT-PCRs targeted to the nucleoprotein (NP) and polymerase (L) genes using the SYBR Green I amplification kit (Roche, Laval, PQ) as described previously [5].

RESULTS

Assay sensitivity. The general assay cut-off was set to an OD510 of 0.4, calculated by the mean of 99 negative human serum samples (m = OD 0.134) plus three standard deviations (s = OD 0,094).

The sensitivity of the immunofiltration assay was determined using ZEBOV, strain Mayinga, antigen serially diluted in human serum or urine in the absence or presence of 1% SDS. The detection limit of the assay in the absence of SDS was 1 x 105 and 2 x 105 TCID50/ml for urine and serum, respectively. In the presence of 1% SDS and 5% BSA (sample dilution buffer), the assay showed greater sensitivity with a detection limit determined to be 1.25 x 104 TCID50/ml for both specimen sources (figure 1A). The sensitivity of the assay was further evaluated by comparing our ZEBOV, strain Mayinga, antigen (stock 4 x 107 TCID50/ml) with a positive control antigen from an antigen detection ELISA (kindly provided by TG Ksiazek and PE Rollin, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA). Both specimens were run in parallel in the presence of 1% SDS and 5% BSA, the serial dilution was 1:2 in the immunofiltration assay (figure 1B). Both antigens were equally well detected in this assay and the detection limit was approximately 1.5 x 104 TCID50/ml.

The sensitivity of an assay could become more important for clinical specimens where antigen might be diluted due to the larger volume. Accordingly, the immunofiltration system was evaluated for the detection of ZEBOV and MARV antigen in 10 ml urine samples. Prior to use, urine samples were filtered to avoid clogging of the column by urine sediment. Only ZEBOV was detected in the urine samples, no signal was obtained from samples containing MARV. The use of larger sample volumes significantly increased the OD values (ZEBOV antigen) without

leading to higher background (MARV antigen) (figure 2). Thus, the use of larger urine volumes can maximize the sensitivity of the assay.

Assay specificity. In order to determine the specificity of the assay, negative human control serum (99 from German and 80 from African donors) and urine samples (104 samples from German donors) were spiked with 1 x 105 TCID50/ml ZEBOV and compared to identical nonspiked samples. The mean value and standard deviation was calculated for each group. The viral antigen was well detected in the spiked sera and urines. Statistical analysis was

performed using student's t-test. Significantly higher OD values were found in the spiked samples compared with the corresponding non-spiked samples ($p<0.01$). No significant differences were detected between non-spiked German and African serum samples, whereas the slightly higher ODs for the spiked African sera might be explained by hemolysis after repeated freezing and thawing of these samples leading to a reduced flow velocity and therefore longer incubation time on the column (figure 3A).

Subsequently, the immunofiltration assay was tested for its cross-reactivity to antigen derived from different EBOV species as well as from MARV. The monoclonal antibodies 5F6 and 2C4 had previously been shown to cross-react in immunoblot assays with strains of all four known EBOV species but not MARV [6]. Thus, different levels of cross-reactivity were expected with the different EBOV species but not MARV antigens. Viral antigen preparations were treated with 1% SDS and 5% BSA and were run either undiluted or diluted in sample buffer. The detection limits for SEBOV, REBOV, and ICEBOV antigens were <1 x 105 TCID50/ml, 1 x 106 TCID50/ml and >1 x 105 TCID50/ml, respectively (Fig. 3B) and, thus, between 0.5-2 log10 higher than compared with ZEBOV antigen (figures 1 and 3B). Even though the mAbs were able to recognize VP40 of REBOV and CIEBOV, the assay effectively failed to detect these viruses. All MARV antigens (strain Musoke shown in figure 3B and strain Angola not shown) remained negative even when applied undiluted indicating no cross-reactivity with antigens from a different genus of the family *Filoviridae*.

Assay application. In order to evaluate the usefulness of the immunofiltration assay on clinical specimens, we first tested serum samples from experimentally infected mice. The blood specimens were inactivated by gamma-irradiation and run in the immunofiltration assay at starting dilutions of 1:100. ZEBOV antigen was barely detectable on day 2 post infection with increasing levels of viremia on the following days. The day 4 specimen remained antigenpositive up to a dilution of 10-5 indicating viremia levels of approximately 109 TCID50/ml (data not shown).

The assay was first tested on human specimens during an outbreak of EHF in Central Africa in 2003 [10]. A limited number of human specimens (serum, urine, saliva, sweat, tears) were collected from probable (subsequently confirmed by RT-PCR and antigen detection ELISA) and suspected EHF cases and contacts in families and the community. The immunofiltration

assay detected EBOV antigen in blood samples taken by heart puncture from two deceased probable cases (table 1; figure 4). All clinical samples including serum, urine, saliva, sweat and tear specimens from suspected cases and contacts were EBOV antigen negative even at dilution as low as 1:4. To further confirm the results of the immunofiltration assay, all clinical specimens were also tested by RT-PCR in the field or by antigen and antibody detection ELISAs performed at the Centre Internationale Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) in Franceville (table1). Confirmatory testing fully supported the laboratory results obtained by the immunofiltration assay (table 1). Subsequent sequence determination of the amplicon of the only PCR-positive sample (table 1, No 2; figure 4) identified the causative agent as a strain of ZEBOV. Epidemiological follow-up investigations of the lab tested suspect EHF cases or contacts did not reveal any EHF symptoms or unexplained deaths, further supporting the laboratory test results (table 1).

DISCUSSION

The development of this new immunoflitration assay for the detection of EBOV antigen will provide future field response to EHF with a novel and long awaited tool. Despite being less sensitive than RT-PCR, the immunofiltration assay demonstrated a similar sensitivity than the widely used antigen detection ELISA [11, 12] but is rapid and far less prone to technical complications. The detection of ZEBOV antigen in specimens derived from animals and humans demonstrates its usefulness in human field diagnosis as well the detection of EBOV in animal species such as the great apes.

The assay was based on a technique, which has previously been evaluated for the detection of antibodies [14] and serum proteins [15]. Here we demonstrated for the first time the applicability of the immunofiltration system to detect viral antigen. The assay is specific for ZEBOV antigen but also detected SEBOV antigen with slightly lower sensitivity. Only weak or no crossreactivity was observed with REBOV and CIEBOV antigens (Fig. 3B). In this regard, it is important to note that with the exception of a single CIEBOV case [16], all human EHF cases have been caused by ZEBOV and SEBOV making these two EBOV species most important for public health response.

During the symptomatic stage of EHF viremia levels reach far beyond 106 pfu/ml with peak levels of up to 108 or 109 pfu/ml [17]. Thus, it seems very reasonable that the

immunofiltration assay developed here, with detection limits of 1.25 x 104 TCID50/ml for ZEBOV and < 1 x 105 TCID50/ml for SEBOV (TCID50 and pfu numbers may differ approximately 2-10 fold; authors unpublished data), will be sufficiently sensitive to diagnose a symptomatic ZEBOV or SEBOVinfected patient. This conclusion is supported by the successful use of the assay to diagnose patients during the EHF outbreak in RC in 2003 [18] as well as the detection of ZEBOV antigen in experimentally infected animals starting on day 2 post infection (this study). The usefulness of this assay to detect REBOV and CIEBOV in clinical specimens is questionable, but the high viremia levels, which could be expected during infection, may overcome the lower sensitivity for REBOV and CIEBOV and result in a detectable reaction.

Biosafety is an important consideration in the diagnosis of VHFs such as EHF, particularly in the field. Therefore, diagnostics should preferentially be performed on inactivated specimens. The immunofiltration assay described here did not only perform well with SDS-treated and thus inactivated serum and urine samples, but was superior over the use of native clinical specimens. This is clearly an advantage over currently used antigen detection assays based on ELISA format. However, it should be remembered that BSA needs to be added to SDS-treated clinical specimens with low endogenous protein concentrations such as urine, saliva and swabs. Under such low protein concentrations SDS might otherwise denature the monoclonal antibodies.

During past EHF outbreaks in Gabon and RC [19, 20], the population has become increasingly reluctant to blood sampling for reasons such as cultural beliefs, witchcraft, and fear of infection through invasive manipulations such as bleeding. For example, cooperation with the international teams ceased completely when the teams were accused of being the source of the infection. In 2002, a similar belief and behaviour in the population forced a WHO team to leave the region of an outbreak investigation [21]. In addition, nosocomial infections, mainly via re-use of contaminated needles and syringes, are a well documented and well known infection route during EHF outbreaks, leading to objection in the population to invasive procedures such as venipuncture and vaccination [22]. Currently, aid agencies and response personnel are looking into alternative clinical specimens for laboratory diagnosis, which are non-invasive procedures and, thus, are more safely to obtain [23]. In the past, EBOV had been detected in vaginal, rectal and conjunctival swabs, as well as in seminal fluid

[24]. Likely more acceptable by the population are urine samples, however the use of urine samples in human EBOV diagnostics is not established. It was shown that urine of primates experimentally infected with EBOV contained virus concentrations of up to 103-105 pfu/ml [25]. Additionally, epidemiological studies suggest that contact with urine might play a role in human-to-human transmission [26]. Using the immunofiltration assay we were able to detect ZEBOV antigen in spiked human urine samples with a sensitivity of approximately 1.25 x 104pfu/ml. Since the column format allows for the application of larger volumes (up to 10 ml), the sensitivity of the assay may well be sufficiently high even if concentrations in urine are in general lower than in serum.

Finally, the experience with the immunofiltration assay during the EHF outbreak in RC in 2003 demonstrated its field applicability in an extremely remote, infrastructure-poor geographical region. Using this assay we were able to correctly diagnose two EHF cases and exclude suspected cases and contacts, confirmed by the current gold standard assays for acute diagnosis of EBOV; RT-PCR and antigen detection ELISA. Thus, in this outbreak the field diagnostics played an important role in case patient management and contact tracing. The rapid provision of results to the community may actually lessen cultural fears for invasive procedures such as venipuncture as may have been the case in the EHF outbreak in Mbomo where venipuncture was much more accepted [27]. A more extensive evaluation of this assay under field conditions using larger specimen numbers is still missing, but the current results are quite promising.

In conclusion, a rapid fieldable immunoflitration assay for the detection of EBOV antigen was developed. The assay allowed for simple inactivation of specimens by SDS and accurate results were provided in 30 minutes without the need for electrical power or technically demanding equipment. Due to its simplicity, local staff was readily trained to perform this assay. With the possibility of future treatment options for EHF patients [28, 29, 30, 31, 32, 33], early and followup on-site diagnosis becomes even more important. This test format may fill a gap in future EHF outbreak management and might be adaptable for MARV infections detection as well as infections caused by other related pathogens. In addition, the assay has potential for application on wildlife species, in particular the great apes, which is affected by EBOV infections in Central Africa (16, 34).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ella Zeman (Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany) and Daryl Dick and Michael Garbutt (National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Canada) for excellent technical assistance. We are very thankful to all those colleagues who supported our work in Mbomo, especially Phillippe Yaba, Sebastiao Nkunku, André Salemo, Alain Epelboin, Derek Hardy, Kamel Ait-Ikhlef, and Gerard Eon.

REFERENCES

1. Feldmann H, Geisbert TW, Jahrling PB, Klenk HD, Netesov SV, Peters CJ, Sanchez A, Swanepoel R, Volchkov VE. Filoviridae. In: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV (Fauquet, CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds). Elsevier/Academic Press, London, **2005**; 645-653.

2. Feldmann H, Jones S, Klenk HD, Schnittler HJ. Ebola virus: from discovery to vaccine. Nat Rev Immunol **2003**; 3 (8): 677-685.

3. Sanchez A, Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Fifth ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**. 1409-1448.

4. Grolla A., Lucht A, Dick D, Strong JE, Feldmann H. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. Bull Soc Pathol Exot **2005**; 98:205-209.

5. Strong JE, Grolla A, Jahrling PB; Feldmann H. Filoviruses and Arenaviruses. In: Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology (Detrick B, Hamilton RG, Folds JD, eds.). ASM Press **2006**. 774-790.

6. Lucht A, Grunow R, Möller P, Feldmann H, Becker S. Development, characterization and use of monoclonal antibodies for the detection of Ebola virus. J. Virol Meth **2003**; 111:21-28.

7. Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. Virology **1985**; 147:169-176.

8. Becker S, Feldmann H, Will C, Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodie in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? Med Microbiol Immunol **1992**; 181:43-55.

9. Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola haemorrhagic fever. J. Infect Dis **1998**; 78:651-661

10. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever, Republic of Congo. Weekl Epidem Rec **2003**; 78:405.

11. Ksiazek TG, Rollin PE, Jahrling PB, Johnson E, Dalgard DW, Peters CJ. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. J Clin Microbiol **1992**; 30:947-950.

12. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML, Swanepoel R, Burt FJ, Leman PA, KhanAS, Rowe AK, Mukunu R, Sanchez A, Peters CJ. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis **1999**; 79 Suppl 1:177-187.

13. Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling JB, Peters CJ. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. J Infect Dis **1999**; 179 Suppl 1: 192-198.

14. Schell D. Fast quantification of mouse IgG from cell culture supernatants. Animal Cell Technology **1994**; 94:366-368.

15. Hartmann H, Lübbers B, Cararetto M, Bautsch W, Klos A, Köhl J. Rapid quantification of C3a and C5a using a combination of chromatographic and immunoassay procedures. J Immunol Meth **1993**; 166:35-44.

16. LeGuenno B, Formenty P, Wyers M, Gounon P, Walker F, Boesch C. Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus. Lancet **1995**; 345:1271-1274.

17. Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, Lee WF, Spiropoulou CF, KsiazekTG, Lukwiya F, Kaducu F, Downing R, Nichol ST. Rapid diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by reverse transcription – PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. J Virol **2004**; 78 (8): 4330-4341.

18. Boumandouki P, Formenty P, Epelboin A, Campbell P, Atsangandoko C, Allangarar Y, Leroy EM, Kone MI, Molamou A, Dinga-Longa O, Salemo A, Kounkou RY, Mombouli V, Ibara JR, Gaturuku P, Nkunku S, Lucht A, Feldmann H. Clinical management of patients and deceased during the Ebola outbreak from October to December 2003 in Republic of Congo. Bull Soc Pathol Exot **2005**; 98:218-223.

19. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever, Congo – update. Weekl Epidem Rec **2003**; 78:49.

20. World Health Organization. Ebola, Gabon (update). Ebola, Congo (update). Weekl Epidem Rec **2002**; **77**:97.

21. World Health Organization. Ebola, Gabon and Congo (update). Weekl Epidem Rec **2002**; **77**:9.

22. Peters CJ, LeDuc JW. An introduction to Ebola: The virus and the disease. J Infect Dis **1999**; 178:ix-xvi.

23. Formenty P, Leroy EM, Epelboin A, Libama F, Lenzi M, Sudeck H, Yaba P, Allarangar Y, Boumandouki P, Nkounkou VB, Drosten C, Grolla A, Feldmann H, Roth C. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus Hemorrhagic Fever in the Republic of Congo. Clin Infect Dis **2006**; 42**:**1521-26.

24. Rodriguez, LL, De Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A, Bressler D, Williams AJ, Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis **1999**; 179 Suppl 1:S170-S176

25. Fisher-Hoch SP, Platt GS, Neild GH, Southee T, Baskerville A, Raymond RT, Lloyd G, Simpson DIH. Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). J Infect Dis **1985**; 152:887-894.

26. Dowell S, Mukunu FR, Ksiazek TG, Khan AS, Rollin PE, Peters CJ. Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis **1999**; 179 Suppl 1:S87-S91.

27. Hewlett BS, Epelboin A, Hewlett BL, Formenty P. Medical anthropology and Ebola in Congo: cultural models and humanistic care. Bull Soc Pathol Exot **2005**; 98:230-236.

28. Stroeher U, Feldmann H. Progress towards the treatment of Ebola haemorrhagic fever. Expert Opin Investig Drugs. **2006**; 15(12):1523-1535.

29. Feldmann H, Jones SM, Schnittler HJ, Geisbert T. Therapy and prophylaxis of Ebola virus infections. Curr Opin Investig Drugs **2005**; 6(8):823-30.

30. Enterlein S, Warfield KL, Swenson DL, Stein DA, Smith JL, Gamble CS, Kroeker AD, Iversen PL, Bavari S, Mühlberger E. VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. Antimicrob Agents Chemother **2006**; 50 (3):984-993.

31. Geisbert TW, Hensley LE, Jahrling PB, Larsen T, Geisbert JB, Paragas J, Young HA, Fredeking TM, Rote WE, Vlasuk GP. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. Lancet **2003**; 362:1953-58.

32. Paragas J, Geisbert TW. Development of treatment strategies to combat Ebola and Marburg viruses. Expert Rev Anti Infect Ther **2006**; 4 (1):67-76.

33. Bray M, Paragas J. Experimental therapy of filovirus infections. Antiviral Res **2002**; 54(1):1-17.

34. Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquiere S, Kilbourne A, Froment JM, Bermejo M, Smit S, Karesh W, Swanepoel R, Zaki SR, Rollin PE. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. Science **2004**; 303:387-390.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Sensitivity testing. (A) Influence of inactivation. The figure shows a line plot of titration of gamma-inactivated ZEBOV, strain Mayinga, antigen diluted in serum or urine with and without the addition of 1% SDS. Key, (○) = ZEBOV in serum; (●) = ZEBOV in serum with 1% SDS; (Δ) = ZEBOV in urine; (▲) = ZEBOV in urine with 1% SDS and 5% BSA. **(B) Comparison with standard positive control from an antigen detection ELISA.** The figure shows a line plot of a comparative titration in the immunofiltration assay between gammainactivated ZEBOV, strain Mayinga, antigen and a defined positive control antigen from a widely used antigen detection ELISA (provided by T.G. Ksiazek and P.E. Rollin, CDC, Atlanta). Both antigens were treated with 1% SDS and 5% BSA prior their dilution. *Key*: OD510 = optical density at a wavelength of 510 nm; TCID50 = tissue culture infectious dose 50; dotted line = cut-off of the assay as determined by the mean of the OD of 99 negative control sera plus three standard deviations.

Figure 2: Sensitivity testing using larger volumes of urine samples. Dilutions of ZEBOV (strain Mayinga) and MARV (strain Musoke) antigens (previously treated with 1% SDS and 5% BSA) in different volumes of urine were loaded on the column for antigen detection. Note, increasing volume of urine spiked with MARV antigen did not result in false-positives. *Key*: ZEBOV = *Zaire ebolavirus*, strain Mayinga; MARV = *Lake Victoria marburgvirus*, strain Musoke; OD510 = optical density at a wavelength of 510 nm; TCID50 = tissue culture infectious dose 50; dotted line = cut-off of the assay as determined by the mean of the OD of 99 negative control sera plus three standard deviations.

Figure 3: Specificity testing. (A) Comparison of spiked and non-spiked serum and urine samples. In order to test the specificity of the immunofiltration assay, negative control sera from 99 German and 80 African donors as well as urine samples from 104 German donors were spiked with ZEBOV (approx. 1 x 105 TCID50/ml) and compared to the corresponding non-spiked samples. The mean values (minus and plus one standard deviation) are shown for each group of non-spiked and spiked samples. Statistical analysis revealed significantly higher values for the spiked serum and urine samples in comparison with the non-spiked samples. Regarding the sample matrix, significant differences were detected between serum

and urine with lower values for unspiked and higher positive values for spiked urine samples in comparison with serum. **(B) Cross-reactivity with other Ebola and Marburg antigens.** Different EBOV and MARV antigen preparations (5 x 104 – 2 x 106 TCID50/ml) were applied to the column in the presence of 1% SDS. *Key*: white bars = high antigen concentrations; black bars = diluted (1:2 in sample buffer) antigen concentrations; numbers above the bars = TCID50/ml (tisue culture infectious dose 50); OD510 = optical density at a wavelength of 510 nm; ZEBOV = *Zaire ebolavirus*, strain Mayinga; SEBOV = *Sudan ebolavirus*, strain Boniface; REBOV = *Reston ebolavirus*, strain Reston; CIEBOV = *Cote d'Ivoire ebolavirus*, strain Cote d'Ivoire; MARV = *Lake Victoria marburgvirus*, strain Musoke.

Figure 4: Immunofiltration assay. (A) Field set up. This figure shows the photometer and a rack with immunofiltration columns as it was run in the field. **(B) Results of a field test.** A representative test result from Mbomo, Republic of the Congo is shown. *Key*: N = negative control serum; P = *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), strain Mayinga, positive control; 1 to 9 = different patient sera. Patient sera 1 and 6 were ZEBOV antigen-positive (see also table 1, patients 1 and 2); all other sera were ZEBOV antigen-negative. The visual results were confirmed by photometric determination.

Table 1: Laboratory results from the outbreak investigation in Mbomo, RC, 2003

No.	Sex	Age	Case classification	Day post-onset	Immunofiltration assay OD / interpretation	RT-PCR[a]	Antigen detection ELISA[b]	Antibody detection ELISA[b]	Result
1	F	5	probable case	7	2.158 / positive	not tested	positive	negative	confirmed case
2	M	22	probable case	8	1.671 / positive	positive	positive	negative	confirmed case
3	M	19	suspected case	6	0.223 / negative	negative	negative	negative	non-case
4	M	1	suspected case	8	0.260 / negative	negative	negative	negative	non-case
5	M	6	suspected case	10	0.218 / negative	negative	negative	positive	convalescent
6	M	31	suspected case	10	0.150 / negative	negative	negative	positive	convalescent
7	M	26	suspected case	14	0.078 / negative	negative	negative	negative	non-case
8	F	23	suspected case	15	0.141 / negative	negative	negative	negative	non-case
9	F	18	suspected case	15	0.259 / negative	negative	negative	positive	convalescent
10	F	22	suspected case	16	0.065 / negative	negative	negative	positive	convalescent
11	F	20	suspected case	16	0.108 / negative	negative	negative	negative	non-case
12	F	40	suspected case	18	0.190 / negative	negative	negative	negative	non-case
13	F	14	suspected case	18	0.128 / negative	negative	negative	negative	non-case
14	F	22	suspected case	20	0.299 / negative	negative	negative	positive	convalescent
15	F	38	suspected case	20	0.084 / negative	negative	negative	negative	non-case
16	M	?	contact person	-	0.145 / negative	negative	negative	negative	non-case
17	F	?	contact person	-	0.241 / negative	negative	negative	negative	non-case
18	M	43	contact person	-	0.127 / negative	negative	negative	negative	non-case
19	F	?	contact person	-	0.073 / negative	negative	negative	negative	non-case
20	M	?	contact person	-	0.094 / negative	negative	not tested	not tested	non-case

F = female; M = male; a RT-PCR was performed in the field by the authors; b antigen and antibody detection ELISAs were performed at the Centre Internationale Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) in Franceville.

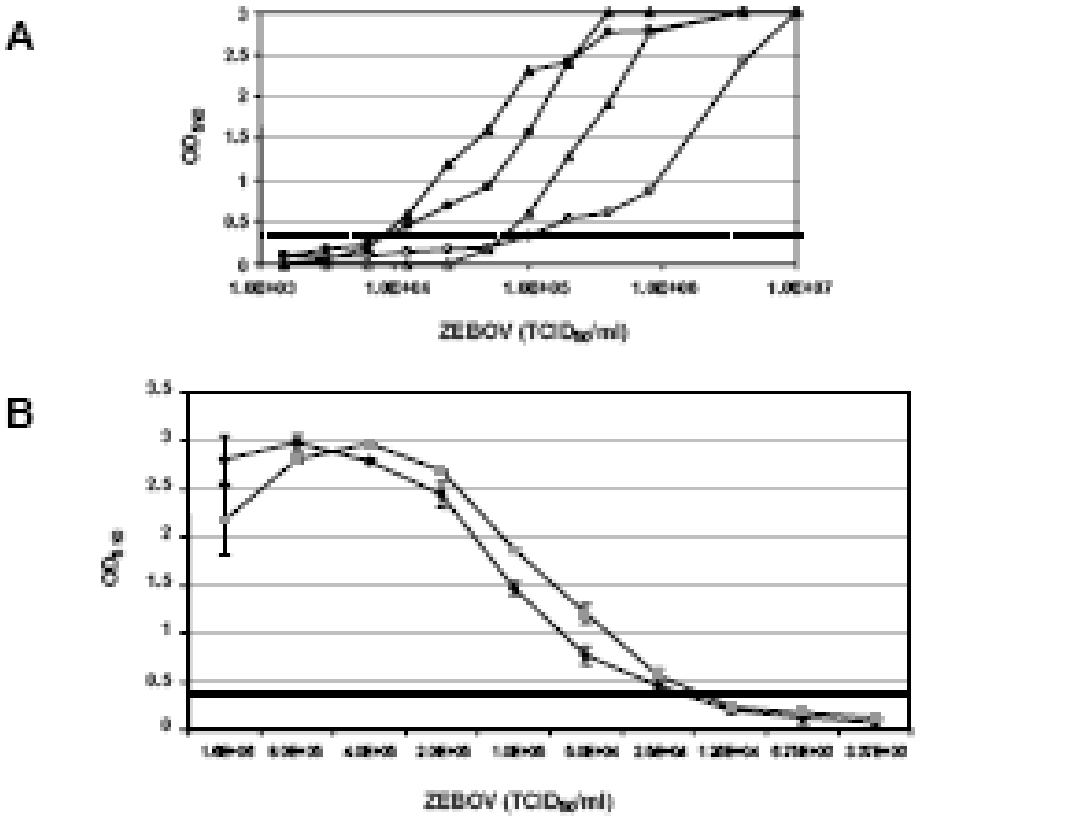


Figure 1

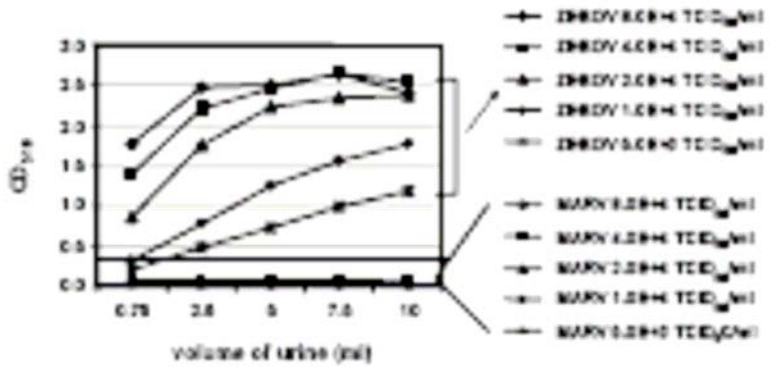


Figure 2

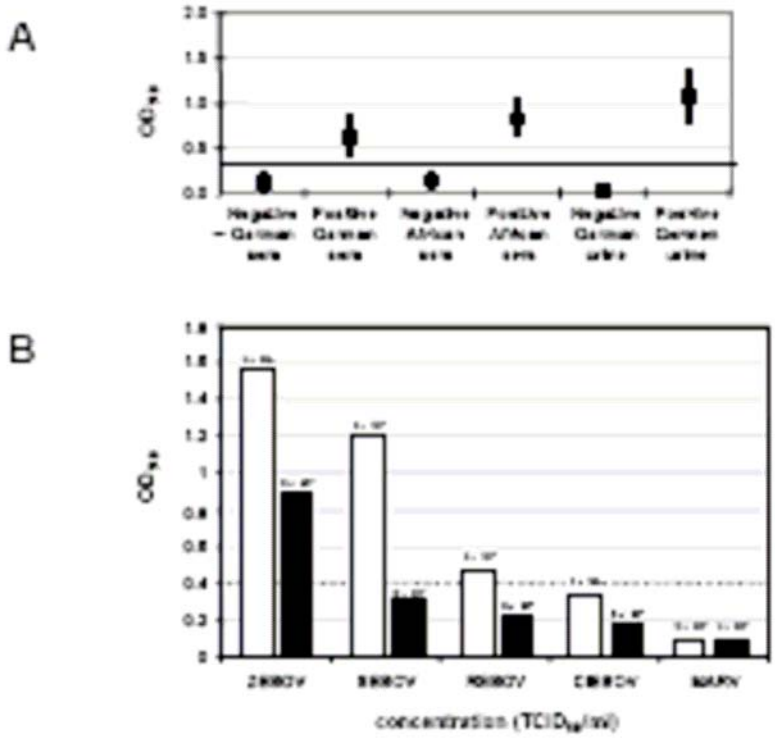


Figure 3

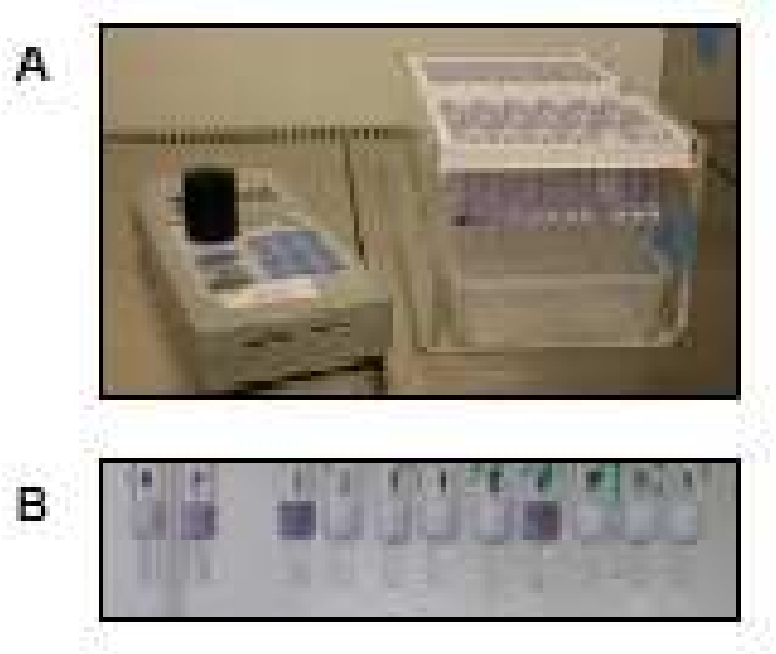


Figure 4

Supplemental Online Material

Immunofiltration assay: *Principle*: The mAbs 2C4 and 5F6 were used to develop an immunofiltration assay based on the ABICAP technology (Antibody Immuno Column for Analytical Processes, Senova GmbH, Jena, Germany). The columns (5.5 cm in height with a porous matrix of 40 cm2) operate as a flow-through ELISA being driven by gravity at a velocity of 350 µl/min. The enzymatic detection is based on precipitation of tetramethylbenzidine (TMB), which results in a blue staining of the filter elements. The quantification is done using a batteryoperated, handheld photometer designed for read-out of dyes on ABICAP columns in transmission mode and displayed in optical density units OD = log Io/I (Io = light intensity of non-stained reference column (or column before substrate addition), I = light intensity after staining). *Column preparation*: The polyethylene filter elements in the columns, were treated with successive washes of 750 µl 96% ethanol, 750 µl 50% ethanol and 750 µl carbonate buffer (0,1 M Na2CO3/NaHCO3, pH 9.0). The elements were then coated with 750 µl mAb 2C4 in carbonate buffer (20 µg/ml) and the remaining binding sites were blocked by 750 µl of 0.01 M PBS/1.5% BSA. Finally, the outlets of the columns were blocked by stoppers and 750 µl of storage buffer [0.01 M PBS/1.5% BSA, 0.05% BND (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane; Senova, Jena, Germany] was added to the matrix prior to covering the top of the column with a plastic lid. The columns were stored for up to 9 months at 4°C. Alternatively, the coated columns were dried allowing storage for up to one year at room temperature or 3 months at tropical temperatures (35°C). *Sample preparation:* Clinical specimens (serum and urine) were incubated for 30 min with 1% SDS to denature and inactivate virus particles. Specimens were then diluted 1:4 (v/v) in sample dilution buffer (0.01 M PBS/5% BSA/0.05% Tween 20). Alternatively, to avoid the dilution step for urine, prior to use, urine specimens and 10 x urine buffer (0.1 M PBS/50% BSA/0.5% Tween 20) were mixed 9:1 (v/v). Before urine was applied to the column, the specimens were filtered through a 1.2 ⌈m syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). *Assay performance*: The diluted specimens were applied to the column matrix and washed with 750 µl of wash buffer (0.01 M PBS/0.1% BSA/0.05% Tween 20/0.1% BND). Subsequently, 500 µl of biotin labeled antibody 5F6 (10 µg/ml, diluted in 100 mM potassium phosphate buffer/1.5% casein/0.05% Tween 20/0.1% BND, pH 4.9) was loaded followed by 500 µl of streptavidin-HRP40 (Senova, Jena, Germany, 2 µg/ml, diluted in 100 mM potassium phosphate buffer/1,5% casein/0.05% Tween 20). The column was washed twice with 750 µl of wash buffer and one time with substrate buffer (100 mM NaCl/0.03% BND). HRP detection was initiated with the

addition of 500 µl of TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine membrane peroxidase substrate; KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) and the reaction was stopped with 750 µl substrate buffer. The optical density (OD) of the precipitated TMB, which is proportional to the VP40 concentration of the sample, was measured at 510 nm. The cut-off was determined to be the mean of 99 negative control sera plus three standard deviations and also used for urine samples. The entire assay was performed in approximately 30 minutes with all reagents supplied ready-to-use.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Microbes and Infection 7 (2005) 1005-1014
Microbes and Infection
www.elsevier.com/locate/micinf

Review

The natural history of Ebola virus in Africa

Xavier Pourrut [a,b], Brice Kumulungui [a], Tatiana Wittmann [a], Ghislain Moussavou [a], André Délicat [a], Philippe Yaba [a], Dieudonné Nkoghe [c], Jean-Paul Gonzalez [d], Eric Maurice Leroy [a,b,*]

[a] *Centre International de Recherches médicales de Franceville, BP769 Franceville, Gabon*
[b] *Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UT178, BP769 Franceville, Gabon*
[c] *Programme National Tuberculose, BP5879 Libreville, Gabon*
[d] *Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UT178, Mahidol University at Salaya, Phutthamonthon 4, Nakhonpathom 73170, Thailand*

Available online 16 May 2005

Abstract

Several countries spanning the equatorial forest regions of Africa have had outbreaks of Ebola hemorrhagic fever over the last three decades. This article is an overview of the many published investigations of how Ebola virus circulates in its natural environment, focusing on the viral reservoir, susceptible animal species, environmental conditions favoring inter-species transmission, and how the infection is transmitted to humans. Major breakthroughs have been made in recent years but many outstanding questions must be dealt with if we are to prevent human outbreaks by interfering with the viral life cycle.
© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Ebola; Human; Viral reservoir; Bat; Primate; Zoonosis

1. Introduction

Ebola hemorrhagic fever is caused by a negative-strand RNA virus. The viral genome encodes seven structural proteins and one non-structural protein (soluble glycoprotein) [1]. Morphologically, the virus consists of a linear genome entirely enclosed in an envelope, which is coated by the membrane glycoprotein, organized in homotrimers [2]. Genetic and antigenic characterization of Ebola virus (EBOV) isolates during human outbreaks has led to the identification of four subtypes [3]—*Ebola Sudan*, *E. Zaire*, *E. Ivory Coast* and *E. Reston*. In contrast to *Ebola Reston*, which originates in Asia and has never been reported to cause human disease [4,5], the other three subtypes circulate on the African subcontinent and are pathogenic for humans, causing a specific febrile hemorrhagic disease. After an incubation period of about a week, victims rapidly develop high fever, diarrhea, vomiting, respiratory disorders and hemorrhaging. Death ensues within a few days. The case fatality rates are about 80% with *E. Zaire* [6,7] and 50% with *E. Sudan* [8,9].

Ebola virus hemorrhagic fever is a zoonotic disease transmitted accidentally by direct contact with infected live or dead animals. Since the first recorded human outbreak in 1976, many teams have attempted to unravel the natural history of EBOV in Africa. In this setting the natural history can be defined as the sum of the different ways in which the virus circulates in its natural environment, from its natural host(s) to susceptible intermediate animal species (i.e. those which develop fatal infection), and then to humans, either directly via the natural host or through an intermediate species.

This article reviews many previous studies designed to elucidate the natural history of EBOV. We describe current knowledge and outstanding questions in the following order: first, result from studies of human outbreaks, which help to throw light on the ecological context of EBOV emegence and to identify sources of infection; second, the way in which the virus infects humans; third, naturally infected intermediate animal species (how they are infected by the reservoir and how the infection spreads within their populations); and finally, attempt to identify the EBOV reservoir.

* Corresponding author. Tel.: +241 67 70 92; fax: +241 67 72 95.
E-mail address: Eric.Leroy@ird.fr (E.M. Leroy).

1286-4579/$ - see front matter © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.micinf.2005.04.006

2. Human outbreaks

2.1. 1976-1979: The first recorded Ebola outbreaks

EBOV first emerged in the form of two nearly simultaneous outbreaks, one due to *E. Sudan* and the other to *E. Zaire*. The first outbreak was due to *Ebola Sudan* (Fig. 1). As its name implies, it occurred sn Sudan, near the border with the Democratic Republic of the Congo (DRC) (formerly Zaire), mainly affecting the towns of Nzara and Maridi [8], between June and Novembe 1976. The mortality rate was 53% (150 of 284 victims), which is characteristic of the *Sudan* subtype.

The seocnd outbreak was due to *E. Zaire* (Fig. 1). It occured in DRC, near the borders with Sudan and the Central African Republic (CAR), between August and November 1976 [10]. The epicenter was in Yambuku, about 800 km from Nzara. This previously unknown disease was named for the river Ebola, which flows past Yambuku. The mortality rate was 89% (284 deaths among 318 declared victims).

EBOV made its third appearance in June 1977, infecting a 9-year-old girl living in Tandala, a DRC town close to the border with CAR [11], 325 km from Yambuku (Fig. 1). She died with typical critical manifestations of hemorrhagic fever due to *E. Zaire*. No secondary cases were identified.

The third outbreak (the second due to *E. Sudan*) occurred between July and october 1979 in the same region as the first, i.e. in Nzara, Sudan [9]. As in 1976, the first persons to be infected worked in the Nzara cotton factory. This outbreak was less extensive than the first, affecting 34 people and killing 22 (mortality 65%).

2.2. 1994-1997: Ebola resurgence

After a 15-year period in which no further cases were recorded, Ebola re-emerged in 1994 for a 3-year period. This new phase was marked by the identification of a new subtype, *E. Ivory Coast*, and by an escalation of outbreaks due to *E. Zaire*.

The first human case to be diagnosed in Africa during this period occurred in June 1994, when a female Swiss ethnologist became ill a few days after autopsying a chimpanzee found dead in Tai National Park (Fig. 1) located in Ivory Coast, not far from the border with Liberia [12,13,14]. EBOV infection was confirmed in both them woman and the chimpanzee.

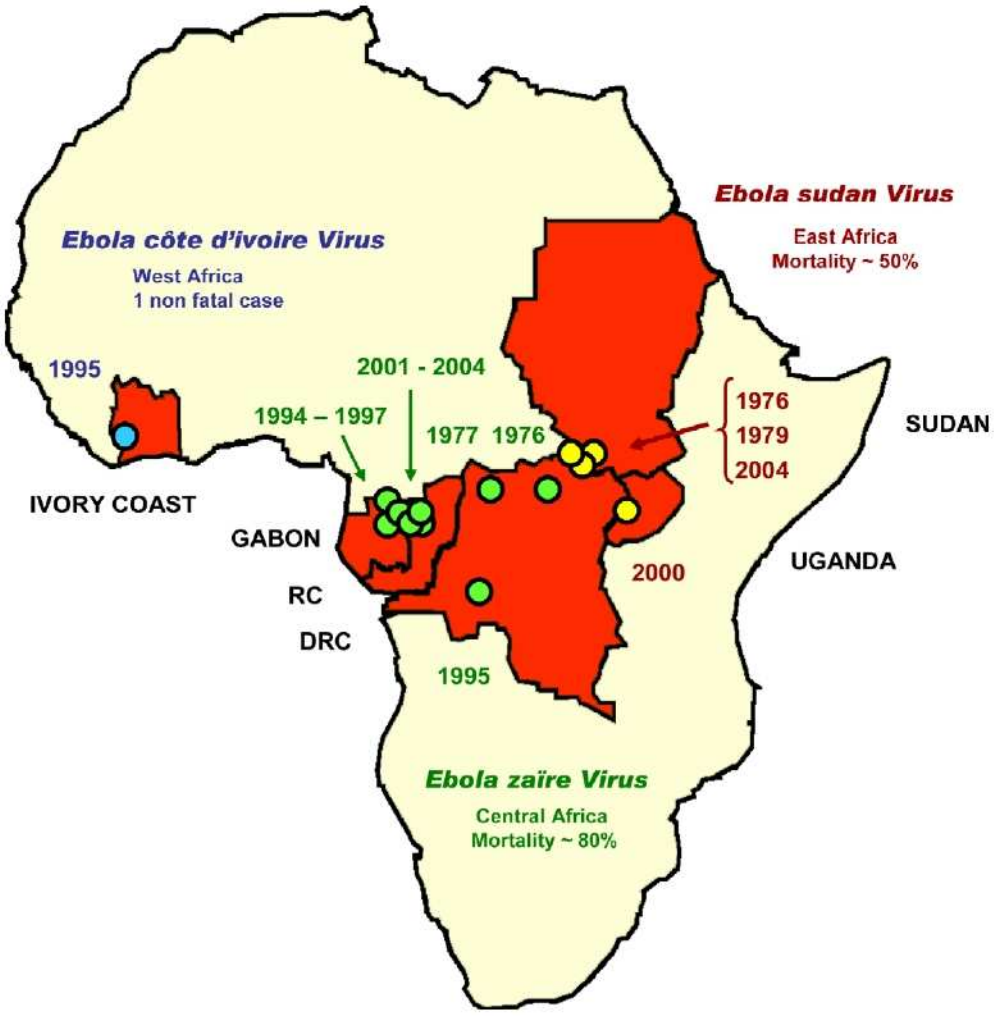


Fig. 1. Human EBOV outbreaks in Africa.
RC: Republic of Congo; DRC: Democratic Republic of Congo.

Although this case occurred in a biotope similar to that of the first outbreaks, and at the same distance from the equator (about 5° north), it was the first and only human case observed in West Africa, and the only case clearly attributed to *E. Ivory Coast*.

The first outbreak during this period (the fourth in total) occurred in the town of Kikwit, situated about 500 km southeast of the DRC capital, Kinshasa [15] (Fig. 1). Between January and July 1995, the virus killed 256 of its 315 victims, a mortality rate (81%) characteristic of the Zaire subtype. Despite the use of more sophisticated scientific and medical resources than those available in 1976, this outbreak was as large as the 1976 outbreak, probably because it affected a town of several hundred thousand inhabitants where person-to-person transmission was occurring primarily in two of the hospitals in the town.

Finally, three further outbreaks, all due to *E. Zaire*, occurred in northeast Gabon [16] (Fig. 1), the first in Mekouka between 1994 and 1995, the second in Mayibout in early 1996, and the third in Booué between 1996 and 1997.

The first of these three outbreaks occurred in northeastern Gabon, close to the border with Cameroon, between December 1994 and February 1995 [17]. It took place in two successive waves: the first affected three gold-miners' camps located in the heart of the forest, in December 1994, with 32 recorded clinical cases. Some of the victims left the camps for the nearest hospital, located in Makokou, where they infected other patients and caused a second wave. Sixteen cases were retrospectively identified in neighboring villages. In total, 49 clinical cases and 29 deaths were recorded (mortality rate 59%). Epidemiological data in this outbreak are somewhat imprecise, and not all clinical cases were recorded: EBOV infection was diagnosed retrospectively, and only in patients whose stored clinical samples were available.

In February 1996 the second outbreak hit the villages of Mayibout I and II, located about forty kilometers south of Mekouka along the river Ivindo [16]. The first victims were 18 children in Mayibout II village who had helped to carry and butcher a chimpanzee carcass found in the forest. These 18 children infected their families and friends, who in turn transmitted the disease to neighboring villages—Mayibout *I* to the south and Mvadi to the north. In total, this outbreak affected 31 people and caused 21 deaths (mortality rate 67.7%).

The third outbreak, the Booué outbreak, occurred between October 1996 and March 1997. Officially, it began on 5 October 1996, when the first patients tested positive by antigen capture [16]. However, epidemiological investigations indicated that it in fact began 2 months earlier; the index case was a hunter who died with hemorrhagic fever. Several carcasses of chimpanzees were found in the surrounding forest at the same time, and the CDC in Atlanta detected EBOV antigens in tissue samples taken from one of them. At the end of the same month, a second hunter died with similar symptoms, while one of his friends fell ill 12 days later and was taken to Booué hospital. This patient left the hospital for a village close to Booué, where he received traditional treatment, including scarification, from a *nganga*. The traditional healer, his assistant and some of his subsequent patients also became infected and in turn transmitted the disease to inhabitants of several towns and villages in Gabon. Fifteen cases and 11 deaths were recorded in Libreville, together with three cases in Lastourville, 130 km southeast of Booué. This outbreak also caused a case in South Africa: a Gabonese physician working in Libreville, unaware that he was infected by EBOV, traveled to Johannesburg for treatment, where he infected a nurse, who died a few days later. This outbreak, with 60 cases and 45 deaths occurring over a 6-month period, was noteworthy for its wide geographic range (which also probably explains its size).

2.3. 2000-2004: An emerging geographic pattern of E. Zaire and resurgence of E. Sudan

This period saw multiple outbreaks of *E. Zaire* in a relatively limited area (the border region of Gabon and the Republic of Congo), and by the resurgence of *E. Sudan* in Sudan and Uganda (Fig. 1). The other outstanding feature of this period is the occurrence of Ebola outbreaks in large animal species (mainly gorillas and chimpanzees).

2.3.1. E. Zaire outbreaks

The first outbreak during this period was the Mekambo outbreak, which occurred between October 2001 and May 2002 [18] (Figs. 2 and 3). The Mekambo outbreak was in fact a series of independent outbreaks [19]. The first occurred in the village of Mendemba on 25 October 2001 (Fig. 3). This was the most severe, and generated several secondary foci (in Mekambo, and also the RC villages of Ntolo, Ilahounene, Ekata and Olloba). The secondary focus in Mekambo itself generated a tertiary focus in Makokou, following the evacuation of a patient from Mekambo to the Makokou hospital. This outbreak appears to have started when hunters manipulated an antelope carcass they had found. Two other outbreaks occurred more or less simultaneously (on 28 November 2001 and 1 December 2001) in the villages of Ekata and Olloba in the other side of the border, in the Congo. These outbreaks apparently started when local hunters found and manipulated the carcasses of an antelope (Ekata) and a gorilla (Olloba). Two other outbreaks occurred 3 weeks later, some distance apart: the first on 22 December 2001 in Ekata village located on the road leading south from Mekambo towards RC, and the second on 29 December 2001 in Etakangaye village located on the northern axis. The source of the first outbreak has not been identified, while the second resulted from the handling of a chimpanzee carcass. The last clearly identified outbreak occurred on 27 March 2002 when hunters from Grand-Etoumbi village (on the northern axis) butchered and ate a gorilla carcass they had found in the forest. The outbreaks that occurred on the Mekambo-Olloba axis then spread to the other side of the border, as far as the RC town of Mbomo, located about 80 km from Olloba.

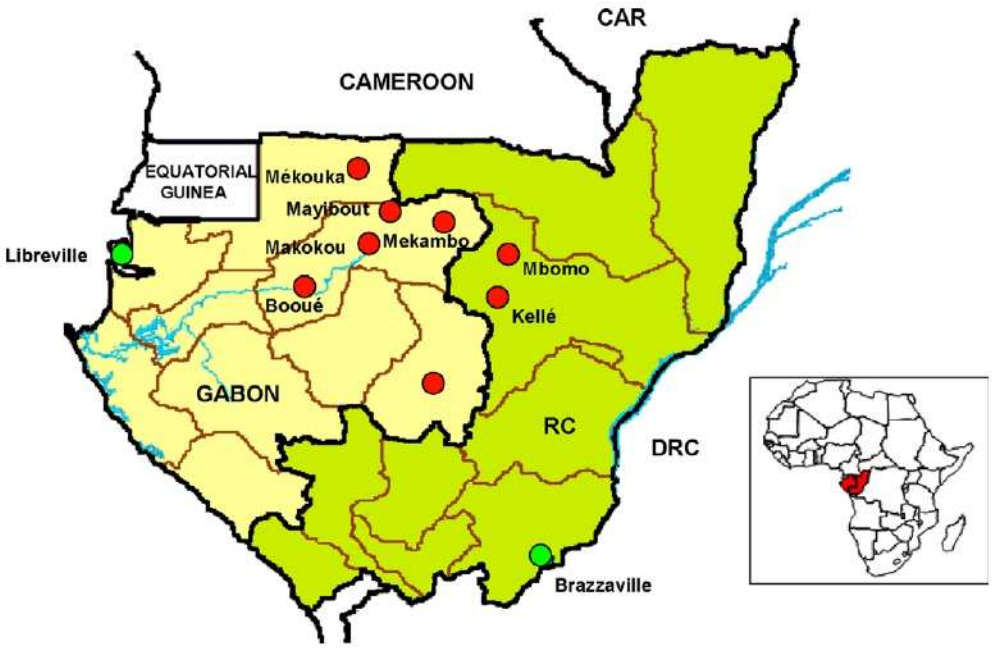


Fig. 2. EBOV outbreaks in the border region of Gabon and the Republic of Congo.
RC: Republic of Congo; DRC: Democratic Republic of Congo; CAR: Central African Republic.

Simultaneously, a second outbreak occurred in mid-January in the RC villages of Entsiami, Abolo and Ambomi, located close to the Gabonese border, and nearly 200 km south of Olloba (Fig. 3). The disease then spread to the town of Kelle about 65 km away (Fig. 2). The origin of this outbreak is unknown. Sequencing of viral isolates confirmed the existence of several concurrent outbreaks.

The third outbreak, confirmed by laboratory tests, again affected the region of Mbomo in RC, between December 2002 and May 2003 [20] (Fig. 3). This outbreak had two independent sources, one in Yembelengoye (near Entsiami) and one in Mvoula, a gold-mining camp located further east, following the handling of animal carcasses. The Mvoula focus mainly affected Mbomo, while the Yembelengoye focus

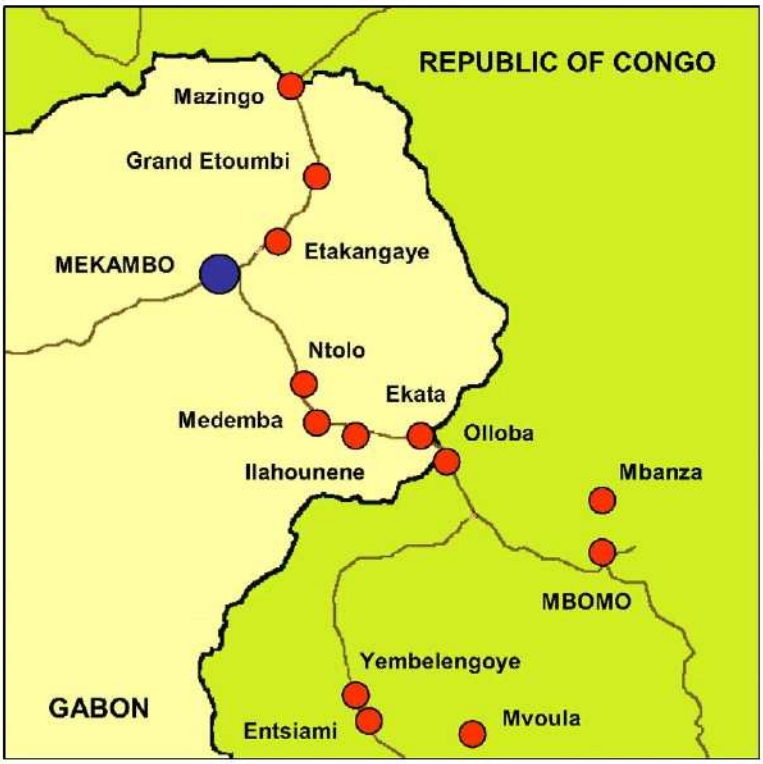


Fig. 3. EBOV outbreaks in the border region of Gabon and the Republic of Congo.

mainly affected Kelle. This outbreak involved 143 cases and 128 deaths.

The last outbreak to occur during this period again affected the region of Mbomo, between October and December 2003 [21]. The first cases occurred in Mbanza, a village located about 30 km north of Mbomo (Fig. 3). No animal source was clearly identified. There were 35 cases and 29 deaths.

Simultaneously with these human outbreaks, major Ebola outbreaks also affected animal species, including gorillas, chimpanzees and duikers, apparently accounting for the sharp population declines observed in these regions [22,19,23].

2.3.2. E. Sudan outbreaks

Two outbreaks of *E. Sudan* occurred during this period (Fig. 1). The site of the first was in Uganda between October 2000 and January 2001, causing 173 deaths among its 425 victims (mortality rate 40.7%) [24]. This was numerically the largest of all recorded outbreaks, and comprised three foci, one in the immediate area of Gulu, one in the town of Masindi, and another smaller outbreak in Mbarara, where a military patient carried the outbreak.

In contrast, the second outbreak was the smallest ever recorded, with 17 cases and seven deaths during May and June 2004; this mortality rate (41%) is characteristic of *E. Sudan* [25]. The outbreak occurred in Sudan, in a town called Yambio, located only a few dozen kilometers from Nzara and Maridi, which had been the sites of outbreaks in 1976 and 1979.

Thus, since the discovery of EBOV in 1976, there have been 13 outbreaks in Africa (nine due to *E. Zaire* and four to due to *E. Sudan*) and two isolated cases (due to *E. Zaire* and *E. Ivory Coast*). These outbreaks took place during three distinct periods (three between 1976 and 1979, four between 1994 and 1997, and six between 2000 and 2004). In total, EBOV-infected about 1850 people and caused nearly 1300 deaths. The different EBOV subtypes showed a certain geographic pattern, *E. Ivory Coast* affecting West Africa, *E. Sudan* east Africa, and *E. Zaire* central Africa. In contrast, the ecological circumstances of human outbreaks due to the three African EBOV subtypes were very similar, all involving forest regions located near the equator. These regions share a number of climatic and ecological characteristics, such as dense vegetation and a tropical climate, with two peaks of rainfall separated by dry seasons.

3. EBOV transmission to humans

3.1. Transmission from infected animals

In most outbreaks the source of the human index case was not identified. This includes all the outbreaks occurring from 1976 to 1979, the outbreaks of Mekouka (Gabon) in 1995, Booué (Gabon) in 1996, Kikwit (DRC) in 1995, and all the outbreaks of *E. Sudan* in Sudan (1976, 1979 and 2004) and Uganda (2000).

In contrast, several other outbreaks were clearly linked to animal carcasses. As mentioned above, a Swiss ethnologist became infected by *E. Ivory Coast* in 1994 while autopsying a chimpanzee (this remains the only recorded case of human infection by this subtype). The animal was found to be infected by the same EBOV strain as the ethnologist [12]. Similarly, the 1996 Mayibout outbreak in Gabon started among children who had found and butchered a chimpanzee carcass in the forest [16]. Similar sources have been reported for Marburg virus, the other member of the *Filoviridae* family: the 1967 outbreak in Marburg and Belgrade was linked to the handling of organs and tissues from vervet monkeys imported from Uganda [26,27].

The sources of the outbreaks that occurred in the border region of Gabon and RC between 2001 and 2003 are well documented. All these outbreaks (some of which had multiple sources) occurred after people had handled animal carcasses found in the forest (mainly gorillas, chimpanzees and duikers) [19]. We use the term "epidemic chain" to designate all human cases of infection arising from a given index case and thus from a given animal carcass. Gorilla carcasses were the source ot the epidemic chains in Olloba 2001, Grand-Etoumbi 2002, Entsiami 2002 and Yembelengoye 2002. Chimpanzee carcasses appear to have been the source of the epidemic chains in Etakangaye 2001 and Olloba 2002. Finally, duiker carcasses apparently caused the epidemic chains in Mendemba 2001, Ekata 2001 and Mvoula 2003.

3.2. Transmission from the reservoir

There is currently no firm proof that humans can be directly infected by the (unknown) EBOV reservoir species, but several lines of evidence support this possibility.

3.2.1. Bats: epidemiological evidence

Bats were noted in several occasions in the warehouses of the cotton factory, which employed the first people to be infected during the 1976 and 1979 outbreaks in Nzara, Sudan. No other likely source of infection was identified in either outbreak.

It is also noteworthy that the Australian who was infected by Marburg virus (and subsequently infected two other people in Johannesburg in 1975) had just returned from a trip to Zimbabwe, during which he had slept frequently in the open and once in an abandoned house, the loft of which was inhabited by numerous bats.

A few days before becoming ill, the French engineer who was infected by Marburg virus in Kenya in 1980 (and who subsequently infected his doctor) had visited caves containing large bat populations [28]. However, when baboons and vervet monkeys were placed in cages inside the same caves, none became infected [29].

Two families of viruses (the *Rhabdoviridae* and *Paramyxoviridae*) are genetically related to the *Filoviridae* [30]. The order *Mononegavirales* encompasses all viruses with genomes consisting of a single negative-strand of non-segmented RNA.

The other two principal families in this order are the *Paramyxoviridae* (Hendra virus, Nipah encephalitis virus, measles virus, etc.) and the *Rhabdoviridae* (including rabies virus). Sequencing studies of the EBOV genes encoding the RNA polymerase (protein L) and nucleoprotein (NP) revealed that the *Paramyxoviridae* and *Rhabdoviridae* share many nucleotide stretches [30,31], supporting the genetic relatedness of these two viral families with the *Filoviridae*. Several studies have raised the possibility of direct human infection by bats carrying some of these viruses. For example, Hendra virus and Nipah virus can apparently be transmitted directly to humans by the consumption of fruit contaminated with fruit bat saliva [32]. Similarly, some rabies virus variants can be transmitted directly to humans by the bites of insect-eating bats [33,34].

3.2.2. Arthropods: several epidemiologial clues

Although arthropods have never been successfully infected following inoculation [35,36], several observations suggest they can transmit Ebola virus to humans. A study done in 1968 showed that Marburg virus would persist for more than 3 weeks in *Aedes* mosquitoes after experimental inoculation [37]. It is also noteworthy that the Australian patient infected by Marburg virus in 1975 in Zimbabwe had been bitten, 6 days before symptom onset, by an arthropod (a spider, scorpion, ant, or wasp).

4. EBOV-susceptible animals: species, transmission and spread

4.1. Species natuarlly infected by EBOV

Numerous dead animals were found in the surrounding forest during the outbreaks in Gabon and RC between 2001 and 2004 [38]. To date, we have analyzed a total of 34 carcasses at the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Gabon, between 2001 and 2003. The carcasses were in a state of decomposition such that we could only sample muscle and skin and, in some cases, only bone tissue. We used a panel of highly sensitive techniques, including detection of EBOV-specific IgG and viral antigens in homogenized soft tissues (skin and muscle); virus isolation on soft-tissue cell lines; detection of RNA fragments by gene amplification from soft tissue and bone; and viral protein detection by immunohistochemistry on soft tissues fixed in 10% formalin.

Fourteen of the 34 animals (10 gorillas, three chimpanzees and one duiker) tested positive for Ebola infection, indicating that these three animal species can be naturally infected by EBOV. Most infected animals probably die rapidly, as suggested by the rapidly fatal nature of experimental EBOV infection in a variety of non-human primate species. However, disease severity and progression after experimental inoculation both depend on the dose, the portal of entry, and the viral subtype. In general, symptoms are more severe and long lasting when the inoculum is large [39,40]. Moreover, african EBOV subtypes are more pathogenic than *E. Reston* (the only Asian subtype) in macaque monkeys [41]: the mortality rate is higher, symptoms are more severe, hemorrhaging is more frequent and more generalized, and death is more rapid. *E. Sudan* shows intermediate pathogenicity between *E. Reston* and the other two African subtypes (*Zaire* and *Ivory Coast*): macaques inoculated with *E. Sudan* often survive, while almost all those inoculated with *E. Zaire* succumb [39,41].

Analyses of animal carcasses show that the great apes of the central African forests are particularly at risk from Ebola. This was confirmed by a serologic survey based on 790 samples taken from about 20 primate species in Cameroon, Gabon and RC [42]: for example, 12.9% of wild chimpanzees in Cameroon, Gabon and RC were found to have anti-EBOV IgG. Interestingly, some positive samples largely preceded the first human outbreaks in these regions. Together, the results suggest that these animals are in regular contact with the EBOV reservoir, that some of them survive the infection, and that EBOV has probably been present for a very long time in the central African forest region. EBOV-specific antibodies were also found in other monkey species (five drills, one baboon, one mandrill and one *Cercopithecus* monkey), suggesting that EBOV circulation may be very complex, involving far more than simple direct passage from the reservoir to gorillas and chimpanzees. It is also possible that there are several reservoir species, and that many other animal species are susceptible to the virus and thereby participate in the natural EBOV life cycle.

4.2. Spread of Ebola in wild animal populations

As stated above, the different outbreaks that occurred between 2001 and 2003 in Gabon and RC were the first to be linked to concurrent animal mortality, mainly affecting gorillas, chimpanzees and duikers. The discovery of EBOV-infected corpses of these three species strongly suggests a major role of the virus in the observed deaths. Between 2001 and 2003 the carcasses of 50 gorillas, 15 chimpanzees and 14 duikers were found in the outbreak areas of Gabon and RC. Given that a carcass disappears completely in less than 3 weeks in the rain forest, and that most of these carcasses were discovered within 3-4 h walking distance of villages, it is largely possible that several hundreds or even thousands of animals perished during this 2-year period in the border region of northeast Gabon and RC. Furthermore, calculated numbers of animal populations in certain areas, based on signs such as excreta, paw imprints, broken vegetation and nests, revealed a large increase in the mortality of some animal species, just before and also during human outbreaks. Gorilla and duiker populations are estimated to have fallen by 50% between 2002 and 2003 n the Lossi sanctuary (320 km^2) situated in RC, while chimpanzee populations fell by 88% [19]. Even if these are only approximations—for example, the demise of a dominant male gorilla provokes the dispersal of the group, making the remaining members diffi-

cult to count—they strongly suggest that EBOV provoked massive outbreaks in these animals, with hundreds or even thousands of deaths during a very short period (note that the possibility of such massive population declines due to EBOV may have major implications for animal conservation).

These recent studies showing an increase in animal mortality coinciding with human outbreaks, and providing biological confirmation of EBOV infection of animal carcasses, confirm the results of other studies conducted some years previously in other regions. First, a team of primatologists showed that gorilla and chimpanzee population densities fell strongly between 1994 and 1998 in the forest block of Minkebe to the northeast of Gabon, near the border with Cameroon [23]. The occurrence of human Ebola outbreaks in 1995 and 1996 in the same areas (Mekouka and Mayibout outbreaks) suggests that this marked decline in gorilla and chimpanzee populations may have been due to EBOV. Similarly, another study conducted in the Tai Forest of Ivory Coast showed the disappearance of 11 members (26%) of a group of 43 chimpanzees during the month of November 1994 [43]. The occurrence of the only human case of infection by *E. Ivory Coast*, together with the immunohistochemical positivity of tissues taken from a chimpanzee carcass, both events taking place in the same area and during the same period, suggests that the deaths in this group of chimpanzees may also have been due to EBOV.

4.3. EBOV emergence in animals

The chronological and geographic characteristics of the different outbreaks in Gabon and DRC between 1995 and 2003 point to a drift from northeast Gabon towards DRC. This raises the possibility that gorillas and chimpanzees are succumbing to a single outbreak that has been devastating animal populations for about 10 years, spreading along a northwest/southeast axis [22].

The EBOV genome is particularly stable. For example, the rate of mutations between strains *Booué* 96 (Gabon) and *Zaire* 76 was only 1.7% in the membrane glycoprotein gene (GP), 1.3% in the nucleoprotein (NP), 1.2% in the 40-kDa structural protein VP40, and 0.9% in the 22-kDa structural protein VP24, even though these strains were isolated more than 1000 km, and 20 years apart [44]. Similar genetic differences were found between the 2001 and 2003 outbreak strains and the strains *Mekouka* 94 (Gabon) and *Zaire* 76 [19]. Moreover, sequencing of a 249-nucleotide stretch in the most variable part of the GP gene showed no genetic differences between isolates recovered from nine patients (five of whom survived) who were samped during the 1995 Kikwit outbreak in Zaire (DRC) [45].

In light of these results, and in order to understand how great apes are infected, we amplified and systematically sequenced the coding part of the GP gene (the most variable gene of the EBOV genome) in samples from all gorilla and chimpanzee carcasses. We found a distinct viral sequence in each carcass [19], even in carcasses belonging to the same species (gorilla or chimpanzee) that had been discovered at the same time and only a few hundred meters apart (Leroy and Wittmann, personal data). As we had previously shown that a given outbreak strain undergoes no genetic variations, even after several human passages, these results argued against intraspecies transmission. On the contrary, the observed genetic diversity suggests that great ape infection results from simultaneous but independant transmission events from the reservoir species [19]. In this scenario the sequence variations probably result from viral adaptation to the natural host, which likely consists of several subspecies of genetically distinct groups. Thus, Ebola outbreaks in great apes appear to result not from the propagation of a single outbreak from one individual to another, but rather from massive simultaneous infection by the aninal reservoir in particular environmental conditions (outbreaks always occur at the same times of the year, during the transitional periods between the dry and rainy seasons). Human infection occurs secondarily, and is generally linked to handling of infected animal corpses. Unfortunately, the precise environmental conditions required for EBOV to emerge from its reservoir are unknown, and the reservoir species remain(s) to be identified.

5. The reservoir species: 30 years of fruitless research?

The reservoirs (natural hosts) of Ebola virus and Marburg virus remain a mystery. Since the first recorded human outbreak in 1976, several laboratory and field studies have been conducted to identify the animal(s)—vertebrate or invertebrate—that can harbor the virus asymptomatically.

5.1. Wild animal capture studies

The first field study dates back to the Yambuku outbreak in 1976 in DRC (Table 1). An attempt was made to infect EBOV-permissive cell lines with samples of arthropods captured in and near patients' homes. The arthropods were pooled and crushed, and the resulting suspension was used to inoculate monkey kidney epithelial cells (Vero cells). Vero cells were also inoculated with centrifuged serum prepared from whole-blood samples of vertebrates captured near the homes and villages [10]. No viruses were isolated, despite the capture of 818 bedbugs, 1500 mosquitoes, 10 domestic pigs, one cow, seven bats, 123 rodents, eight squirrels, six *Cercopithecus* monkeys, and three small antelopes. A similar study of samples from 499 vertebrates obtained at the time of the 1976 outbreak in Sudan also gave negative results [46].

After the isolated case of *E. Zaire* infection in Tandala, DRC, in 1977 [11], intensive investigations were undertaken in 1979 in a very large northern region of DRC, including Tandala and Yambuku, which are about 300 km apart (Table 1). This study, conducted between June and August 1979, during the dry season, focused on two regions: the first centered on Yambuku and covered an area of 2800 km^2 with about 50,000 inhabitants, while the second, of roughly the

Table 1
Animals captured in field studies designed to identify the EBOV reservoir

			Yambuku 1976 (OMS 1978)	Nzara 1976 (OMS 1978)	Cam-Zaire 1979-80 (Breman 1999)	Kikwitt 1995 (Leirs 99, Reiter 99)	Tai 1994-1997 (Morvan (Formenty 99) 99)	RCA 1999	Total
Mammals	Chiroptera		7				652		
		Megachiroptera		4	41	125		19	189
		Microchiroptera		174	422	414		4	1014
	Rodents		131	309	661	1759	283	163	3306
	Insectivores			7	53	114	398	56	628
	Carnivores				27	28			55
	Primates				267	12	27		312
	Pholidotes				66	29			95
	Artiodactyles		13		27	22			62
Birds					67	184			533
Reptiles and amphibians				5	33	127	282		165
Total vertebrates			157	499	1664	2814	1642	242	7018
Arthropods			2318			27,843			30,161

Arthropods: bedbugs, mosquitoes, ticks, lice, flies.

same size and with 80,000 inhabitants, centered on Tandala [47]. the animals captured in this study comprised 267 primates, 462 bats, 661 rodents, 173 other mammals, 67 birds, and 33 reptiles and amphibians. Once again, no viruses were isolated.

Two other field studies were performed in 1995 near Kikwit, immediately after the outbreak (Table 1). A total of 2814 vertebrates [48] and 27,843 arthropods [49] were captured during respective periods of 3 and 6 months after the end of the outbreak. Viral isolation was attempted from both categories of animals, and vertebrates were also tested for *E. Zaire*-specific IgG. No positive IgG reactions were obtained, and no viruses were isolated on Vero cells. The vertebrates included 1759 rodents, 539 bats, 114 insectivores, 184 birds, and 127 reptiles and amphibians. The arthropods included 15,118 mosquitoes, 124 blood-sucking flies, 6538 bedbugs, 144 fleas, 103 lice, and 5816 ticks.

In Tai Forest, Ivory Coast, 1642 vertebrates (652 bats, 283 rodents, 398 insectivores, 27 monkeys and 282 birds) were captured and autopsied between 1996 and 1997 [50]. Organs were analyzed with the same methods as those described above. Except for a colobe bai monkey (red colobus, *Colobus badius*) that was seropositive for EBOV, no specific IgG reactions were detected and no viruses were isolated on cell lines (Table 1).

Finally, 242 vertebrates (24 bats, 163 rodents and 56 insectivàres) were captured in CAR in 1998 [51] (Table 1). Small EBOV-specific genetic sequences were amplified from organs of six mice (*Mus setulosus* and *Praomys* sp) and a shrew (S*ylvisorex ollula*). However, although these results constitute the only biological evidence that EBOV may be present in healthy animals, no firm conclusions as to the EBOV reservoir status of these animals can be drawn, given the lack of specific serologic responses, the lack of nucleotide specificities in the amplified viral sequences, the failure of virus isolation, and the non-reproducible nature of the results.

5.2. Experimental infection

Attempts have also been made to infect various plant and animal species [35,36], including rodents (mice, shrews, rats, guinea pigs, etc.). Bats, birds (mainly pigeons), reptiles (tortoises, snakes, geckos, frogs), mollusks (mainly snails), arthropods (spiders, cockroaches, ants, centipedes, mosquitoes and butterflies) and more than 33 plant varieties belonging to 24 species (tomatoes, cucumbers, wheat, cotton, lupin, corn, tobacco, etc.).

All attempts to inoculate rodents, birds, reptiles, mollusks and plants failed to yield evidence of virus replication. Likewise, intrathoracic inoculation of arthropods with *Ebola Zaire* and *Ebola Reston* led to no detectable viral replication.

In contrast, some bat species belonging to the genera *Epomophorus* and *Tadarida* developed transient viremia lasting nearly 4 weeks after intravenous inoculation. However, given the non-reproducibility of these experiments, and the very particular conditions of inoculation (dose and route), these results fail to prove that bats are indeed the EBOV reservoir. They nonetheless open up new research perspectives, notably for field studies.

5.3. Conclusion

The natural reservoirs of Ebola and Marburg viruses remain elusive, as the only positive results are fragmentary and non-reproducible, and were obtained in questionable conditions. However, a trail of epidemiological clues (see above) makes bats the most likely candidates. Furthermore, several viruses belonging to virus families that are genetically related to the *Filoviridae*, such as *Rhabdoviridae* and *Paramyxoviridae*—rabies virus [52], Hendra virus [53] and Nipah virus [54]—are known to have bat reservoirs.

6. Conclusion

This article reviews all available data on the natural history of Ebola virus in Africa. Although several questions

remain, our knowledge of how the virus circulates in its natural environment has improved markedly in recent years. Despite the apparent geographic disparity of human outbreaks and the marked genetic diversity of the three "African" EBOV subtypes, all three subtypes circulate within a homogeneous ecological entity composed of the African equatorial forest block. The virus reservoir has not yet been identified, but many of the steps leading to human outbreaks are now fairly well understood. Several animal species, including great apes, are naturally infected by the virus, probably directly from the reservoir. These intermediate animal species develop a disease, which is usually fatal. Their carcasses remain infectious for humans, who may in turn transmit the disease through the community. These infected animals thus spread the virus to other ecological niches linked to their environment and behaviors. The large number of EBOV-permissive animal species, their variable sensitivity to the disease, and their very different patterns of behavior suggest that EBOV transmission cycles within its natural environment are highly complex. Identification of the reservoir and of the natural life cycle of the virus should help in the development of strategies for preventing human outbreaks and for reducing the impact of EBOV on animal species such as great apes, whose wild populations are very seriously threatened in endemic regions.

References

[1] A. Sanchez, M.P. Kiley, B.P. Holloway, D.D. Auperin, Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus, Virus Res. 29 (1993) 215-240.

[2] V.E. Volchkov, Processing of the Ebola virus glycoprotein, in: H.-D. Klenk (Ed.), Current Topics in Microbiology and immunology: Marburg and Ebola Viruses, vol. 235, Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 35-47.

[3] H. Feldmann, H.D. Klenk, A. Sanchez, Molecular biology and evolution of filovirures, Arch. Virol. Suppl. 7 (1993) 81-100.

[4] P.E. Rollin, R.J. Williams, D.S. Bressler, S. Pearson, M. Cottingham, G. Pucak, A. Sanchez, S.G. Trappier, R.L. Peters, P.W. Greer, S. Zaki, T. Demarcus, K. Hendricks, M. Keyley, D. Simpson, T.W. Geisbert, P.B. Jahrling, C.J. Peters, T.G. Ksiazek, Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States, J. Infect. Dis. 179 (1999) S108-S114.

[5] C.G. Hayes, J.P. Burans, T.G. Ksiazek, R.A. Del Rosario, M.E.G. Miranda, C.R. Manaloto, A.B. Barrientos, C.G. Robles, M.M. Dayrit, C.J. Peters, Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus, Am. J. Trop. Med. Hyg. 46 (1992) 664-671.

[6] M.A. Bwaka, M.-J. Bonnet, P. Calain, R. Colebunders, A. De Roo, Y. Guimard, K.R. Katwiki, K. Kibadi, M.A. Kipasa, K.J. Kuvula, B.B. Mapanda, M. Massamba, K.D. Mupapa, J. Muyembe-Tamfum, E. Ndaberey, C.J. Peters, P.E. Rollin, E. Van den Enden, Ebola hemorrhagic fever in kiwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients, J. Infect. Dis. 179 (1999) S1-S7.

[7] D. Nkoghé, P. Formenty, S. Nnégué, M. Toung Mvé, I. Hypolite, P. Léonard, E.M. Leroy, Recommandations pratiques pour la prise en charge sur le terrain des patients infectés par le virus Ebola, Med. Trop. 64 (2004) 199-204.

[8] D.I.H. Smith, Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976, Bull. WHO 56 (1978) 247-270.

[9] R.C. Baron, J.B. McCormick, O.A. Zubeir, Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread, Bull. WHO 61 (1983) 997-1003.

[10] K.M. Johnson, Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976, Bull. WHO 56 (1978) 271-293.

[11] D.L. Heymann, J.S. Weisfeld, P.A. Webb, K.M. Johnson, T. Cairns, H. Berquist, Ebola hemorrhagic fever: Tandala, 1977-1978, J. Infect. Dis. 142 (1980) 372-376.

[12] B. Le Guenno, P. Formenty, M. Wyers, P. Gounon, F. Walker, C. Boesch, Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola, Lancet 345 (1995) 1271-1274.

[13] B. Le Guenno, P. Formenty, C. Boesch, Ebola virus outbreaks in Ivory Coast and Liberia, 1994-1995, in: H.-D. Klenk (Ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology: Marburg and Ebola viruses, vol. 235, Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 77-84.

[14] P. Formenty, C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmosen, A. Wildmer, Human infection due to Ebola virus, subtype côte d'ivoire: clinical and biologic presentation, J. Infect. Dis. 179 (1999) S48-S53.

[15] A.S. Khan, F.K. Tshioko, D.L. Heymann, B. Le Guenno, P. Nabeth, D.L. Kerstiëns, Y. Fleerackers, P.H. Kilmarx, G.R. Rodier, O. Nkulu, P.E. Rollin, A. Sanchez, S.R. Zaki, R. Swanepoel, O. Tomori, S.T. Nichol, C.J. Peters, J.J. Muyembe-Tamfum, T.G. Ksiazek, The reemergence of Ebola hamorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995, J. Infect. Dis. 179 (1999) S76-S86.

[16] A.J. Georges, E.M. Leroy, A.A. Renaut, C. Tevi Benissan, R.J. Nabias, M. Trinh Ngoc, P.I. Obiang, J.P.M. Lepage, E.J. Bertherat, D.D. Bénoni, E.J. Wickings, J.P. Amblard, J.M. Lansoud-Soukate, J.M. Milleliri, S. Baize, M.-C. Georges-Courbot, Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and Health control issues, J. Infect. Dis. 179 (1999) S65-S75.

[17] J. Amblard, P. Obiang, S. Edzang, C. Prehaud, M. Bouloy, B. Le Guenno, Identification of the Ebola virus in Gabon in 1994, Lancet 349 (1997) 181-182.

[18] E.M. Leroy, S. Souquière, P. Rouquet, D. Drevet, Re-emergence of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, Lancet 359 (2002) 712.

[19] E.M. Leroy, P. Rouquet, P. Formenty, S. Souquière, A. Kilbourne, J.-M. Froment, M. Bermejo, S. Smit, W. Karesh, R. Swanepoel, S.R. Zaki, P.E. Rollin, Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife, Science 303 (2004) 387-390.

[20] P. Formenty, F. Libama, A. Epelboin, Y. Allarangar, E.M. Leroy, H. Moudzeo, P. Tarangonia, A. Molamou, M. Lenzi, K. Ait-Ikhlef, B. Hewlett, C. Rott, T. Grein, L'épidémie de fièvre hemorragique à virus Ebola en République du Congo, 2003: une nouvelle stratégie? Med. Trop. 63 (2003) 291-295.

[21] World Health Organization, Ebola haemorrhagic fever—fact sheet revised in May 2004, Wkly. Epidemiol. Rec. 79 (2004) 435-439.

[22] P.D. Walsh, K.A. Abernethy, M. Bermejo, R. Beyers, P. De Wachter, M. Ella Akou, B. Huijbregts, D. Idiata Mambounga, A. Kamdem Toham, A.M. Kealbourn, S.A. Lahm, S. Latour, F. Maisels, C. Mbina, Y. Mihindou, S. Ndong Obiang, E. Ntsame Effa, M.P. Starkey, P. Telfer, M. Thibault, C.E.G. Tutin, L.J.T. White, D.S. Wilkie, Catastrophic ape decline in western equatorial Africa, Nature 422 (2003) 611-614.

[23] B. Huijbregt, P. De Wachter, S. Ndong Obiang, M. Akou Ella, Ebola and the decline of gorilla *Gorilla gorilla* and chimpanzee *Pan troglodytes* populations in Minkebe forest, north-eastern Gabon, Oryx 37 (2003) 437-443.

[24] World Health Organization, Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, august 2000—January 2001, Wkly. Epidemiol. Rec. 76 (2001) 41-48.

[25] World Health Organization, Ebola haemorrhagic fever in south Sudan—update, Wkly. Epidemiol. Rec. 79 (2004) 253.

[26] G.A. Martini, Marburg agent disease in man, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 63 (1969) 295-302.

[27] C.E.G. Smith, D.I.H. Simpson, E.T.W. Bowen, Fatal human disease from vervet monkeys, Lancet II (1967) 1119-1121.

[28] D.H. Smith, M. Isaacson, K.M. Johnson, A. Bagshawe, B.K. Johnson, R. Swanapoel, M. Killey, T. Siongok, W. Koinange Keruga, Marburg-virus disease in Kenya, Lancet I (1982) 816-820.

[29] B. Johnson, in: Communication personnelle, 1996.

[30] E. Mühlberger, A. Sanchez, A. Randolf, C. Will, M.P. Kiley, H.-D. Klenk, H. Feldmann, The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdovirures, Virology 187 (1992) 534-547.

[31] A. Sanchez, M.P. Killey, H.-D. Klenk, H. Feldmann, Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses, J. Gen. Virol. 73 (1992) 347-357.

[32] J.S. Mackenzie, H.E. Field, Emerging encephalitogenic viruses: lyssaviruses and henipaviruses transmitted by frugivorous bats, Arch. Virol. Suppl. 18 (2004) 97-111.

[33] R.V. Gibbons, R.C. Holman, S.R. Mosberg, C.E. Rupprecht, Knowledge of bat rabies and human exposure among United States cavers, Emerg. Infect. Dis. 8 (2002) 532-534.

[34] M. Favi, C.A. de Mattos, V. Yung, E. Chala, L.R. Lopez, C.C. de Mattos, First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant, Emerg. Infect. Dis. 8 (2002) 79-81.

[35] M.J. Turell, D.S. Bressler, C.A. Rossi, Lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus, Am. J. Trop. Med. Hyg. 55 (1996) 89-90.

[36] R. Swanepoel, P.A. Leman, F.J. Burt, Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus, Emerg. Infect. Dis. 2 (1996) 321-325.

[37] C. Kunz, H. Hofmann, H. Aspöck, Propagation of "Marburg-virus" (vervet monket disease agent) in Aedes aegypti, Zentralbl. Bakteriol. Parasitol. Orig. 208 (1968) 347-349.

[38] P. Rouquet, J.-M. Froment, M. Bermejo, A. Kilbourne, W. Karesh, P. Reed, B. Kumulungui, P. Yaba, A. Délicat, P.E. Rollin, E.M. Leroy, Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003, Emerg. Infect. Dis. 11 (2005) 283-290.

[39] E.T. Bowen, G.S. Platt, G. Lloyd, R.T. Raymond, D.I. Simpson, A comparative study of strains of Ebola virus isolated from southern Sudan and northern Zaire in 1976, J. Med. Virol. 6 (1980) 129-138.

[40] P.B. Jahrling, T.W. Geisbert, N.K. Jaax, M.A. Hanes, T.G. Ksiazek, C.J. Peters, Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 US epizootic, Arch. Virol. 11 (1996) 115-134.

[41] S.P. Fisher-Hoch, T.L. Brammer, S.G. Trappier, L.C. Hutwagner, B.B. Farrar, S.L. Ruo, B.G. Brown, L.M. Hermann, G.I. Perez-Oronoz, C.S. Goldsmith, M.A. Hanes, J.B. McCormick, Pathogenic potential of filoviruses: role of geographic origin of primate host and virus strain, J. Infect. Dis. 166 (1992) 753-763.

[42] E.M. Leroy, P. Telfer, B. Kumulungui, P. Yaba, P. Rouquet, P. Roques, P. Gonzalez, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, E. Nerrienet, A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates, J. Incfect. Dis. 190 (2004) 1895-1899.

[43] P. Formenty, C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, B. Le Guenno, Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire, J. Infect. Dis. 179 (Suppl. 1) (1999) S120-S126.

[44] E.M. Leroy, S. Baize, J. Lansoud-Soukate, E. Mavoungo, C. Apetrei, Sequence analysis of GP, NP, VP40 and VP24 genes of Ebola virus from deceased, survival and asymptomatic infected individuals during 1996 outbreak in Gabon. Comparative studies and phylogenetic characterization, J. Gen. Virol. 83 (2002) 67-73.

[45] L.L. Rodriguez, A. De Roo, Y. Guimard, S.G. Trappier, A. Sanchez, D. Bressler, A.J. Williams, A.K. Rowe, J. Bertolli, A.S. Khan, T.G. Ksiazek, C.J. Peters, S.T. Nichol, Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995, J. Infect. Dis. 179 (1999) S170-S176.

[46] A.A. Arata, B. Johnson, Approaches towards studies in potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in southern Sudan, in: S.R. Pattyn (Ed.), Ebola Virus Haemorrhagic Fever, Elsevier/Netherland Biomedical, Amsterdam, 1977, pp. 191-202 (1978).

[47] J.G. Breman, K.M. Johnson, G. van der Groen, C.B. Robbins, M.V. Szczeniowski, K. Ruti, et al., A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979-1980, J. Infect. Dis. 179 (1999) S139-S147.

[48] H. Leirs, J.N. Mills, J.W. Krebs, J.E. Childs, D. Akaibe, N. Woolen, G. Ludwig, C.J. Peters, T.G. Ksiazek, Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection, J. Infect. Dis. 179 (1999) S155-S163.

[49] P. Reiter, M. Turell, R. Coleman, B. Miller, G. Maupin, J. Liz, A. Kuehne, J. Barth, J. Geisbert, D. Dohm, J. Glick, J. Pecor, R. Robbins, P. Jahrling, C.J. Peters, T.G. Ksiazek, Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: arthropod studies, J. Infect. Dis. 179 (1999) S148-S154.

[50] P. Formenty, P. Jahrling, C. Rossi, H. Artsob, R. Swanepoel, B. LeGuenno, K. Steele, N. Woolen, M. Gartshore, C. Boesch, C. Noé, P. Barriere, O. Perpete, N. Jaax, A. Kuhene, C. Akoua-Koffi, M. Colyn, Search for the Ebola virus reservoir in Taï forest, Cote d'Ivoire: 1996-1997, preliminary results, in: XIth International Congress of Vitrology, Sydney, Australia, 1999.

[51] J.M. Morvan, V. Deubel, P. Gounon, E. Nakoune, P. Barriere, S. Murri, O. Perpete, B. Selekon, D. Coudrier, A. Gautier-Hion, M. Colyn, V. Volchkov, Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic, Microbes Infect. 1 (1999) 1193-1201.

[52] B. Amengual, J.E. Whitby, A. King, J.S. Cobo, H. Bourhy, Evolution of European bat lyssaviruses, J. Gen. Virol. 78 (Pt. 9) (1997) 2319-2328.

[53] K. Halpin, P.L.Young, H.E. Field, J.S. Mackenzie, Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus, J. Gen. Virol. 81 (2000) 1927-1932.

[54] M.Y. Johara, H.E. Field, A.M. Rashdi, C. Morissy, B. van der Heide, P. Rota, A.B. Adzhar, J. White, P. Daniels, A. Jamaluddin, T.G. Ksiazek, Nipah virus infection in bats (order chiroptera) in peninsular Malaysia, Emerg. Infect. Dis. 7 (2001) 439-441.

Isolates of Zaire ebolavirus from wild apes reveal genetic lineage and recombinants

Tatiana J. Wittmann[†], Roman Biek[‡], Alexandre Hassanin[§], Pierre Rouquet[†], Patricia Reed[¶], Philippe Yaba[†], Xavier Pourrut[†], Leslie A. Real[‡], Jean-Paul Gonzalez[†‡‡], and Eric M. Leroy[†§§]

[†]Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon; [‡]Department of Biology and Center for Disease Ecology, Emory University, 1510 Clifton Road, Atlanta, GA 30322; [§]Museum National d'Histoire Naturelle/Centre National de la Recherche Scientifique, Unite Mixte de Recherche 5202, 75005 Paris, France; [¶]Wildlife Conservation Society, 2300 Southern Boulevard, Bronx, NY 10460; Institut de Recherches pour le Développement, UR178, Centre International de Recherches Medîcales de Franceville, BP 769 Franceville, Gabon; and [††]Institut de Recherche pour le Développement, UR178, Mahidol University at Salaya, Phutthamonthon 4, Nakhonpathom 73170, Thailand

Edited by Rita R. Colwell, University of Maryland, College Park, MD, and approved August 30, 2007 (received for review May 2, 2007)

Over the last 30 years, Zaire ebolavirus (ZEBOV), a virus highly pathogenic for humans and wild apes, has emerged repeatedly in Central Africa. Thus far, only a few virus isolates have been characterized genetically, all belonging to a single genetic lineage and originating exclusively from infected human patients. Here, we describe the first ZEBOV sequences isolates from great ape carcasses in the Gabon/Congo region that belong to a previously unrecognized genetic lineage. According to our estimates, this lineage, which we also encountered in the two most recent human outbreaks in the Republic of the Congo in 2003 and 2005, diverged from the previously known viruses around the time of the first documented human outbreak in 1976. These results suggest that virus spillover from the reservoir has occurred more than once, as predicted by the multiple emergence hypothesis. However, the young age of both ZEBOV lineages and the spatial and temporal sequence of outbreaks remain at odds with the idea that the virus simply emerged from a long-established and widespread reservoir population. Based on data from two ZEBOV genes, we also demonstrate, within the family *Filoviridae*, recombination between the two lineages. According to our estimates, this event took place between 1996 and 2001 and gave rise to a group of recombinant viruses that were responsible for a series of outbreaks in 2001-2003. The potential for recombination adds an additional level of complexity to unraveling and potentially controlling the emergence of ZEBOV in humans and wildlife species.

Phylogeny emergence *Filoviridae* nucleoprotein glycoprotein

Among the recognized souches of *ebolavirus* (family *Filoviridae*), the Zaire ebolavirus (ZEBOV) is the most virulent, causing acute hemorrhagic fever that can lead to death in a matter of days, with case fatality rates ≤88%. Only 10 recognized ZEBOV outbreaks among humans have occurred to date, and all of these took place in west-central Africa during three distinct periods: 1976-1977, 1994-1997, and 2001-2005 (1). Outbreaks have been shown to coincide with significant mortality among wildlife in surrounding areas (2, 3), and it is thought that people first acquire infection through the handling of infected animal carcarsses (1, 4, 5). Ecological survey data indicate that the detrimental effects of ZEBOV infection in wildlife populations, mainly chimpanzees and gorillas, over the last two decades have been much more dramatic and widespread than the frequency and geographic scale of human outbreaks alone would suggest (2, 6-8).

Despite numerous studies of human and animal infection, attempts to reconstruct the history and evolution of ZEBOV have been hindered by the small number of isolates available. Only 12 glycopropein (*GP*) gene sequences have been published to date, and all correspond to human isolates recovered between 1976 and 2002. Phylogenetic analysis shows that these sequences belong to a single lineage with time-dependent evolutionary changes. This tree topology, combines with the temporal-spatial pattern of ZEBOV emergence over the last two decades, led some authors to suggest that outbreaks are epidemiologically linked and occur at the front of an advancing wave that emerged *ca.* 1976 in the Democratic Republic of the Congo (9). However, the identification of multiple strains during the 2001 Gabon/Republic of the Congo (RC) outbreak led other authors to deduce that ZEBOV repeatedly and independently spilled over from the reservoir species (most likely bats) (10) into wildlife and human populations (3). In this multiemergence hypothesis, Ebola outbreaks would occur episodically in certain ecological conditions caused by habitat disturbances or climatic phenomena (11, 12). Further implicit is the idea that ZEBOV was present in the affected area of Central Africa long before the first documented outbreak in 1976.

Given the constant risk of new human outbreaks and the disastrous consequences that outbreaks mean for endangered great ape populations, there is an urgent need to test the competing models of ZEBOV emergence against more data to develop better predictions and potential control strategies. Arguably the most important piece of information missing in our understanting of ZEBOV epidemiology and evolution is a characterization of the viral strains circulating among susceptible wildlife species. Based on a unique data set collected during a 5-year period, we describe the first isolates of ZEBOV from great ape carcasses in the Gabon/RC region, as well as two recent human outbreaks. We also provide additional sequence data from previous outbreaks. Together these data permit a critical reevaluation of the existing models of ZEBOV emergence nd shed new light on the evolutionary dynamics of the virus.

Results

Between 2001 and 2006, we discovered 47 dead animals, of which 23 were great apes (18 gorillas, 5 chimpanzees), in the Gabon/RC

Author contributions: E.M.L. designed research; T.J.W., P. Rouquet, P. Reed, P.Y., X.P., and E.M.L. performed research; P. Rouquet, P. Reed, X.P., and E.M.L. contributed new reagents/analytic tools; T.J.W., R.B., A.H., L.A.R., J.-P.G., and E.M.L. analyzed data; and T.J.W., R.B., and E.M.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: CP, codon position; ML, maximum likelihood; RC, Republic of the Congo; ZEBOV, Zaire ebolavirus.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database [accession nos. EU051634 and EU051647 (Etoumbi may05), EU051635 ad EU051648 (Mbandza nov03), EU051630 and EU051649 (GOR1_Lossi_dec02), EU051631 (GOR2_Lossi_dec02), EU051632 (GOR_Ekata_nov01), EU051633 (CH_Lossi_feb03), EU051636 (GOR_Mbandza_jun03), EU051637 (GOR1_odz_june05), EU051638 and EU051650 (GOR_odz_jun05), EU51639 (Mayibout 96), EU05164 (Mendemba A oct01), EU051641 (Mendemba B oct01) EU051642 (Etakangaye dec01), EU051643 (Olloba dec01), EU051645 (Mvoula jan03), EU051644 (Entsiami jan03), and EU051646 (Yembelengoye jan03)].

[‡‡]Present address: Division of Environmental and Evolutionary Biology, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, United Kingdom.

[§§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: eric.leroy@ird.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0704076104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

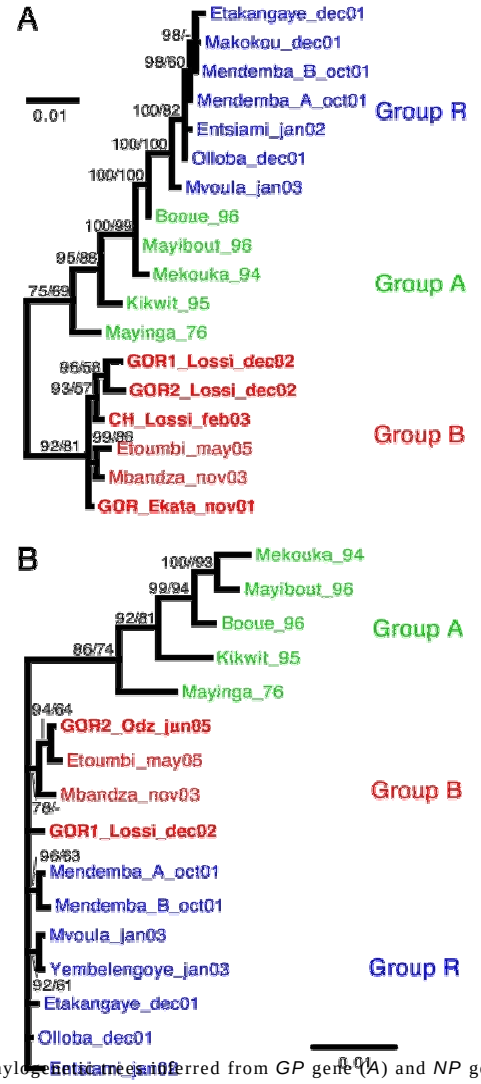


Fig. 1. Phylogenies inferred from *GP* gene (*A*) and *NP* gene (*B*) sequences that show relationships among all of the ZEBOV isolates. Viruses derived from wild ape carcasses are shown in bold. Values above branches represent Bayesian posterior probabilities and ML bootstrap scores (both at percentages). Colors identify three genetic groups of ZEBOV: green, group A; red, group B; blue, recombinant group R.

region [supporting information (SI) Table 2]. Using a combination of diagnostic tests, we confirmed infection with ZEBOV for 13 gorillas, 3 chimpanzees, and 1 duiker. Because of the advanced decomposition of several carcasses, we only succeeded in amplifying and sequencing full-length *GP* gene sequences [2,031 nucleotides (nt)] from three gorillas and one chimpanzee, but shorter *GP* sequences (538 nt) could be obtained from another three gorillas. Phylogenetic analysis of the full *GP* revealed that these ape-derived sequences represent a new, distinct ZEBOV lineage (group B) that is 2-3% divergent from the lineage containing all *GP* sequences described to date (groups A and R) (Fig. 1*A*). Analysis of the partial *GP* data set containing the additional three sequences from gorillas confirmed this result (SI Fig. 4). In addition to the virus from ape carcasses, *GP* sequences generated from the two most recent human outbreaks in Mbandza (2003) and Etoumbi (2005) in RC also fell into the new group B (Fig. 1 *A*).

Three full *GP* sequences that originated from ape carcasses located in the Lossi sanctuary in RC (GOR1 Lossi dec02, GOR2 Lossi dec02, and CH Lossi feb03) grouped together in the phylogeny, with the two sequences from gorillas clustering most closely (Fig. 1 *A*). In December 2002, two gorilla carcasses were found together, a few meters from each other and in the same state of decomposition, indicating that they were infected and dead around the same time. They probably belonged to the same group because a single group of gorillas was known to inhabit this part of the sanctuary. Despite this finding, *GP* sequences from these carcasses differed substantially at both the nucleotide and amino acid levels (11 nt and 5 aa differences) (SI Table 3), suggesting that they had not been infected by the same source.

We also obtained partial sequence data (1,448 nt) from the nucleoprotein (*NP*) gene from all human outbreaks since 2001, including two most recent ones in Mbandza and Etoumbi, as well as from two gorilla carcasses discovered in the Lossi and Odzala sanctuaries. Consistent with results for *GP*, sequences from apes and the two recent human outbreaks clustered together (group B) and were genetically distinct from viruses found in the 1976-1997 outbreaks (group A) (Fig. 2*B*). Similar to *GP*, both groups were ≈2% divergent. However, the phylogenetic position of viruses detected in October 2001 to January 2003 differed markedly for the two tree topologies: Whereas for *GP*, these viruses fell into group A and represented direct descendents of viruses seen during previous outbreaks (Fig. 1*A*), their *NP* sequences clustered in a more basal position in the tree together with group B viruses, from which they were not genetically distinct (Fig. 1). This result was highly suggestive of a recombination event between group A and group B viruses, which both occupied stable positions in the *GP* and *NP* trees. To further examine the evidence for recombination, we statistically evaluated the observed level of incongruence between the two tree topologies. Shimodaira-Hasegawa tests identified the *GP* and *NP* topologies as significantly incongruent regardless of how the comparison was made (in all cases, P 0.001) (see *Materials and Methods*).

A molecular clock-based analysis estimated that the root of all ZEBOV sequences just barely predated the first observed outbreak in 1976. Estimates based on *GP* sequences placed this most recent common ancestor at 1975 (highest posterior density interval: 1972-1976), whereas *NP* data produced a similar point

Table 1. Estimates ages of critical nodes, representing the most recent common ancestors for certain groups of sequences, in the ZEBOV phylogenies (see Fig. 1)

	Glycoprotein (*GP*)			Nucleoprotein (*NP*)		
MRCA	Date	Upper	Lower	Date	Upper	Lower
Groups A and B	Sep. 1995	May 1972	Sep. 1976	Nov. 1971	March 1955	Aug. 1976
Group B	Jan. 2000	March 1998	April 2001	Dec. 1998	April 1995	Dec. 2000
Group R	Sep. 1999	May 1998	Oct. 2000		Same as group B	
Lossi gorillas	July 2001	March 2000	April 2002	ND	ND	ND

Dates were estimated for two viral genes using a Bayesian molecular clock-based approach. MRCA, most recent common ancestor; Date, median date associated with the MRCA; Upper/Lower, upper/lower 95% highest posterior density interval; ND, no data.

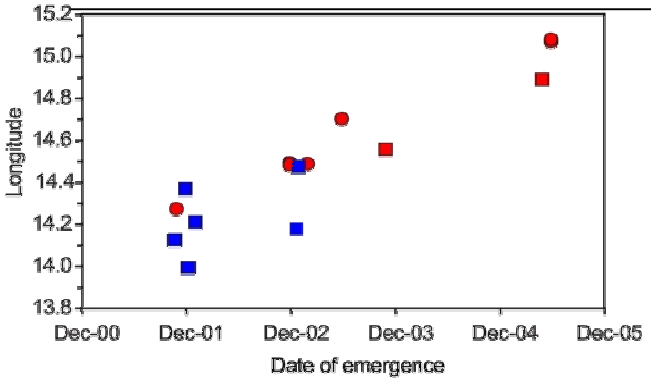


Fig. 2. Timing and longitudinal location of all ZEBOV outbreaks from 2001 onward that were included in the phylogenetic analysis. Blue and red symbols indicate outbreaks caused by group B and group R viruses, respectively. Squares, human outbreaks; circles, ape carcasses.

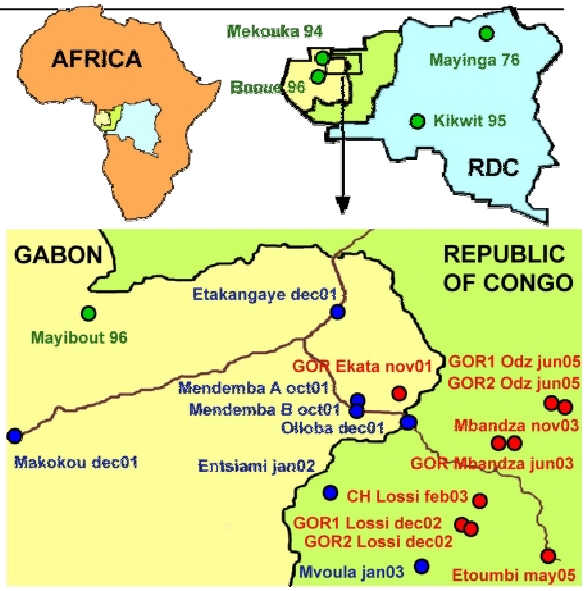


Fig. 3. Location of sources of all ZEBOV isolates genetically identified in humans and great apes from the first 1976 outbreak to the present. The source (GOR, gorilla; CH, chimpanzee), location, and month of sampling are specified. Colors relect virus groups (Fig. 1).

estimate of 1971, but with a wider internal (1955-1976). Ancestors of groups B and R, as well as those of the viruses from two Lossi gorillas, were estimated to be of an even younger age (Table 1).

Plotting the month of emergence for all ZEBOV isolates since 2001 included in the genetic analysis against their longitudinal distribution revealed a positive relationship, consistent with outbreaks spreading east at a fairly regular rate, regardless of the genetic type of virus involved (R^2=0.859, P 0.001) (Fig. 2).

Discussion

Up to now, our understanding of ZEBOV epidemiology and evolution has been exclusively based on molecular data from human infections and largely involved only a single vital gene (*GP*). By presenting new genetic data from infected ape carcasses and recent human outbreaks for the *GP* and *NP* genes, we are able to provide a more complete, but also more complex, picture of the history and conditions of ZEBOV emergence in central Africa.

The existence of additional ZEBOV lineages in the African rainforests, other than those known from previous human outbreaks, has been suspected for some time. Although IgG prevalence rates in some great ape (5) and human populations with no history of hemorrhagic fever (2, 13) suggested the presence of apathogenic lineages, our data demonstrate the existence of another ZEBOV lineage capable of causing significant mortality in human and wildlife populations. Spatially, this new genetic group has so far only been found in a small area that shows almost no overlap with other groups, but that is situated immediately to the east of the area affected by the group R viruses a few years earlier (Fig. 3). In fact, ignoring the molecular data and considering solely the temporal and spatial sequence of outbreaks between 2001 and 2005, the pattern appears highly consistent with ZEBOV continuously spreading eastward (Fig. 2). However, our new genetic data reveal that the more recent outbreaks are not caused by genetic descendents of previously emerging viruses, as seen in previous data, but instead involve a genetically different type of ZEBOV. Thus, because outbreaks do not appear to be epidemiologically linked in a consistent fashion, these findings challenge the notion of ZEBOV emergence in recent years being driven by a single viral lineage spreading through the affected area of Gabon/RC (9).

A key aspect of ZEBOV epidemiology that is still poorly understood is the role and extent of animal-animal transmission along susceptible species like gorillas and chimpanzees (8). Recent data from habituated gorillas in the Lossi sanctuary that experienced mass mortality due to ZEBOV strongly suggest efficient transmission within family groups, as well as repeated spread to neighboring groups (6). If these gorillas indeed acquired infection predominantly from contact with infected conspecifics, diseased individuals from one group or locality would be expected to harbor highly related viruses. For example, several studies have found no genetic changes during chains of transmission involving human-human passage of ebolavirus for several weeks or months (14, 15). In contrast, we found that the two gorillas from Lossi, which were found next to each other in December 2002 and were likely infected and died around the same time, yielded viruses for which *GP* gene sequences differed at 11 sites (SI Table 3). Our molecular clock-based analysis indicates that this level of divergence implies independent evolution for a minimum of 8 months (Table 1). Thus, it seems most likely that the two gorillas became infected from different sources. Both sequences tightly grouped with each other and with a third Lossi sequence from a chimpanzee, still suggesting that all three animals were infected by the same local ZEBOV variant (Fig. 1 *A*). Whether divergence among sequences reflects variability of a local virus in its reservoir or whether these changes accumulated during prolonged animal-animal transmission remains unresolved.

Results discussed so far point to a multiple independent emergence of ZEBOV in the Gabon/RC border area over the last decade. However, in line with previous studies (9, 16), we also continued to find low divergence among viral sequences, implying a recent common evolutionary origin for all ZEBOV lineages discovered so far. Despite the new group B viruses being clearly distinct from the longer known group A viruses, the two lineages are estimated to have split only in the early 1970s and thus just before the first recognized outbreak of ZEBOV in 1976, which was in the Democratic Republic of the Congo, 2,000 km from the Gabon/RC region. Similarly, the common ancestor of all group B viruses is estimated to date back to further than 1998 (Table 1). These dates are clearly at odds with the virus being a long-term resident in the affected area while being maintained by a widespread reservoir, mostly likely some fruit bat species: *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franquetti*, and *Myonycteris torquata* (1, 10).

Furthermore, it remains suspicious that groups A and B viruses emerged in such direct temporal and spatial succession and then the distribution of outbreaks from either type exhibited the same pattern consistent with eastward spread (Fig. 2). This finding suggests the existence of some underlying ecological factor that connects all outbreaks regardless of the genetic type of virus involved. Movement and contact processes among animals involving either reservoir or susceptible species, or both, may by potential mechanisms for this (8, 9).

Our comparative phylogenetic analysis of two viral genes produced a strong indication that a recombination event has occurred in the recent evolutionary history of ZEBOV (Fig. 1). All *GP* sequences from the putative recombinants are estimated to have shared a common ancestor in 1999 (Table 1), suggesting that a single incident gave rise to the recombinant lineage around this time. Where this event took place, in terms of both the geographic context and the post species, and how recombination affected viral fitness cannot be discerned at this point. However, it is interesting to note that all of the recombinant *GP* sequences contained a stop codon in amino acid position 481, which would be predicted to result in a 29% shorter translated protein product. Despite a truncated *GP*, the virus obviously remained viable, because members of this group were involved in a series of outbreaks. In future research, we hope to address the potential fitness benefits (or costs) of recombination in ZEBOV, as well as to describe the molecular mechanisms underlying it. Our finding represents the first evidence of a recombination event within the *Filoviridae* family (Ebola and Marburg viruses) and one of only a few examples of such an event in negative-strand RNA viruses (17). This result has important implications for vaccine development (18, 19) because it raised the possibility of recombination between a live attenuated vaccine strain and wild-type strains, a scenario that could have grave public health repercussions.

In conclusion, our results demonstrate that ZEBOV was likely introduced into susceptible wildlife and human populations repeatedly in the last 30 years, as evidenced by the emergence of different genetic lineages. What remains unclear as how often such introductions have occurred and to what extent transmission among susceptible animal hosts, such as great apes, may have subsequently contributed to the spatial propagation of outbreaks. Similarly, it remains to be resolved whether the temporal-spatial patterns of ZEBOV emergence, which are in many ways suggestive of a spreading process, could be the result of transmission processes in the reservoir species or whether other factors could have generated such patterns. In addition, our study reveals an unanticipated role of recombination in ZEBOV evolution. Besides raising a number of important questions about the biology of the virus, recombination is likely to further complicate efforts to understand the history of ZEBOV emergence by using molecular epidemiological approaches.

Materials and Methods

Investigations of Animal Mortality. Animal carcasses were found by ourselves and/or local villagers in the forested areas of northeastern Gabon and northwestern RC (Gabon/RC) during human Ebola outbreaks occurring between 2001 and 2005. Dead animals were rarely seen in the forest owing to their rapid decomposition and the small number of nonpredatory deaths. Over he 5-year study period, we found and tested 47 animal carcasses in the Gabon/RC human outbreak region. Necropsy specimens (skin, muscle, liver, or bone) were either placed in cryovials and immediately frozen in dry nitrogen or placed at room temperature in vials containing RNA Later solution (Qiagen, Valencia, CA). Laboratory tests were performed at the Centre International de Recherches Me´dicales de Franceville, Gabon. Tissues were tested for ZEBOV in the high-level security laboratory at the Centre International de Recherches Me´dicales de Franceville, using RT-PCR and antigen capture assays as described in ref. 5.

Investigations of Human Outbreaks. The two most recent ZEBOV outbreaks occurred in RC (20). One originated in Mbandza and was associated with 35 human cases (29 deaths) between October and December 2003, and the other originated in Etoumbi, where 12 human cases (9 deaths) were reported between April and June 2005 (Fig. 3). Blood samples from acutely ill patients from Mbandza (n=10) and Etoumbi (n=1) were collected on EDTA with the patients' oral informed consent, adhering to World Health Organization guidelines on viral hemorrhagic fever agents in Africa.

Reverse Transcription, DNA implicication, and Nucleotide Sequencing. Samples of animal carcasses wer fragmented and homogenized in the lysis buffer supplied with the RNeasy kit (Qiagen). Total RNA was extracted from the final supernatant with the RNeasy kit. For human samples, total RNA was extracted from plasma with the QIAamp viral RNA kit (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized and then submitted to amplification with the primers and conditions described below. The amplicons were sequenced by GeneCust (Evry, France).

We attempted to amplify fragments of the ORF of the *GP* and *NP* genes from all human and animal samples, using nested PCR. For long *GP* fragments (2,031 nt), the first round (55°C) was amplified with sense primer 5'-GTGAGCGTAATCTTCATCTC-3' and antisense primer 5'-TTGTTCAACTTGAGTTGCCT-3', and the second round (55°C) was amplified with sense primer 5'-CAAGGAAGGGAAGCTGCAG-3' and antisense primer 5'-GAATCACATTGGCTATGTTT-3'. For short *GP* fragments (538 nt), the first round (54°C) was amplified with sense primer 5'-GAAGGTGTCGTKGCATTTCTGAT-3' and antisense primer 5'-CCTTGAYTGTGCACTTGAACCA-3', and the second round (60°C) was amplified with sense primer 5'-TGAGAGAGCCGGTCAATGCAAC-3' and antisense primer 5'-GAGGAATTTTCTGAAGCCATG-3'. The *NP* gene from human and animal samples was amplified in two fragments: first (55°C) by using sense primer 5'-TTTGCAAGTCTATTCCTTCCG-3' and antisense primer 5'-CCGTTTTCCGAGTAACTCT-3' and second (55°C) by using sense primer 5'-GATCCGACTGACTCACAGGATA-3' and antisense primer 5'-GGCTCATCCTTCATCATATGAT-3'.

Phylogenetic Analyses. Data sets used for the analyses included 21 sequences of the complete *GP* gene (2,031 nt), 24 sequences of partial *GP* (538 nt), and 18 sequences of the partial *NP* gene (1,448 nt). All previously published ebolavirus sequences were included in the analyses, and ebolavirus-Reston, -Sudan, and -Ivory Coast were included as outgroups to root the ZEBOV trees. For *NP*, sequences were translated and aligned at the amino acid level by using the ClustalW algorithm implemented in the MegAlign program (Lasergene software; DNASTAR, Madison, WI) before converting data bank to nucleotides. The same approach introduced no gaps in the *NP* alignment.

Phylogenetic relationships were determined by using Bayesian and maximum likelihood (ML) methods. Adequate substitution models were selected based on Akaike's information criterion from a broad suite of evolutionary models (21, 22), using BASEML in PAML (23) and PAUP* 4.0b10 (24). The best model for both genes was a codon position (CP) model (22), which distinguished two partitions, the first of which grouped all sites in the first and second CP and the second of which contained all sites in the third CP. Each partition also had its own transition/transversion ratios, base frequencies, γ-rate distributions, and relative rates. This model was implimented in all analyses if possible. However, CP models are currently not

supported by programs that use ML to estimate phylogenies. Therefore, all ML analyses were carried out by using the next best non-CP model.

Bayesian analyses were conducted with MrBayes software, Version 3.1 (25), using two independent Markov Chain Monte Carlo runs with 10 million generations each, sampling trees every 1,000 generations and with a burn-in of 1,000 trees. A final standard deviation of 0.01 for the split frequency was taken as an indication that convergence had been achieved. ML analyses were carried out with PAUP* by using a heuristic search algorithm. Bootstrap proportions were obtained from 1,000 replicates.

We performed two types of analysis in PAUP* to elimine whether the data provided evidence for recombination among different ZEBOV lineages. First, we tested whether the tree topologies for *GP* and *NP* were different when considering only outbreaks that are common to both trees. Unrooted ML trees of all ZEBOV sequences (i.e., excluding the outgroup) were found for each of the two genes, and isolates represented in just one of the data sets were pruned from the tree, resulting in both trees containing sequences from the same set of 14 isolates. Trees were then compared by using the Shimodaira-Hasegawa test. Second, we formulated topological constraints based on the relative position of the three groups (A, B, and R) in the phylogenies. In the *GP* tree, for example, group R formed a clade that was nested with a larger clade together with group A (Fig. 1 *A*). Enforcing this topological constraint while heuristically searching for the ML tree for *NP* produced a tree that could subsequently be compared with the original ML tree with a Shimodaira-Hasegawa test. In the *NP* tree, group A formed a clade (Fig. 1*B*), providing the corresponding topological constraint for the analysis of *GP*.

The age of the split between the two ZEBOV lineages and other tree nodes was estimated with BEAST software, Version 1.4 (26), using only ZEBOV sequences and their dates of isolation. Implementing the aforementioned CP model, the analysis in BEAST was run under a constant population size coalescent model for 11 million states, of which the first 1 million were removed as burn-in. Estimating parameters under an exponential growth model produced virtually identical results (data not shown).

The partial *GP* and *NP* sequences obtained in this study are listed in *SI Materials and Methods*.

We thank all those involved in the field collections, D. Young for help in preparing the manuscript, T. G. Ksiazek and P. Rollin (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) for generously providing reagents, and W. Karesh (Wildlife Conservation Society) for his continuous support. This work was supported by the government of Gabon, Total-Fina-Elf Gabon, the Ministère de la Coopération Française, and Ministères des Affaires Etrangères et de la France (Fonds de Solidarité Prioritaire Grant 2002005700).

1. Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, Moussavou G, Délicat A, Yaba P, Nkoghe D, Gonzalez JP, Leroy EM (2005) *Microbes Infect* 7:1005-1014.
2. Lahm SA, Kombila M, Swanepoel R, Barnes RF (2007) *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:64-68.
3. Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment J-M, Bermejo M, Smit S, Karesh W, Swanepoel R, *et al.* (2004) *Science* 303:387-390.
4. Rouquet P, Froment JM, Bermejo M, Kilbourn A, Karesh W, Reed P, Kumulungui B, Yaba P, Delicat A, Rollin PE, Leroy EM (2005) *Emerg Infect Dis* 11:283-290.
5. Leroy EM, Telfer P, Kumulungui B, Yaba P, Rouquet P, Roques P, Gonzalez JP, Ksiazek TG, Rollin PE, Nerrienet E (2004) *J Infect Dis* 190:1895-1899.
6. Bermejo M, Rodriguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vila C, Walsh PD (2006) *Science* 314:1564.
7. Walsh PD, Abernethy KA, Bermejo M, Beyers R, De Wachter P, Ella Akou M, Huijbregts B, Idiata Mambounga D, Kamdem Toham A, Kealbourn AM, *et al.* (2003) *Nature* 422:611-614.
8. Caillaud D, Levrero F, Cristescu R, Gatti S, Dewas M, Douadi M, Gautier-Hion A, Raymond M, Menard N (2006) *Curr Biol* 16:R489-R4891.
9. Walsh PD, Biek R, Real LA (2005) *PLoS Biol* 3:1-8.
10. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R (2005) *Nature* 438:575-577.
11. Peterson AT, Bauer JT, Mills JN (2004) *Emerg Infect Dis* 10:40-47.
12. Pinzon JE, Wilson JM, Tucker CJ, Arthur R, Jahrling PB, Formenty P (2004) *Am J Trop Med Hyg* 71:664-674.
13. Gonzalez JP, Herbreteau V, Morvan J, Leroy EM (2005) *Bull Soc Pathol Exot* 98:210-217.
14. Leroy EM, Baize S, Lansoud-Soukate J, Mavoungou E, Apetrei C (2002) *J Gen Virol* 83:67-73.
15. Rodriguez LL, de Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A, Bressler D, Williams AJ, Rowe AK, Bartolli J, Khan AS, *et al.* (1999) *J Infect Dis* 179:S170-S176.
16. Biek R, Walsh PD, Leroy EM, Real LA (2006) *PLoS Pathog* 2:885-886.
17. Chare ER, Gould EA, Holmes EC (2003) *J Gen Virol* 84:2691-2703.
18. Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, Klenk HD, Sullivan NJ, Volchkov VE, Fritz EA, *et al.* (2005) *Nat Med* 11:786-790.
19. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Xu L, Yang Z-Y, Roederer M, Koup RA, Jahrling PB, Nabel GJ (2003) *Nature* 424:681-684.
20. Formenty P, Leroy EM, Epelboin A, Libama F, Lenzi M, Sudeck H, Yaba P, Allarangar Y, Boumandouki P, Nkounkou VB, *et al.* (2006) *Clin Infect Dis* 42:1521-1526.
21. Posada D, Crandall KA (1998) *Bioinformatics* 14:817-818.
22. Shapiro B, Rambaut A, Drummond AJ (2006) *Mol Biol Evol* 23:7-9.
23. Yang Z (1997) *Comput Appl Biosci* 13:555-556.
24. Swofford DL (2003) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (Sinauer Associates, Sunderland, MA), Version 4.0b10.
25. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) *Bioinformatics* 19:1572-1574.
26. Drummond AJ, Rambaut A (2006) *BEAST*, Version 1.4. Available at www.beast.bio.edu.ac.uk.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 Jahrling P.B. Geisbert T.W., Dalgard D.W., Johnson E.D., Ksiazek T.G., Hall W.C., Peters C.J.: Preliminary Report : Isolation of Ebola Virus from Monkeys Imported to USA. *Lancet*, 1990; **335**(3):502-5

2 Hayes C.G. Burans J.P., Ksiazek T.G., Del Rosario R.A., Miranda M.E., Manaloto C.R., Barrientos A.B., Robles C.G., Dayrit M.M., Peters C.J.: Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992; **46**(664-71

3 Miranda M.E. White M.E., Dayrit M.M., Hayes C.G., Ksiazek T.G., Burans J.P.: Seroepidemiological study of filovirus related to Ebola in the Philippines. *Lancet*, 1991; **337**(425-6

4 Organisation World Health: Interim guidelines for handling nonhuman primates during transit and quarantine. *Wkly Epidem Rec*, 1990; **65**(7):45-52

5 Organisation World Health: Viral haemorrhagic fever in imported monkeys. *Wkly Epidem Rec*, 1992; **67**(19):137-44

6 Organisation World Health: Viral haemorrhagic fever in imported monkeys. *Wkly Epidem Rec*, 1992; **67**(24):177-84

7 Rollin P.E. Williams R.J., Bressler D.S., Pearson S., Cottingham M., Pucak G., Sanchez A., Trappier S.G., Peters R.L., Greer P.W., Zaki S., Demarcus T., Hendricks K., Kelley M., Simpson D., Geisbert T.W., Jahrling P.B., Peters C.J., and Ksiazek T.G.: Ebola (Subtype Reston) Virus among Quarantined Nonhuman Primates Recently Imported from the Philippines to the United States. *Journal of Virology*, 1999; **179**(suppl 1):108-14

8 Miranda M.E. Ksiazek T.J., Retuya T.J., Khan A.S., Sanchez A., Fulhorst C.F., Rollin P.E., Calaor A.B., Manalo D.L., Roces M.C., Dayrit M.M., Peters C.J.: Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):115-9

9 Formenty P. Hatz C., Le Guenno B., Stoll A., Rogenmoser P., Widmer A.: Human Infection Due to Ebola Virus, Subtype Co^te d'Ivoire: Clinical and Biologic Presentation. *J. Infect. Dis.*, 1999; **179**(suppl1):S48-S53

10 LeGuenno B. Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C.: Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus. *Lancet*, 1995; **345**(1271-4

11 LeGuenno B. Formenty P., Boesch C.: Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. *Current Topics on Microbiology and Immunology*, 1999; **235**(77-84

12 Formenty P. Boesch C., Wyers M., Steiner C., Donati F., Dind F., Walker F., LeGuenno B.: Ebola virus outbreak among wild chimpanzee living in a rain

forest of Côte d'Ivoire. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):120-6

13 Smith: Ebola Haemorrhagic Fever in Sudan, 1976. *Bull. World Health Organ.* , 1978; **56**(2):247-70

14 Baron R.C. McCormick J.B., Zubeir O.A.: Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull. World Health Organ.* , 1983; **61**(997-1003

15 Organisation World Health: Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, August 2000 - January 2001. *Wkly Epidem Rec*, 2001; **76**(6):41-8

16 Organisation World Health: Ebola haemorrhagic fever in South Sudan - Update. *Wkly Epidem Rec*, 2004; **79**(28):253-64

17 Johnson K.M.: Ebola Haemorrhagic Fever in Zaire, 1976. *Bull. World Health Organ.* , 1978; **56**(2):271-93

18 Emond R.T.D. Evans B., Bowen E.T.W., Lloyd G.: A case of Ebola virus infection. *BMJ*, 1977; **2**(541-4

19 Heymann D.L. Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H.: Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977-1978. *J. Infect. Dis.*, 1980; **142**(3):372-6

20 Muyembe-Tamfum J.J. Kipasa M., Kiyungu C., Colebunders R.: Ebola outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Discovery and control measures. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):259-62

21 Khan A.S. Tshioko F.K., Heymann D.L., LeGuenno B., Nabeth P., Kerstiëns B., Fleerackers Y., Kilmarx P.H., Rodier G.R., Nkuku O., Rollin P.E., Sanchez A., Zaki S.R., Swanepoel R., Tomori O., Nichol S.T., Peters C.J., Muyembe-Tamfum J.J., Ksiazek T.G. for the Commission de Lutte contre les épidémies à Kikwit: The reemergence of Ebola Hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):76-86

22 Georges A.J. Leroy E.M., Renaut A.A., Tevi Benissan C., Nabias R.J., Trinh Ngoc M., Obiang P.I., Lepage J.P.M., Bertherat E.J., Bénoni D.D., Wickings E.J., Amblard J.P., Lansoud-Soukate J.M., Milleliri J.M., Baize S., Georges-Courbot M.C.: Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: Epidemiologic and health control issues. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):65-75

23 Nkoghe D. Nnegue S., Toung Mve M., Formenty P., Thompson G., Iba Ba J., Okome Nkoumou M., Leroy E.: Cas isolé de fièvre hémorragique survenu au Gabon en 2002 pendant l'épidémie d'Ebola mais distant des régions épidémiques. *Med. Trop.*, 2005; **65**(349-54

24 Nkoghe D. Formenty P., Leroy E.M., Nnegue S., Obame Edou S.Y., Iba Ba J., Allarangar Y., Cabore J., Bachy C., Andraghetti R., de Benoist A.C.,

Galanis E., Rose A., Bausch D., Reynolds M., Rollin P., Choueibou C., Shongo R., Gergonne B., Koné L.M., Yada A., Roth C., Mve Toung M.: Plusieurs épidémies de fièvre hémorragique due au virus Ebola au Gabon, d'octobre 2001 à avril 2002. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2005; **98**(3):224-9

25 Leroy E.M. Baize S., Mavoungou E., Apetrei C.: Sequence analysis of the GP, NP, VP40 and VP24 genes of Ebola virus isolated from deceased, surviving and asymptomatically infected individuals during the 1996 outbreak in Gabon: Comparative studies and phylogenetic characterization. *Journal of General Virology*, 2002; **83**(67-73

26 Leroy E.M. Rouquet P. Formenty P., Souquière S., Kilbourne A., Froment J-M, Bermejo M., Smit S., Karesh W., Swanepoel R., Zaki S.R., Rollin P.E.: Multiple ebola virus transmission events and rapid decline of central african wildlife. *Science*, 2004; **303**(16 january 2004):387-90

27 Organisation World Health: Ebola haemorrhagic fever in Republic of Congo - Update. *Wkly Epidem Rec*, 2003; **78**(48):409-16

28 Pourrut X. Kumulungui B., Wittmann T., Moussavou G., Délicat A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J-P., Leroy E.M.: The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes and infection*, 2005; **7**(1005-14

29 Boumandouki P. Formenty P., Epelboin A., Campbell P., Atsangandoko C., Allarangar Y., Leroy E.M., Kone M.L., Molamou A., Dinga-Longa O., Salemo A., Kounkou R.Y., Mombouli V., Ibara J.R., Gaturuku P., Nkunku S., Lucht A., Feldmann H.: Prise en charge des malades et des défunts lors de l'épidémie de fièvre hémorragique due au virus Ebola d'octobre à décembre 2003 au Congo. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2005; **98**(3):218-23

30 Wittmann T.J. Biek R., Hassanin A., Rouquet P., Reed P., Yaba Ph., Pourrut X., Real L., Gonzalez J-P., Leroy E.M.: First isolates of zaire ebolavirus from wild apes reveal new genetic lineage and recombinants. *PNAS*, 2007; **(sous presse)**(

31 Walsh P.D. Abernethy K.A., Bermejo M., Beyers R., De Watcher P., Ella Akou M., Huijbregts B., Mambounga D.I., Kamdem Toham A., Kilbourn A.M., Lahm S.A., Latour S., Maisels F., Mbina C., Mihindou Y., Ndong Obiang S., Ntsame Effa E., Starkey M.P., Telfer P., Thibault M., Tutin C.E.G., White L.J.T., and Wilkie D.S.: Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature*, 2003; **422**(611-3

32 Rouquet P. Froment J-M., Bermejo M., Kilbourne A., Karesh W., Reed P., Kumulungui B., Yaba P., Delicat A., Rollin P.E., Leroy E.M.: Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; **11**(2):283-90

33 Bermejo M. Rodriguez-Teijeiro J.D., Ilera G., Barroso A., Vila C., Walsh P.D.: Ebola outbreak killed 5000 gorillas. *Science*, 2006; **314**(5805):1564

34 Peterson A.T. Bauer J.T., Mills J.N.: Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. *Emerging Infectious Diseases*, 2004; **10**(1):40-7

35 Monath T.P.: Ecology of Marburg and Ebola viruses: Speculations and directions for future research. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):127-38

36 Talani P. Konongo J.D., Gromyko A., Nanga-Maniane J., Yala F., Bodzongo D.: Prevalence des anticorps anti-fièvres hemorragiques d'origine virale dans la région du Pool (Congo-Brazzaville). *Médecine d'Afrique Noire*, 1999; **46**(8-9

37 Busico K.M. Marshall K.L., Ksiazek T.G., Roels T.H., Fleerackers Y., Feldmann H., Khan A.S., Peters C.J.: Prevalence of IgG antibodies to Ebola virus in individuals during an Ebola outbreak, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):102-7

38 Bouree P. Bergmann J.F.: Ebola virus infection in man: a serological and epidemiological survey in the Cameroons. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983; **32**(6):1465-6

39 Johnson E.D. Gonzalez J-P., Georges A.: Haemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution and prevalence of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993; **87**(530-5

40 Johnson E.D. Gonzalez J-P., Georges A.: Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993; **87**(536-8

41 Nakounné E. Selekon B., Morvan J.: Veille microbiologique : les fièvres hémorragiques virales en République centrafricaine ; données sérologiques actualisées chez l'homme. *Santé publique*, 1999; **Manuscrit n°2035**(

42 Gualde Norbert: Epidémies, la nouvelle carte. Desclée de Bouwer ed. 2002. 237p.

43 Tonda J.: La guérison divine en Afrique centrale (Congo, Gabon). Paris, Karthala ("Hommes et sociétés") ed. 2002. 243p.

44 Epelboin A.: Approche anthropologique de l'épidémie de fièvre hémorrhagique à virus Ebola sévissant dans le district de Kéllé (Cuvette ouest Congo). Rapport intermédiaire. 2003;

45 Hewlett B.S. Epelboin A., Hewlett B.W., Formenty P.: Medical anthropology and Ebola in Congo: Cultural models and humanistic care. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2005; **98**(3):230-6

46 Rowe A.K. Bertolli J., Khan A.S., Mukunu R., Muyembe-Tamfum J.J, Bressler D., Williams A.J., Peters C.J., Rodriguez L., Feldmann H., Nichol

S.T., Rollin P.E., Ksiazek T.G., for the Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit: Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):28-35

47 Kibadi K. Mupapa K., Kuvula K., Massamba M., Ndaberey D., Muyembe-Tamfum J.J., Bwaka M.A., DeRoo A., Colebunders R.: Late ophtalmologic manifestations in survivors of the 1995 Ebola virus epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):13-4

48 Hewlett B.S. Amola R.P.: Cultural contexts of Ebola in Northern Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, 2003; **9**(10):1242-8

49 Dowell S.F. Mukunu R., Ksiazek T.G., Khan A.S., Rollin P.E., Peters C.J., for the Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit: Transmission of Ebola Hemorrhagic Fever: A study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):87-91

50 Dowell S.F.: Ebola haemorrhagic fever: why were children spared ? . *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1996; **15**(189-91.

51 Francesconi P. Yoti Z., Declich S., Onek P.A., Fabiani M., Olango J., Andraghetti R., Rollin P.E., Opira C., Greco D., Salmaso S.: Ebola hemorrhagic fever transmission and risk factors of contacts, Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, 2003; **9**(11):1430-7

52 Roels T.H. Bloom A.S., Buffington J., Muhungu G.L., MacKenzie W.R., Khan A.S., Ndambi R., Noah D.L., Rolka H.R., Peters C.J., Ksiazek T.G.: Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: Risk factors for patients without a reported exposure. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):92-7

53 Georges A.J. Baize S., Leroy E.M., Georges-Courbot M.C.: Virus Ebola: L'essentiel pour le praticien. *Med. Trop.*, 1998; **58**(2):177-86

54 Fisher-Hoch S.P. Brammer T.L., Trappier S.G., Hutwagner L.C., Farrar B.B., Ruo S.L., Brown B.G., Hermann L.M., Perez-Oronoz G.I., Goldsmith C.S., Hanes M.A., McCormick J.B.: Pathogenic potential of filoviruses: Role of geographic origin of primate host and virus strain. *Journal of Infectious Diseases*, 1992; **166**(753-63

55 Fisher-Hoch S.P. McCormick J.B.: Experimental filovirus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1999; **235**(117-43

56 Jahrling P.B. Geisbert T.W., Jaax N.K., Hanes M.A., Ksiazek T.G., Peters C.J.: Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch Virol Suppl*, 1996; **11**(115-34

57 Fisher-Hoch S.P. Platt G.S., Neild G.H., Southee T., Baskerville A., Raymond R.T., Llyod G., Simpson D.I.H.: Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *Journal of Infectious Diseases*, 1985; **152**(5):887-94

58 Rodriguez L.L. De Roo A., Guimard Y., Trappier S.G., Sanchez A., Bressler D., Williams A.J., Rowe A.K., Bertolli J., Khan A.S., Ksiazek T.G., Peters C.J., and Nichol S.T.: Persistence and Genetic Stability of Ebola Virus during the Outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):170-6

59 Zaki S.R. Shieh W-J., Greer P.W., Goldsmith C.S., Ferebee T., Katshitshi J., Tshioko F.K., Bwaka M.A., Swanepoel R., Calain P., Khan A.S., Llyod E., Rollin P.E., Ksiazek T.G., and Peters C.J., for the Commission de Lutte contre les Épidémies à Kikwit: A Novel Immunohistochemical Assay for the Detection of Ebola Virus in Skin: Implications for Diagnstic, Spread, and Surveillance of Ebola Hemorrhagic Fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):36-47

60 Dalgard D.W. Hardy R.J., Pearson S.L., Pucak G.J., Quander R.V., Zack P.M., Peters C.J., Jahrling P.B.: Combined simian hemorrhagic fever and Ebola virus infection in cynomolgus monkeys. *Lab Anim Sci*, 1992; **42**(2):152-7

61 Jaax N. Jahrling P., Geisbert T., Geisbert J., Steele K., McKee K., Nagley D., Johnson E., Jaax G., Peters C.: Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontanment laboratory. *Lancet*, 1995; **346**(1669-71

62 Peters C.J. Jahrling P.B., Khan A.S.: Patients infected with high-hazard viruses: scientific basis for infection control. *Arch. Virol. Suppl.*, 1996; **11**(141-68

63 Jaax N.K. Davis K.J., Geisbert T.J., Vogel P., Jaax G.P., Topper M., Jahrling P.B.: Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjonctival route of exposure. *Arch Pathol Lab Med*, 1996; **120**(2):140-55

64 Johnson E. Jaax N., White J., Jahrling P.: Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int J Exp Pathol*, 1995; **76**(4):227-36

65 Bazhutin N.B. Belanov E.F., Spiridonov V.A., Voitenko A.V., Krivenchuk N.A., Krotov S.A., Omel'chenko N.I., Tereshchenko AIu, Khomichev V.V.: The effects of the methods for producing an experimental Marburg virus infection on the characteristics of the course of the disease in green monkeys. *Vopr Virusol*, 1992; **37**(3):153-6

66 Geisbert T.W. Jahrling P.B., Hanes M.A., Zack P.M.: Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J Comp Pathol*, 1992; **106**(2):137-52

67 Cheprunov A.A. Chuev Y.P., P'yankov O.V., Efimova I.V.: Effects of some physical and chemical factors of inactivation of Ebola virus. *Vopr. Virusol.*, 1995; **2**(74-6

68 Martini G.A. Siegert R.: Marburg virus disease. 1971, New York: Springer.

69 Arata A.A. Johnson B.: Approaches towards studies on potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in southern Sudan (1977). Ebola virus haemorrhagic fever ed. Pattyn SR. Amsterdam E.N.b. 1978. pp 191-202.

70 Breman J.G. Johnson K.M., van der Groen G., Robbins C.B., Szczeniowski M.V., Ruti K., Webb P.A., Meier F., Heymann D.L.: A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: Ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979-1980. . *J. Infect. Dis.*, 1999; **179**(Suppl. 1):S139-S47

71 Leirs H. Mills J.N., Krebs J.W., Childs J.E., Akaibe D., Woollen N., Ludwig G., Peters C.J., Ksiazek T.G., and other study group members: Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Reflections on a vertebrate collection. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):155-63

72 Reiter P. Turell M., Coleman R., Miller B., Maupin G., Liz J., Kuehne A., Barth J., Geisbert J., Dohm D., Glick J., Pecor J., Robbins R., Jahrling P., Peters C., Ksiazek T.: Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: Arthropods studies. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):148-54

73 Allela L. Bourry O., Pouillot R., Delicat A., Yaba P., Kumulungui B., Rouquet P., Gonzales J-P., Leroy E.M.: Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; **11**(3):385-90

74 Turell M.J. Bressler D.S., Rossi C.A.: Short report: Lack of virus replication on arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996; **55**(1):89-90

75 Swanepoel R. Leman P.A., Burt F.J., Zachariades N.A., Braack L.E.O., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Zaki S.R., Peters C.J.: Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerging Infectious Diseases*, 1996; **2**(4):321-5

76 Haydon D.T. Cleaveland S., Taylor L.H., Laurenson M.K.: Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; **8**(12):1468-73

77 Peterson A.T. Caroll D.S., Mills J.N., Johnson K.M.: Potential mammalian filovirus reservoirs. *Emerging Infectious Diseases*, 2004; **10**(12):2073-81

78 Gear J.S.S. Cassel G.A., Gear A.J., trappler B., Clausen L., Meyers A.M., Kew M.C., Bothwell T.H., Sher R., Miller G.B., Schneider J., Koornhof H.J., Gomperts E.D., Isaäcson M., Gear J.H.S.: Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br. Med. J.*, 1975; **4**(489-93

79 Smith D.H. Johnson B.K., Isaacson B.K., Swanapoel R., Johnson K.M., Killey M., Bagshawe A., Siongok T., Keruga W.K.: Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet*, 1982; **1**(816-20

80 Leroy E.M.: Infection Asymptomatique de l'Homme par le Virus Ebola, 2000, Spécialité : Immunologie, Université Pierre et Marie Curie ((Paris VI))

81 Kunz C. Hofmann H., Aspöck H.: Propagation of "Marburg-virus" (vervet monkey disease agent) in Aedes aegypti. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitol. Orig.*, 1968; **208**(347-9

82 Leroy E. Pourrut X., Gonzalez J-P.: Les chauves-souris, réservoirs du virus Ebola. Le mystère se dissipe. . *Medecine/Science*, 2006; **22**(78-80

83 Leroy E.M. Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba Ph., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J-P., Swanepoel R.: Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, 2005; **438**(575-6

84 Biek R. Walsh P.D., Leroy E.M., Real L.A.: Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog.*, 2006; **2**(10):e90

85 Sureau P.H.: Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestations in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; **11**(suppl 4):790-3

86 Ndambi R. Akamituna P., Bonnet M-J., Tukadila A.M., Muyembe-Tamfum J.J., Colebunders R.: Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):8-10

87 Mupapa K. Mulundu W., Bwaka M.A., Kipasa M., De Roo A., Kuvula K., Kibadi K., Massamba M., Ndaberey D., Colebunders R., Muyembe-Tamfum J.J.: Ebola hemorrhagic fever and pregnancy. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):11-2

88 Kalongi Y. Mwanza K., Tshisuaka M., Lusiama N., Ntando E., Kanzake L., Shieh W-J., Zaki S.R., Llyod E.S., Ksiazek T.G., Rollin P.E.: Isolated case of Ebola hemorrhagic fever with mucormycosis complications, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):15-7

89 Jahrling P.B.: Filoviruses and Arenaviruses. 1995; 1068-81
90 Geisbert T.W. Jahrling P.B.: Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. *J. Clin. Pathol.*, 1990; **43**(813-6
91 Ellis D.S. Simpson D.I.H., Francis D.P., Knobloch J., Bowen E.T.W., Lolik P., Deng I.M.: Ultrastructure of Ebola virus particles in human liver. *J. Clin. Pathol.*, 1978; **31**(201-8
92 Geisbert TW Jahrling P.B.: Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res.*, 1995; **39**(129-50
93 Kolesnikova L. Mühlberger E., Ryabchikova E., Becker S.: Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: Comparison with Marburg virus inclusions. *Journal of Virology*, 2000; **74**(8):3899-904
94 Noda T. Ebihara H., Muramoto Y., Fujii K., Takada A., Sagara H., Kim J.H., Kida H., Feldmann H., Kawaoka Y.: Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog.*, 2006; **2**(9):e99
95 Wyers M. Formenty P., Cherel Y., Guigand L., Fernandez B., Boesch C., LeGuenno B.: Histopathological and immunohistochemical studies of lesions associated with Ebola virus in a naturally infected chimpanzee. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):54-9
96 Volchkov V.E. Chepurnov A.A., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H-D.: Molecular characterization of Guinea Pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology*, 2000; **277**(147-55
97 McCormick J.B. Bauer S.P., Elliott L.H., Webb P.A., Johnson K.M.: Biologic Differences Between Strains of Ebola Virus from Zaire and Sudan. *Journal of Infectious Diseases*, 1983; **147**(2):164-7
98 Harcourt B.H. Sanchez A., Offermann M.K.: Ebola inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells. *Virology*, 1998; **252**(179-88
99 Baskerville A. Bowen E.T., Platt G.S., McArdell L.B., Simpson D.I.: The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.*, 1978; **125**(3):131-8
100 Moe J.B. Lambert R.D., Lupton H.W.: Plaque assay for Ebola virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 1981; **13**(4):791-3
101 Ksiazek T.G. Rollin P.E., Williams A.J., Bressler D.S., Martin M.L., Swanepoel R., Burt F.J., Leman P.A., Khan A.S., Rowe A.K., Mukunu R., Sanchez A., Peters C.J.: Clinical virology of Ebola Hemorrhagic Fever (EHF): Virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patiens in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):177-87
102 Drosten C. Göttig S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., Günther S.: Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and

Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus, Rift Valley Fever virus, Dengue virus, and Yellow Fever virus by real-time reverse-transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; **40**(7):2323-30

103 Weidmann M. Mühlberger E., Hufert F.T.: Rapid detection protocol for filoviruses. *Journal of Clinical Virology*, 2004; **30**(94-9

104 Kurosaki Y. Takada A., Ebihara H., Grolla A., Kamo N., Feldmann H., Kawaoka Y., Yasuda J.: Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 2007; **141**(1):78-83

105 Towner J.S. Rollin P.E., Bausch D.G., Sanchez A., Crary S.M., Vincent M., Lee W.F., Spiropoulou C.F., Ksiazek T.G., Lukwiya M., Kaducu F., Downing R., Nichol S.T.: Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *Journal of Virology*, 2004; **78**(8):4330-41

106 Günther S. Asper M., Röser C., Luna L.K.S., Drosten C., Becker-Ziaja B., Borowski P., Chen H-M., Hosmane R.S.: Application of real-time PCR for testing antiviral compounds against Lassa virus, SARS coronavirus and Ebola virus in vitro. *Antiviral Research*, 2004; **63**(209-15

107 Ksiazek T.G. Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J.: Enzyme Immunosorbent Assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; **30**(4):947-50

108 Yu J.S. Liao H.X., Gerdon A.E., Huffman B., Scearce R.M., McAdams M., Alam S.M., Popernack P.M., Sullivan N.J., Wright D., Cliffel D.E., Nable G.J., Hayes B.F.: Detection of Ebola virus envelope using monoclonal and polyclonal antibodies in ELISA, surface plasmon resonance and a quartz crystal microbalance immunosensor. *J Virol Methods*, 2006; **137**(2):219-28

109 Lucht A. Grunow R., Möller P., Feldmann H., Becker S.: Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus. *Journal of Virological Methods*, 2003; **11**(21-8

110 Sanchez A. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Miranda M.E.G., Trappier S.G., Khan A.S., Peters C.J., Nichol S.T.: Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):164-9

111 Leroy E.M. Baize S., Lu C.Y., McCormick J.B., Georges A.J., Georges-Courbot M-C., Lansoud-Soukate J., and Fisher-Hoch S.P.: Diagnosis of ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *Journal of Medical Virology*, 2000; **60**(463-7

112 Zhai J. Palacios G., Towner J.S., Jabado O., Kapoor V., Venter M., Grolla A., Briese T., Paweska J., Swanepoel R., Feldmann H., Nichol S., Lipkin

W.I.: Rapid molecular strategy for filovirus detection and characterization. *J Clin Microbiol.*, 2007; **45**(1):224-6

113 Wulff H. Lange J.V.: Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. *Bull. World Health Organ.*, 1975; **52**(429-35

114 Johnson K.M. Elliott L.H., Heymann D.L.: Preparation of Polyvalent Viral Immunofluorescent Intracellular Antigens and Use in Human Serosurveys. *J. Clin. Microbiol.*, 1981; **14**(5):527-9

115 Ivanoff B. Duquesnoy P., Languillat G., Saluzzo J.F., Georges A., Gonzalez J-P., McCormick J.: Haemorrhagic fever in Gabon. I. Incidence of Lassa, Ebola and Marburg viruses in Haut-Ogooué. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1982; **76**(6):719-20

116 Ksiazek T.G. West C.P., Rollin P.E., Jahrling P.B., Peters C.J.: ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):192-8

117 Ivanov A.P. Tkachenko E.A., van der Groen G., Butenko A.M., Konstantinov O.K.: Indirect immunoenzyme method for the laboratory diagnosis of Lassa en Ebola hemorrhagic fevers. *Vopr. Virusol.*, 1986; **31**(2):186-90

118 Elliott L.H. Bauer S.P., Perez-Oronoz G., Lloyd E.S.: Improved specificity of testing methods for filovirus antibodies. *J. Virol. Methods*, 1993; **43**(1):85-9

119 Richman D.D. Cleveland P.H., McCormick J.B., Johnson K.M.: Antigenic analysis of strains of Ebola virus: Identification of two Ebola virus serotypes. *J. Infect. Dis.*, 1983; **147**(2):268-71

120 Kerstiëns B. Matthys F.: Interventions to control virus transmission during an outbreak of Ebola hemorrhagic fever: Experience from Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):263-7

121 Lloyd E.S. Zaki S.R., Rollin P.E., Tshioko K., Bwaka M.A., Ksiazek T.G., Calain P., Shieh W-J., Kondé M.K., Verchueren E., Perry H.N., Manguindula L., Kabwau J., Ndambi R., Peters C.J.: Long-Term Disease Surveillance in Bandundu Region, Democratic Republic of

the Congo: A Model for Early Detection and Prevention of Ebola Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.*, 1999; **179**(suppl1):S271-S80

122 Guimard Y. Bwaka M.A., Colebunders R., Calain P., Massamba M., DeRoo A., Mupapa K.D., Kibadi K., Kuvula K.J., Ndaberey B.B., Nkuku O.B., Fleerackers Y., Van den Enden E., Kipasa M.A.: Organization of patient care during the Ebola hemorrhagic fever epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):268-73

123 Sanchez A. Trappier S.G., Mahy B.W.J., Peters C.J., Nichol S.T.: The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames

and are expressed through transcriptional editing. *PNAS*, 1996; **93**(3602-7

124 Bray M. Davis K., Geisbert T., Schmaljohn C., Huggins J.: A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1998; **178**(651-61

125 Gupta M. Mahanty S., Bray M., Ahmed R., Rollin P.E.: Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola virus infection without complete inhibition of viral replication. *Journal of Virology*, 2001; **75**(10):4649-54

126 Wilson J.A. Bray M., Bakken R., Hart M.K.: Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35 and VP40 proteins. *Virology*, 2001; **286**(2):384-90

127 Jahrling P.B. Geisbert J., Swearengen J.R., Jaax G.P., Lewis T., Huggins J.W., Schmidt J.J., LeDuc J.W., Peters C.J.: Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. *Arch Virol. Suppl.*, 1996; **11**(135-40

128 Ulmer J.B. Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A., et al.: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993; **259**(5102):1745-9

129 Sedegah M. Hedstrom R., Hobart P., Hoffman S.L.: Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *PNAS*, 1994; **91**(9866-70

130 Tascon R.E. Colston M.J., Ragno S., Stavropoulos E., Gregory D., Lowrie D.B.: Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat. Med.*, 1996; **2**(8):888-92

131 Xu L. Sanchez A., Yang Z-Y., Zaki S.R., Nabel E.G., Nichol S.T., Nabel G.J.: Immunization for Ebola virus infection. *Nature Medicine*, 1998; **4**(1):37-42

132 Warfield K.L. Bosio C.M., Welcher B.C., Deal E.M., Mohamadzadeh M., Schmaljohn A., Aman M.J., Bavari S.: Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *PNAS*, 2003; **100**(26):15889-94

133 Dowling W. Thompson E., Badger C., Mellquist J.L., Garrison A.R., Smith J.M., Paragas J., Hogan R.J., Schmaljohn C.: Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol.*, 2007; **81**(4):1821-37

134 Wang D. Raja N.U., Trubey C.M., Juompan L.Y., Luo M., Woraratanadharm J., Deitz S.B., Yu H., Swain B.M., Moore K.M., Pratt W.D., Hart M.K., Dong J.Y.: Development of a cAdVax-based bivalent Ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *Journal of Virology*, 2006; **80**(6):2738-46

135 Geisbert T.W. Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B.: Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; **8**(5):503-7

136 Yang Z-Y. Wyatt L.S., Kong W-P., Moodie Z., Moss B., Nabel G.J.: Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting. *Journal of Virology*, 2003; **77**(1):799-803

137 Sullivan N.J. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z-Y., Roederer M., Koup R.A., Jahrling P.B., Nabel G.J.: Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 2003; **424**(681-4

138 Sullivan N.J. Sanchez A., Rollin P.E., Yang Z-Y, Nabel G.J.: Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, 2000; **408**(605-9

139 Manicassamy B. Wang J., Jiang H., Rong L.: Comprehensive analysis of Ebola virus GP1 in viral entry. *Journal of Virology*, 2005; **79**(8):4793-805

140 Sullivan N.J. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Shedlock D.J., Xu L., Lamoreaux L., Custers J.H.H.V., Popernack P.M., Yang Z-Y., Pau M.G., Roederer M., Koup R.A., Goudsmit J., Jahrling P.B., Nabel G.J.: Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Medicine*, 2006; **3**(6):e177

141 Geisbert T.W. Jones S., Fritz E.A., Shurtleff A.C., Geisbert J.B., Liebscher R., Grolla A., Ströher U., Fernando L., Daddario K.M., Guttieri M.C., Mothé B.R., Larsen T., Hensley L.E., Jahrling P.B., Feldmann H.: Development of a new vaccine for the prevention of Lassa Fever. *PLoS Med*, 2005; **2**(6):e183

142 Garbutt M. Liebscher R., Wahl-Jensen V., Jones S., Möller P., Wagner R., Volchkov V., Klenk H-D., Feldmann H., Ströher U.: Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses. *Journal of Virology*, 2004; **78**(10):5458-65

143 Jones S.M. Feldmann H., Ströher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A., Klenk H.D., Sullivan N.J., Volchkov V.E., Fritz E.A., Daddario K.M., Hensley L.E., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.*, 2005; **11**(7):786-90

144 Pushko P. Parker M., Ludwig G.V., Davis N.L., Johnston R.E., Smith J.F.: Replicon-helper systems for attenuated Venezuelan equine encephalis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology*, 1997; **239**(389-401

145 Pushko P. Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J.: Individual and bivalent vaccines based on Alphavirus replicons protects guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *Journal of Virology*, 2001; **75**(23):11677-85

146 Bukreyev A. Yang L., Zaki S.R., Shieh W-J., Rollin P.E., Murphy B.R., Collins P.L., Sanchez A.: A single intranasal inoculation with a Paramyxovirus-vectored vaccine protects Guinea Pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *Journal of Virology*, 2006; **80**(5):2267-79

147 Bukreyev A.A. Rollin P.E., Tate M.K., Yang L., Zaki S.R., Shieh W.J., Murphy B.R., Collins P.L., Sanchez A.: Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J. Virol.*, 2007; **81**(12):6379-88

148 Martin J.E. Sullivan N.J., Enama M.E., Gordon I.J., Roederer M., Koup R.A., Bailer R.T., Chakrabarti B.K., Bailey M.A., Gomez P.L., Andrews C.A., Moodie Z., Gu L., Stein J.A., Nabel G.J., Graham B.S., and the VRC 204 Study Team: A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trail. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006; **13**(11):1267-77

149 Huggins J.W.: Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with Ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; **11**(suppl 4):750-61

150 Huggins J. Zhang Z-X., Bray M.: Antiviral drug therapy of filovirus infection: S-Adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):240-7

151 Geisbert T.W. Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E.: Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: Overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *Journal of Infectious Diseases*, 2003; **188**(1618-29

152 Vlasuk G.P. Rote W.E.: Inhibition of factor VIIa/tissue factor with nematode anticoagulant protein c2: from unique mechanism to a promising new clinical anticoagulant. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; **12**(8):325-31

153 Moons A.H. Peters C.J., Bijsterveld N.R., Piek J.J., Prins M.H., Vlasuk G.P., Rote W.E., Büller H.R.: Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex, in patients undergoing elective coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003; **41**(12):2147-53

154 Geisbert T.W. Hensley L.E., Jahrling P.B., Larsen T., Geisbert J.B., Paragas J., Young H.A., Fredeking T.M., Rote W.E., Vlasuk G.P.: Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: A study in rhesus monkeys. *Lancet*, 2003; **362**(1953-8

155 Deas T.S. Binduga-Gajewska I., Tilgner M., Ren P., Stein D.A., Moulton H., Iversen P.L., Kauffman E.B., Kramer L.D., Shi P-Y: Inhibition of Flavivirus Infections by Antisense Oligomers Specifically Suppressing Viral Translation and RNA Replication. *J. Virol.*, 2005; **79**(8):4599-609

156 Kinney R.M. Huang C.Y.H., Rose B.C., Kroeker A.D., Dreher T.W., Iversen P.L., Stein D.A.: Inhibition of Dengue Virus Serotypes 1 to 4 in Vero Cell Cultures with Morpholino Oligomers. *J. Virol.*, 2005; **79**(8):5116-28

157 Warfield K.L. Swenson D.L., Olinger G.G., Nichols D.K., Pratt W.D., Blouch R., Stein D.A., Aman M.J., Iversen P.L., Bavari S.: Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog*, 2006; **2**(1):e1

158 Sergeev A.N. Lub M.I., P'iankova O.G., Kotliarov L.A.: [The efficacy of the emergency prophylactic and therapeutic actions of immunomodulators in experimental filovirus infections]. *Antibiot. Khimioter*, 1995; **40**(5):24-7

159 Jahrling P.B. Geisbert T.G., Geisbert J.B., Swearengen J.R., Bray M., Jaax N.K., Huggins J.W., LeDuc J.W., Peters C.J.: Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):224-34

160 Kudoyarova-Zubavichene N.M. Sergeyev N.N., Chepurnov A.A., Netesov S.V.: Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxix and therapy of Ebola virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):218-23

161 Mupapa K. Massamba M., Kibadi K., Kuvula K., Bwaka A., Kipasa M., Colebunders R., Muyembe-Tamfum J.J. on behalf of the International Scientific and Technical Committee: Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusion from convalescent patients. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):18-23

162 Isaacson M. Surreau P., Courteille G., Pattyn S.R.: Clinical aspects of Ebola virus disease at the Ngaliema Hospital, Kinshasa, Zaire, 1976, in *Ebola virus haemorrhagic fever. Ebola virus infection.*, S.R. P., Editor. 1978, Elsevier/North-Holland

Amsterdam. p. 15-20.

163 Wilson J.A. Hevey M., Bakken R., Guest S., Bray M., Schmaljohn A.L., Hart M.K.: Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science*, 2000; **287**(1664-6

164 Maruyama T. Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W.H.I., Burton D.R.: Ebola virus can be effectively neutralized by antobidy produced in natural human infection. *Journal of Virology*, 1999; **73**(7):6024-30

165 Parren P.W.H.I. Geisbert T.W., Maruyama T., Jahrling P.B., Burton D.R.: Pre- and postexposure of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. *Journal of Virology*, 2002; **76**(12):6408-12

166 Takada A. Ebihara H., Jones S., Feldmann H., Kawaoka Y.: Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine.*, 2007; **25**(6):993-9

167 Oswald W.B. Geisbert T.W., Davis K.J., Geisbert J.B., Sullivan N.J., Jahrling P.B., Parren P.W.H.I., Burton D.R.: Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in Monkeys. *PLoS Pathog.*, 2007; **3**(1):e9

168 Daddario-DiCaprio K.M. Geisbert T.W., Ströher U., Geisbert J.B., Grolla A., Fritz E.A., Fernando L., Kagan E., Jahrling P.B., Hensley L.E., Jones S.M., Feldmann H.: Postexposure protection against Marburg haemorrhagic fever with recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates: an efficacy assessment. *Lancet*, 2006; **367**(9520):1399-404

169 Daddario-DiCaprio K.M. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Ströher U., Hensley L.E., Grolla A., Fritz E.A., Feldmann F., Feldmann H., Jones S.M.: Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.*, 2006; **80**(19):9659-66

170 Feldmann H. Jones S.M., Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert J.B., Ströher U., Grolla A., Bray M., Fritz E.A., Fernando L., Feldmann F., Hensley L.E., Geisbert T.W.: Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog.*, 2007; **3**(1):e2

171 Bowen E.T.W. Platt G.S., Simpson D.I.H., McArdell L.B., Raymond R.T.: Ebola haemorrhagic fever: Experimental infection of monkeys. *Transaction of Royal Society*, 1978; **72**(2):188-91

172 Baskerville A. Fisher-Hoch S.P., Neild G.H., Dowsett A.B.: Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J. Pathol.*, 1985; **147**(3):199-209

173 Geisbert T.W. Hensley L.E., Larsen T., Young H.A., Reed D.S., Geisbert J.B., Scott D.P., Kagan E., Jahrling P.B., Davis K.J.: Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus Macaques: Evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *American Journal of Pathology*, 2003; **163**(6):2347-70

174 Connolly B.M. Steele K.E., Davis K.J., Geisbert T.W., Kell W.M., Jaax N.K., Jahrling P.B.: Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in Guinea pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):203-17

175 Gibb T.R. Bray M., Geisbert T.W., Steele K.E., Kell W.M., Davis K.J., Jaax N.K.: Pathogenesis of experimental Ebola Zaire virus infection in BALB/c mice. *J. Comp. Path.*, 2001; **125**(233-42

176 Bray M. Hatfill S., Hensley L., Huggins J.W.: Haematological, biochemical and coagulation changes in mice, guinea-pigs and monkeys infected with a mouse-adapted variant of Ebola Zaire virus. *J. Comp. Path.*, 2001; **125**(243-53

177 Ryabchikova E.I. Kolesnikova L.V., Luchko S.V.: An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):199-202

178 Fisher-Hoch S.P. Platt G.S., Llyod G., Simpson D.I.H., Neild G.H., Barrett A.J.: Haematological and biochemical monitoring of Ebola infection in rhesus monkeys: implications for patient management. *Lancet*, 1983; **2**(1055-8

179 Cosgriff: Viruses and hemostasis. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; **11**(suppl 4):672-88

180 Ryabchikova E. Kolesnikova L., Smolina M., Tkachev V., Pereboeva L., Baranova S., Grazhdantseva A., Rassadkin Y.: Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch. Virol.*, 1996; **141**(909-21

181 Geisbert T.W. Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Larsen T., Kagan E., Hensley L.E.: Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: Evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytloysis of endothelial cells. *American Journal of Pathology*, 2003; **163**(6):2371-82

182 Schnittler H.J. Mahner F., Drenckhahn D., Klenk H-D., Feldmann H.: Replication of Marburg virus in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1993; **91**(1301-9

183 Feldmann H. Bugany H., Mahner F., Klenk H-D., Drenckhahn D., Schnittler H-J: Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *Journal of Virology*, 1996; **70**(4):2208-14

184 Ströher U. West E., Bugany H., Klenk H-D., Schnittler H-J., Feldmann H.: Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *Journal of Virology*, 2001; **75**(22):11025-33

185 Sanchez A. Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., Rollin P.E.: Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: Cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *Journal of Virology*, 2004; **78**(19):10370-7

186 Gupta M. Mahanty S., Greer P., Towner J.S., Shieh W-J., Zaki S.R., Ahmed R., Rollin P.E.: Persistent infection with Ebola virus under conditions of partial immunity. *Journal of Virology*, 2004; **78**(2):958-67

187 Warfield K.L. Perkins J.G., Swenson D.L., Deal E.M., Bosio C.M., Aman M.J., Yokoyama W.M., Young H.A., Bavari S.: Role of natural killer cells in innate protection against lethal Ebola virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 2004; **200**(2):169-79

188 Simmons G. Reeves J.D., Grogan C.C., Vandenberghe L.H., Baribaud F., Whitbeck J.C., Burke E., Buchmeier M.J., Soilleux E.J., Riley J.L., Doms R.W., Bates P., Pohlmann S.: DC-SIGN and DC-SIGNR bind Ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. . *Virology*, 2003; **305**(1):115-23

189 Alvarez C.P. Lasala F., Carrillo J., Muñiz O., Corbi A.L., Delgado R.: C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in *cis* and in *trans*. *J. Virol.*, 2002; **76**(13):6841-4

190 Lin G. Simmons G., Pöhlmann S., Baribaud F., Ni H., Leslie G.J., Haggarty B.S., Bates P., Weissman D., Hoxie J.A., Doms R.W.: Differential N-linked glycosylation of Human Immunodeficiency Virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*, 2003; **77**(2):1337-46

191 Marzi A. Akhavan A., Simmons G., Gramberg T., Hofmann H., Bates P., Lingappa V.R., Pöhlmann S.: The signal peptide of the Ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology*, 2006; **80**(13):6305-17

192 Martinez O. Valmas C., Basler C.F.: Ebola virus-like particle-induced activation of NF-kappaB and Erk signaling in human dendritic cells requires the glycoprotein mucin domain. *Virology*, 2007; **364**(2):342-54

193 Marzi A. Gramberg T., Simmons G., Möller P., Rennekamp A.J., Krumbiegel M., Geier M., Eisemann J., Turza N., Saunier B., Steinkasserer A., Becker S., Bates P., Hofmann H., Pöhlmann S.: DC-SIGN a,d DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology*, 2004; **78**(21):12090-5

194 Gutcher I. Burkhard B.: APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2007; **117**(5):1119-27

195 Kaser A. Brandacher G., Steurer W., Kaser S., Offner F.A., Zoller H., Theurl I., Widder W., Molnar C., Ludwiczek O., Atkins M.B., Mier J.W., Tilg H.: Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, 2001; **98**(9):2720-5

196 Ishibashi T. Kimura H., Uchida T., Kariyone S., Friese P., Burstein S.A.: Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *PNAS*, 1989; **86**(5953-7

197 Fernandez E.J. Lolis E.: Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002; **42**(469-99

198 Cocchi F. DeVico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P.: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by $CD8^+$ T cells. *Science*, 1995; **270**(5243):1811-5

199 Garzino-Demo A. Moss R.B., Margolick J.B., Cleghorn F., Sill A., Blattner W.A., Cocchi F., Carlo D.J., DeVico A.L., Gallo R.C.: Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory b-chemokines are associated with AIDS-free status. *PNAS*, 1999; **96**(21):11986-91

200 Loetscher M. Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B.: Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1996; **184**(3):963-9

201 Sozzani S. Ghezzi S., Iannolo G., Luini W., Borsatti A., Polentarutti N., Sica A., Locati M., Mackay C., Wells T.N.C., Biswas P., Vicenzi E., Poli G., Mantovani A.: Interleukin 10 Increases CCR5 Expression and HIV Infection in Human Monocytes. *J. Exp. Med.*, 1998; **187**(3):439-44

202 Murdoch C. Finn A.: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 2000; **95**(10):3032-43

203 Volchkov V.E. Blinov V.M., Netesov S.V.: The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS*, 1992; **305**(3):181-4

204 Yaddanapudi K. Palacios G., Towner J.S., Chen I., Sariol C.A., Nichol S.T., Lipkin W.I.: Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *FASEB J.*, 2006; **20**(14):2519-30

205 Gupta M. Mahanty S., Ahmed R., Rollin P.E.: Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with Ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha *in vitro*. *Virology*, 2001; **284**(20-5

206 Basler C.F. Wang X., Mühlberger E., Volchkov V.E., Paragas J., Klenk H-D., Garcia-Sastre A., Palese P.: The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *PNAS*, 2000; **97**(22):12289-94

207 Kash J.C. Mühlberger E., Carter V., Grosch M., Perwitasari O., Proll S.C., Thomas M.J., Weber F., Klenk H-D., Katze M.G.: Global suppression of hte host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: Increased

antagonism of the Type I interferon response is associated with enhanced virulence. *Journal of Virology*, 2006; **80**(6):3009-20

208 Gunn M.D. Nelken N.A., Liao X., Williams L.T.: Monocyte cheoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J. Immunol.* , 1997; **158**(1):376-83

209 Taub D.D. Conlon K., Lloyd A.R., Oppenheim J.J., Kelvin D.J.: Preferential migration of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*, 1993; **260**(5106):355-8

210 Hutchinson K.L. villinger F., Miranda M.E., Ksiazek T.G., Peters C.J., Rollin P.E.: Multiplex analysis of cytokines in the blood of cynomolgus macaques naturally infected with Ebola virus (Reston subtype). *Journal of Medical Virology*, 2001; **65**(561-6

211 Leroy E.M. Baize S., Volchkov V.E., Fischer-Hoch S.P., Georges-Courbot M.C., Lansoud-Soukate J., Capron M., Debre P., McCormick J.B., Georges A.: Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet*, 2000; **355**(9222):2178-9

212 Villinger F. Rollin P.E., Brar S.S., Chikkala N.F., Winter J., Sundstrom J.B., Zaki S.R., Swanepoel R., Ansari A.A., Peters C.J.: Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, Interleukin (IL)-2, IL-10, and Tumor Necrosis Factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 1999; **179**(suppl 1):188-91

213 Kägi D. Vignaux F., Ledermann B., Bürki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H., Golstein P.: Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 1994; **265**(5171):528-30

214 Lowin B. Hahne M., Mattmann C., Tschopp J.: Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*, 1994; **370**(6491):650-2

215 Berke G.: The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994; **12**(735-73

216 Nagata S. Golstein P.: The Fas death factor. *Science*, 1995; **267**(5203):1449-56

217 Hensley L.E. Young H.A., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate mogels: possible involvment of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunology Letters*, 2002; **80**(169-79

218 Maruyama T. Parren P.W.H.I., Sanchez A., Rensink I., Rodriguez L.L., Khan A.S., Peters C.J., Burton D.R.: Recombinant Human Monoclonal Antibodies to Ebola Virus. *J. Infect. Dis.*, 1999; **179**(suppl1):S235-S9

219 Geisbert T.W. Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B.: Evidence against an important role for infectivity-enhancing antibodies in Ebola virus infections. *Virology*, 2002; **293**(15-9

220 Takada A. Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y.: Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 2001; **75**(5):2324-30

221 Leroy E.M. Baize S., Debre P., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E.: Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001; **124**(453-60

222 Peters C.J. Liu C-T., Anderson Jr G.W.,Morril J.C., Jahrling P.B.: Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers: Rift Valley Fever and Lassa Fever contrasted. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; **11**(suppl 4):743-9

223 LeDuc: Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Reviews of infectious diseases*, 1989; **11**(suppl 4):730-5

224 Bowen M.D. Peters C.J., Nichol S.T.: Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1997; **8**(3):301-16

225 Bishop: Infection and coding strategies of Arenaviruses, Phleboviruses, and Nairoviruses. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; **11**(suppl 4):722-9

226 McCormick J.B. King I.J., Webb P.A., Johnson K.M., O'Sullivan R., Smith E.S., Trippel S., Tong T.C.: A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J. Infect. Dis.*, 1987; **155**(3):445-55

227 Monath T.P.: Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology. *Bull. World Health Organ.*, 1975; **52**(577-92

228 Richmond J.K. Baglole D.J.: Lassa fever: epidemiology, clinical feartures, and social consequences. *BMJ*, 2003; **327**(1271-5

229 Maiztegui J.I.: Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull. World Health Organ.*, 1975; **52**(567-75

230 Mills J.N. Ellis B.A., McKee K.T., Calderon G.E., Maiztegui J.I., Nelson G.O., Ksiazek T.G., Peters C.J., Childs J.E.: A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992; **47**(6):749-63

231 Charel R.N. de Lamballerie: Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res.*, 2003; **57**(1-2):89-100

232 Meegan J.M. Khalil G.M., Hoogstraal H., Adham F.K.: Experimental transmission and field isolation studies implicating Culex pipiens as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980; **29**(6):1405-10

233 Linthicum K.J. Davies F.G., Kairo A., Bailey C.L.: Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J. Hyg (Lond.)*, 1985; **95**(1):197-209

234 Organisation World Health: Rift Valley fever, Egypt. *Wkly Epidem Rec*, 2003; **78**(36):313-20

235 Sall A.A. de A Zanotto P.M., Vialat P., Sene O.K., Bouloy M.: Origin of the 1997-98 Rift Valley fever outbreak in East Africa. *Lancet*, 1998; **352**(1596-7

236 Anonyme: Rift Valley fever outbreak, Kenya, November 2006 - January 2007. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2007; **56**(4):73-6

237 Organisation World Health: An outbreak of Rift Valley fever, eastern Africa, 1997-1998. *Wkly Epidem Rec*, 1998; **73**(15):105-12

238 Battles J.K. Dalrymple J.M.: Genetic variation among geographic isolated of Rift Valley Fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1988; **39**(6):617-31

239 Wilson M.L. Chapman L.E., Hall D.B., Dykstra E.A., Ba K., Zeller H.G., Traore-Laminzana M., Hervy J-P., Linthicum K.J., Peters C.J.: Rift Valley Fever in rural northern Senegal: Human risk factors and potential vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994; **50**(6):663-75

240 Digoutte J.P. Jouan A., LeGuenno B., Riou O., Philippe B., Meegan J., Ksiazek T.G., Peters C.J.: Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into Aedes pseudoscutellaris cells: comparison with other diagnostic methods. *Res. Virol.*, 1989; **140**(1):31-41

241 Linthicum K.J. Bailey C.L., Davies F.G., Tucker C.J.: Detection of Rift Valley Fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery. *Science*, 1987; **235**(1656-9

242 Linthicum K.J. Anyamba A., Tucker C.J., Kelley P.W., Myers M.F., Peters C.J.: Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley Fever epidmics in Kenya. *Science*, 1999; **285**(397-400

243 Swanepoel R. Struthers J.K., Shepherd A.J., McGillivray G.M., Nel M.J., Jupp P.G.: Crimean-Congo hemorrhagic fever in South Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983; **32**(6):1407-15

244 Deyde V.M. Khristova M.L., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T.: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J. Virol.*, 2006; **80**(17):8834-42

245 Jauréguiberry S. Tattevin P., Tarantola A., Legay F., Tall A., Nabeth P., Zeller H., Michelet C.: Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; **43**(9):4905-7

246 Ahmeti S. Raka L.: Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Kosova : a fatal case report. *Virology Journal*, 2006; **3**(85

247 Midilli K. Gargili A., Ergonul O., Sengöz G., Ozturk R., Bakar M., Jongejan F.: Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in Istanbul. *BMC Infectious Diseases*, 2007; **5**(54

248 Fisher-Hoch S.P. Khan J.A., Rehman S., Mirza S., Khurshid M., McCormick J.B.: Crimean-Congo haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet*, 1995; **346**(8973):472-5

249 Ali J. Besharat S., Abbasi A., Moradi A., Kalavi K.: Crimean-Congo hemorrhagic fever: case series from a medical center in Golestan province, northeast of Iran (2004-2006). *Indian J Med Sci*, 2006; **60**(8):327-9

250 Lee H.W. Lee P.W., Johnson K.M.: Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 1978; **137**(3):298-308

251 LeDuc J.W. Smith G.A., Childs J.E., Pinheiro F.P., Maiztegui J.I., Niklasson B., Antoniades A., Robinson D.M., Khin M., Shortridge K.F., Wooster M.T., Elwell M.R., Ilbery P.L.T., Koech D., Rosa E.S.T., Rosen L.: Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. *Bull. World Health Organ.*, 1986; **64**(1):139-44

252 Nichol S.T. Spiropoulou C.F., Morzunov S., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Feldmann H., Sanchez A., Childs J., Zaki S., Peters C.J.: Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 1993; **262**(914-7

253 Engelthaler D.M. Mosley D.G., Cheek J.E., Levy C.E., Komatsu K.K., Ettestad P., Davis T., Tanda D.T., Miller L., Frampton J.W., Porter R., Bryan R.T.: Climatic and environmental patterns associated with Hantvairus pulmonary syndrome, Four Corner region, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; **5**(1):87-94

254 Mills J.N. Ksiazek T.G., Peters C.J., Childs J.E.: Long-term studies of Hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: A synthesis. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; **5**(1):135-42

255 Mills J.N. Yates T.L., Ksiazek T.G., Peters C.J., Childs J.E.: Long-term studies of Hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: Rationale, potential, and methods. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; **5**(1):95-101

256 Monroe M.C. Morzunov S.P., Johnson A.M., Bowen M.D., Artsob H., Yates T., Peters C.J., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T.: Genetic diversity and distribution of *Peromyscus*-borne Hantaviruses in North America. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; **5**(1):75-86

257 Sironen T. Vaheri A., Plyusnin A.: Molecular evolution of Puumala Hantavirus. *Journal of Virology*, 2001; **75**(23):11803-10

258 Vapalahti O. Lundkvist A., Federov V., Conroy C.J., Hirvonen S., Plyusnina A., Nemirov K., Fredga K., Cook J.A., Niemimaa J., Kaikusalo A., Henttonen

H., Vaheri A., Plyusnin A.: Isolation and characterization of a Hantavirus from *Lemmus sibiricus*: Evidence for host switch during Hantavirus evolution. *Journal of Virology*, 1999; **73**(7):5586-92

259 Hart C.A. Bennett M.: Hantavirus infections: Epidemiology and pathogenesis. *Microbes and infection*, 1999; **1**(1229-37

260 Organisation World Health: The Yellow Fever situation in Africa and South America in 2004. *Wkly Epidem Rec*, 2005; **80**(29):249-56

261 Lhuillier M. Sarthou J.L., Cordellier R., Gershy-Damet G.M., Monteny N., Bouchite B., Calen P.: Epidémie rurale de fièvre jaune avec transmission interhumaine en Côte d'Ivoire en 1982. *Bull. World Health Organ.* , 1985; **63**(3):527-36

262 Organisation World Health: Yellow fever, Senegal - update. *Wkly Epidem Rec*, 2002; **77**(42):349-56

263 Organisation World Health: Yellow fever situation in Africa and South America, 2005. *Wkly Epidem Rec*, 2006; **81**(33):317-24

264 Organisation World Health: Progress in the control of yellow fever in Africa. *Wkly Epidem Rec*, 2005; **80**(6):49-60

265 Carey D.E. Myers R.M., Reuben R., Rodrigues F.M.: Studies on dengue in Vellore, South India. *Bull. World Health Organ.*, 1966; **35**(1):61

266 Monath T.P.: Dengue: The risk to developed and developing countries. *PNAS*, 1994; **91**(2395-400

267 Senanayake S.: Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: A diagnostic challenge. *Australian Family Physician*, 2006; **35**(8):609-12

268 Organisation World Health: Dengue haemorrhagic fever, Timor-Leste - update. *Wkly Epidem Rec*, 2005; **80**(10):85-92

269 Samuel P.P. Tyagi B.K.: Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J Med Res*, 2006; **123**(615-28

270 Venugopal K. Gritsun T., Lashkecivh V.A., Gould E.A.: Analysis of the structural protein gene sequence shows Kyasanur Forest disease virus as a distinct member in the tick-borne encephalitis virus serocomplex. *J. Gen. Virol.*, 1994; **75**(227-32

271 Charrel R.N. Zaki A.M., Fakeeh M., Yousef A.I., de Chesse R., Attoui H., de Lamballerie X.: Low Diversity of Alkhurma Hemorrhagic Fever Virus, Saudi Arabia, 1994–1999. *Em. Inf. Dis.*, 2005; **11**(5):683-8

272 Li L. Rollin P.E., Nichol S.T., Shope R.E., Barrett A.D.T., Holbrook M.R.: Molecular determinants of antigenicity of two subtypes of the tick-borne flavivirus Omsk haemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.*, 2004; **85**(1619-24

273 Martini G.A.: Marburg agent disease in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* , 1969; **63**(295-302.

274 Kiley M.P. Bowen T.W., Eddy G.A., Isaacson M., Johnson K.M., McCormick J.B., Murphy F.A., Pattyn S.R., Peters D., Prozesky O.W., Regnery R.L., Simpson D.I.H., Slenczka W., Sureau P., Van der Groen G., Webb P.A., Wulff H.: Filoviridae: taxonomic home for Marburg and Ebola viruses ? . *Intervirology*, 1982; **18**(24-32.

275 Smith C.E.G. Simpson D.I.H., Bowen E.T.W.: Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet*, 1967; **II**(1119-21.

276 Organisation World Health: Viral haemorrhagic fever / Marburg, Democratic Republic of the Congo. *Wkly Epidem Rec*, 1999; **74**(20):157-64

277 Organisation World Health: Marburg fever, Democratic Republic of the Congo. *Wkly Epidem Rec*, 1999; **74**(19):145-56

278 Towner J.S. Khristova M.L., Sealy T.K., Vincent M.J., Erickson B.R., Bawiec D.A., Hartman A.L., Comer J.A., Zaki S.R., Ströher U., Gomes da Silva F., del Castillo F., Rollin P., Ksiazek T.G., Nichol S.T.: Marburgvirus genomics and associaton with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *Journal of Virology*, 2006; **80**(13):6497-516

279 Bausch D.G. Borchert M., Grein T., Roth C., Swanepoel R., Libande M.L., Talarmin A., Bertherat E., Muyembe-Tamfum J-J., Tugume B., Colebunders R., Kondé K.M., Pirard P., Olinda L.L., Rodier G.R., Campbell P., Tomori O., Ksiazek T.G., Rollin P.E.: Risk factor for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerging Infectious Diseases*, 2003; **9**(12):1531-7

280 Cox N.J. McCormick J.B., Johnson K.M., Kiley M.P.: Evidence for two subtypes of Ebola virus based on oligonucleotide mapping of RNA. *Journal of Infectious Diseases*, 1983; **147**(2):272-5

281 Murphy: Marburg and Ebola viruses. *Virology ??*, 1985;

282 Feldmann H. Klenk H-D.: Marburg and Ebola viruses. *Adv. Virus Res.*, 1996; **47**(1-52

283 Becker S. Rinne C., Hofsäss U., Klenk H-D., Mühlberger E.: Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology*, 1998; **249**(406-17

284 Mitchell S.W. McCormick J.B.: Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984; **20**(3):486-9

285 Elliott L.H. McCormick J.B., Johnson K.M.: Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982; **16**(704-8

286 Sanchez A. Rollin P.E.: Complete genome sequence of an Ebola virus (Sudan species) responsible for an 2000 outbreak of human disease in Uganda. *Virus Res.*, 2005; **113**(16-25

287 Sanchez A. Kiley M.P., Holloway B.P., and Auperin D.D.: Sequence Analysis of the Ebola Virus Genome: Organization, Genetic Elements, and

Comparison with the Genome of Marburgh Virus. *Virus Research*, 1993; **29**(215-40

288 Mühlberger E. Löftering B., Klenk H-D., Becker S.: Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediated replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *Journal of Virology*, 1998; **72**(11):8756-64

289 Wool-Lewis R.J. Bates P.: Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *Journal of Virology*, 1998; **72**(4):3155-60

290 Chan S.Y. Speck R.F., Ma M.C., Goldsmith M.A.: Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *Journal of Virology*, 2000; **74**(10):4933-7

291 Bär S. Takada A., Kawaoka Y., Alizon M.: Detection of cell-cell fusion mediated by Ebola virus glycoproteins. *Journal of Virology*, 2006; **80**(6):2815-22

292 Ruiz-Argüello M.B. Goñi F.M., Pereira F.B., Nieva J.L.: Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of Ebola virus. *Journal of Virology*, 1998; **72**(3):1775-81

293 Chan S.Y. Empig C.J., Welte F.J., Speck R.F., Schmaljohn A., Kreisberg J.F., Goldsmith M.A.: Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell.*, 2001; **106**(1):117-26

294 Empig C.J. Goldsmith M.A.: Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *Journal of Virology*, 2002; **76**(10):5266-70

295 Simmons G. Rennekamp A.J., Chai N., Vandenberghe L.H., Riley J.L., Bates P.: Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of Virology*, 2003; **77**(24):13433-8

296 Gallaher W.R.: Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell*, 1996; **85**(477-8

297 Takada A. Fujioka K., Tsuiji M., Morikawa A., Higashi N., Ebihara H., Kobasa D., Feldmann H., Irimura T., Kawaoka Y.: Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of Virology*, 2004; **78**(6):2943-7

298 Chandran K. Sullivan N.J., Feldor U., Whelan S.P., Cunningham J.M.: Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science*, 2005; **308**(5728):1643-5

299 Schornberg K. Matsuyama S., Kabsch K., Delos S., Bouton A., White J.: Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola Virus Glycoprotein. *Journal of Virology*, 2006; **80**(8):4174-8

300 Shimojima M. Takada A., Ebihara H., Neumann G., Fujioka K., Irimura T., Jones S., Feldmann H., Kawaoka Y.: Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J. Virol.*, 2006; **80**(20):10109-16

301 Yonezawa A. Cavrois M., Greene W.C.: Studies of Ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: Involvment of cytoskeletal proteins and enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha. *Journal of Virology*, 2005; **79**(2):918-26

302 Han Z. Licata J.M., Paragas J., Harty R.N.: Permeabilization of the plasma membrane by Ebola virus GP2. *Virus Genes.*, 2006; **34**(3):273-81

303 Mpanju O.M. Towner J.S., Dover J.E., Nichol S.T., Wilson C.A.: Identification of two amino acid residues on Ebola virus glycoprotein 1 critical for cell entry. *Virus Res.*, 2006; **121**(2):205-14

304 Sanchez A. Kiley M.P.: Identification and analysis of Ebola virus messenger RNA. *Virology*, 1987; **157**(2):414-20

305 Weik M. Enterlein S., Schlenz K., Mülhberger E.: The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *Journal of Virology*, 2005; **79**(16):10660-71

306 Muller S. Moller P., Bick M.J., Wurr S., Becker S., Gunther S., Kummerer B.M.: Inhibition of filovirus replication by the zinc finger antiviral protein. *J Virol.*, 2007; **81**(5):2391-400

307 Noda T. Aoyama K., Sagara H., Kida H., Kawaoka Y.: Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005; **67**(3):325-8

308 Huang Y. Xu L., Sun Y., Nabel G.J.: The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol. Cell*, 2002; **10**(2):307-16

309 Johnson R.F. McCarthy S.E., Godlewski P.J., Harty R.N.: Ebola virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA virus-like particles. *Journal of Virology*, 2006; **80**(11):5135-44

310 McCarthy S.E. Licata J.M., Harty R.N.: A luciferase-based budding assay for Ebola virus. *J Virol Methods*, 2006; **137**(1):115-9

311 Licata J.M. Johnson R.F., Han Z., Harty R.N.: Contribution of Ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Journal of Virology*, 2004; **78**(14):7344-51

312 Sänger C. Mühlberger E., Ryabchikova E., Kolesnikova L., Klenk H-D., Becker S.: Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, 2001; **75**(3):1274-83

313 Malashkevich V.N. Schneider B.J., McNally M.L., Milhollen M.A., Pang J.X., Kim P.S.: Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9 A resolution. *PNAS*, 1999; **96**(2662-7

314 Strack B. Calistri A., Accola M.A., Palù G., Göttlinger H.G.: A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *PNAS*, 2000; **97**(24):13063-8

315 Terrell J. Shih S., Dunn R., Hicke L.: A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell*, 1998; **1**(2):193-202

316 Shih S.C. Sloper-Mould K.E., Hicke L.: Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.*, 2000; **19**(2):187-98

317 Hicke L.: Ubiquitin-dependent internalization and downregulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.*, 1997; **11**(14):1215-26

318 Patnaik A. Chau V., Wills J.W.: Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *PNAS*, 2000; **97**(24):13069-74

319 Freed E.O.: Viral late domains. *Journal of Virology*, 2002; **76**(10):4679-87

320 Martin-Serrano J. Perez-Cabalerro D., Bieniasz P.D.: Context-dependent effects of L-domains and ubiquitination on viral budding. *Journal of Virology*, 2004; **78**(11):5554-63

321 Harty R.N. Brown M.E., Wang G., Huibregtse J., Hayes F.P.: A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *PNAS*, 2000; **97**(25):13871-6

322 Bryant N.J. Stevens T.H.: Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Protein transport pathways to the yeast vacuole. . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998; **62**(1):230-47

323 Harty R.N. Brown M.E., McGettigan J.P., Wang G., Jayakar H.R., Huibregtse J.M., Whitt M.A., Schnell M.J.: Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: a Budding Interaction. *J. Virol.*, 2001; **75**(22):10623-9

324 Timmins J. Schoehn G., Ricard-Blum S., Scianimanico S., Vernet T., Ruigrok R.W.H., Weissenhorn W.: Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *Journal of Molecular Biology*, 2003; **326**(493-502

325 Yasuda J. Nakao M., Kawaoka Y., Shida H.: Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *Journal of Virology*, 2003; **77**(18):9987-92

326 Garrus J.E. von Schwedler U.K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., Wettstein D.A., Stray K.M., Côté M., Rich R.L., Myszka D.G.,

Sundquist W.I.: Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell.*, 2001; **107**(55-65

327 Martin-Serrano J. Zang T., Bieniasz P.D.: HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.*, 2001; **7**(12):1313-9

328 Bavari S. Bosio C.M., Wiegand E., Ruthel G., Will A.B., Geisbert T.W., Hevey M., Schmaljohn C., Schmaljohn A., Aman M.J.: Lipid raft microdomains: A gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *Journal of Experimental Medicine*, 2002; **195**(5):593-602

329 Kolesnikova L. Berghöfer B., Bamberg S., Becker S.: Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *Journal of Virology*, 2004; **78**(22):12277-87

330 Kolesnikova L. Bamberg S., Berghöfer B., Becker S.: The matrix protein of Marburg virus is transported to the plamsa membrane along cellular membranes: Exploiting the retrograde late endosomal pathway. *Journal of Virology*, 2004; **78**(5):2382-93

331 Sanchez A. Kiley M.P., Holloway B.P., McCormick J.B., Auperin D.D.: The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and *in vitro* expression. *Virology*, 1989; **170**(81-91

332 Elliott L.H. Kiley M.P., McCormick J.B.: Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, 1985; **147**(1):169-76

333 Elliott L.H. Sanchez A., Holloway B.P., Kiley M.P., McCormick J.B.: Ebola protein analyses for the determination of genetic organization. *Arch Virol.*, 1993; **133**(3-4):423-36

334 Becker S. Huppertz S., Klenk H-D., Feldmann H.: The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J. Gen. Virol.*, 1994; **75**(809-18

335 Sanchez A. Kiley M.P., Klenk H-D., Feldmann H.: Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negatice-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 1992; **73**(347-57

336 Mühlberger E. Weik M., Volchkov V.E., Klenk H-D., Becker S.: Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *Journal of Virology*, 1999; **73**(3):

337 Ebihara H. Takada A., Kobasa D., Jones S., Neumann G., Theriault S., Bray M., Feldmann H., Kawaoka Y.: Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog*, 2006; **2**(7):e73

338 Watanabe S. Noda T., Kawaoka Y.: Functional mapping of the Nucleoprotein of Ebola virus. *Journal of Virology*, 2006; **80**(8):3743-51

339 Noda T. Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y.: Mapping of the VP40-binding regions of the Nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol.*, 2007;

340 Bukreyev A.A. Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V.: The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. *FEBS Lett.*, 1993; **322**(1):41-6

341 Basler C.F. Mikulasova A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Mühlberger E., Bray M., Klenk H-D., Palese P., Garcia-Sastre A.: The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of Interferon Regulatory Factor 3. *Journal of Virology*, 2003; **77**(14):7945-56

342 Cardenas W.B. Loo Y-M., Gale Jr M., Hartman A.L., Kimberlin C.R., Martinez-Sobrido L., Ollmann Saphire E., Basler C.F.: Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *Journal of Virology*, 2006; **80**(11):5168-78

343 Feng Z. Cerveny M., Yan Z., He B.: The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol.*, 2007; **81**(1):182-92

344 Hartman A.L. Dover J.E., Towner J.S., Nichol S.T.: Reverse genetic generation of recombinant Zaire Ebola viruses containing disrupted IRF-3 inhibitory domains results in attenuated virus growth in vitro and higher levels of IRF-3 activation without inhibiting viral transcription or replication. *Journal of Virology*, 2006; **80**(13):6430-40

345 Kiley M.P. Cox N.J., Elliott L.H., Sanchez A., DeFries R., Buchmeier M.J., Richmann D.D., McCormick J.B.: Physicochemical properties of Marburg virus: Evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *Journal of General Virology*, 1988; **69**(1957-67

346 Noda T. Sagara H., Suzuki E., Takada A., Kida H., Kawaoka Y.: Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *Journal of Virology*, 2002; **76**(10):4855-65

347 Hoenen T. Volchkov V., Kolesnikova L., Mittler E., Timmins J., Ottmann M., Reynard O., Becker S., Weissenhorn W.: VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *Journal of Virology*, 2005; **79**(3):1898-905

348 Neumann G. Ebihara H., Takada A., Noda T., Kobasa D., Jasenosky L.D., Watanabe S., Kim J.H., Feldmann H., Kawaoka Y.: Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, 2005; **79**(16):10300-7

349 Urata S. Noda T., Kawaoka Y., Morikaa S., Yokosawa H., Yasuda J.: Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J. Virol.*, 2007; **81**(9):4895-9

350 Hartlieb B. Muziol T., Weissenhorn W., Becker S.: Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; **104**(2):624-9

351 Han Z. Boshra H., Sunyer J.O., Zwiers S.H., Paragas J., Harty R.N.: Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. *Journal of Virology*, 2003; **77**(3):1793-800

352 Watanabe S. Watanabe T., Noda T., Takada A., Feldmann H., Jasenosky L.D., Kawaoka Y.: Production of novel Ebola virus-like particles from cDNAs: An alternative to Ebola virus generation by reverse genetics. *Journal of Virology*, 2004; **78**(2):999-1005

353 Hoenen T. Groseth A., Kolesnikova L., Theriault S., Ebihara H., Hartlieb B., Bamberg S., Feldmann H., Ströher U., Becker S.: Infection of naïve target cells with virus-like particles: Implications for the function of Ebola virus VP24. *Journal of Virology*, 2006; **80**(14):7260-4

354 Reid S.P. Leung L.W., Hartman A.L., Martinez O., Shaw M.L., Carbonnelle C., Volchkov V.E., Nichol S.T., Basler C.F.: Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha-1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *Journal of Virology*, 2006; **80**(11):5156-67

355 Volchkov V.E. Volchkova V.A., Chepurnov A.A., Blinov V.M., Dolnik O., Netesov S.V., Feldmann H.: Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *Journal of General Virology*, 1999; **80**(355-62

356 Mühlberger E. Sanchez A., Randolf A., Will C., Kiley M.P., Klenk H-D., Feldmann H.: The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: Homologies with Paramyxoviruses and Rhabdoviruses. *Virology*, 1992; **187**(534-47

357 Volchkov V.E. Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H-D.: GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and Vaccinia Virus polymerases. *Virology*, 1995; **214**(421-30

358 Volchkov V.E.: Processing of the Ebola virus glycoprotein. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1999; **235**(35-47

359 Volchkov V.E. Volchkova V.A., Mühlnerger E., Kolesnikova L.V., Weik M., Dolnik O., Klenk H-D.: Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science*, 2001; **291**(1965-9

360 Feldmann H. Will C., Schikore M., Slenczka W., Klenk HD.: Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology*, 1991; **182**(1):353-6

361 Becker S. Klenk H-D., Mühlberger E.: Intracellular transport and processing of the Marburg virus surface protein in Vertebrate and Insect cells. *Virology*, 1996; **225**(145-55

362 Feldmann H. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Ströher U., Klenk H-D.: Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins. *Journal of General Virology*, 2001; **82**(2839-48

363 Jeffers S.A. Sanders D.A., Sanchez A.: Covalent modifications of the Ebola virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 2002; **76**(24):12463-72

364 Volchkov V.E. Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H-D.: Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *PNAS*, 1998; **95**(5762-7

365 Wool-Lewis R.J. Bates P.: Endoproteolytic processing of the Ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *Journal of Virology*, 1999; **73**(2):1419-26

366 Neumann G. Feldmann H., Watanabe S., Lukashevich I., Kawaoka Y.: Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *Journal of Virology*, 2002; **76**(1):406-10

367 Neumann G. Geisbert T.W., Ebihara H., Geisbert J.B., Daddario-Dicaprio K.M., Feldmann H., Kawaoka Y.: Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates. *J Virol.*, 2007; **81**(6):2995-8

368 Weissenhorn W. Carfi A., Lee K-H., Skehel J.J., Wiley D.C.: Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Molecular Cell*, 1998; **2**(605-16

369 Malashkevich V.N. Chan D.C., Chutkowski C.T., Kim P.S.: Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: Conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides. *PNAS*, 1998; **95**(9134-9

370 Weissenhorn W. Calder L.J., Wharton S.A., Skehel J.J., Wiley D.C.: The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *PNAS*, 1998; **95**(6032-6

371 Watanabe S. Takada A., Watanabe T., Ito H., Kida H., Kawaoka Y.: Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 2000; **74**(21):10194-201

372 Adam B. Lins L., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R.: Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *Journal of Virology*, 2004; **78**(4):2131-6

373 Freitas M.S. Gaspar L.P., Lorenzoni M., Almeida F.C., Tinoco L.W., Almeida M.S., Maia L.F., Degrève L., Valente A.P., Silva J.L.: Structure of the Ebola

fusion peptide in a membrane-mimetic environment and the interaction with lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 2007; **xxxx**(xxxx):xxxx

374 Ito H. Watanabe S., Sanchez A., Whitt M.A., Kawaoka Y.: Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 1999; **73**(10):8907-12

375 Brindley M.A. Hughes L., Ruiz A., McCray P.B., Sanchez A., Sanders D.A., Maury W.: Ebola virus glycoprotein 1: identification of residues important for binding and post binding events. *J. Virol.*, 2007; **81**(14):7702-9

376 Wahl-Jensen V.M. Afanasieva T.A., Seebach J., Ströher U., Feldmann H., Schnittler H-J.: Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. *Journal of Virology*, 2005; **79**(16):10442-50

377 Yang Z-Y. Delgado R., Xu L., Todd R.F., Nabel E.G., Sanchez A., Nabel G.J.: Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science*, 1998; **279**(1034-7

378 Ito H. Watanabe S., Takada A., Kawaoka Y.: Ebola virus glycoprotein: Proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 2001; **75**(3):1576-80

379 Chan S.Y. Ma M.C., Goldsmith M.A.: Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *Journal of General Virology*, 2000; **81**(2155-9

380 Simmons G. Wool-Lewis R.J., Baribaud F., Netter R.C., Bates P.: Ebola virus glycoproteins induce global surfce protein down-modulation and loss of cell adherence. *Journal of Virology*, 2002; **76**(5):2518-28

381 Sullivan N.J. Peterson M., Yang Z-Y., Kong W-P., Duckers H., Nabel E., Nabel G.J.: Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependant protein-trafficking pathway. *Journal of Virology*, 2005; **79**(1):547-53

382 Kindzelskii A.L. Yang Z-Y., Nabel G.J., Todd III R.F., Petty H.R.: Ebola virus secretory glycoprotein (sGP) diminishes FcgammaRIIIB-to-CR3 proximity on neutrophils. *Journal of Immunology*, 2000; **164**(2):953-8

383 Volchkov V.E. Volchkova V.A., Slenczka W., Klenk H-D, Feldmann H.: Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology*, 1998; **245**(110-9

384 Sanchez A. Yang Z-Y., Xu L., Nabel G.J., Crews T., Peters C.J.: Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *Journal of Virology*, 1998; **72**(8):6442-7

385 Volchkova V.A. Feldmann H., Klenk H-D., Volchkov V.E.: The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology*, 1998; **250**(408-14

386 Falzarano D. Krokhin O., Wahl-Jensen V., Seebach J., Wolf K., Schnittler H.J., Feldmann H.: Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of Ebola virus. *Chembiochem.*, 2006; **7**(10):1605-11

387 Dolnik O. Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Ströher H-D., Volchkov V.: Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO Journal*, 2004; **23**(2175-84

388 Volchkova V.A. Klenk H-D., Volchkov V.E.: Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology*, 1999; **265**(1):164-71

389 Wahl-Jensen V. Kurz S.K., Hazelton P.R., Schnittler H.J., Stroher U., Burton D.R., Feldmann H.: Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. *Journal of Virology*, 2005; **79**(4):2413-9

390 Georges-Courbot M.C. Sanchez A., Lu C.Y., Baize S., Leroy E., Lansout-Soukate J., Tevi-Benissan C., Georges A.J., Trappier S.G., Zaki S.R., Swanepoel R., Leman P.A., Rollin P.E., Peters C.J., Nichol S.T., Ksiazek T.G.: Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. *Emerging Infectious Diseases*, 1997; **3**(1):59-62

391 Suzuki Y. and Gojobori T.: The origin and evolution of Ebola and marburg viruses. *Mol. Biol. Evol.*, 1997; **14**(8):800-6

392 Walsh P.D. Biek R., Real L.A.: Wave-like spread of Ebola Zaire. *PLoS Biology*, 2005; **3**(11):e371

393 Kumar S. Tamura K., Nei M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004; **5**(150-63

394 Ronquist F. Huelsenbeck J.P.: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003; **19**(12):1572-4

395 Schell D.: Fast quantification of mouse IgG from cell culture supernatants. *Animal Cell Technology* 1994; **94**(366-8

396 Hartmann H. Lübbers B., Cararetto M., Bautsch W., Klos A., Köhl J. : Rapid quantification of C3a and C5a using a combination of chromatographic and immunoassay procedures. *J. Immunol. Meth.*, 1993; **166**(35-44

397 Peters C.J. LeDuc J.W.: An introduction to Ebola: The virus and the disease. *J Infect Dis*, 1999; **178**(ix-xvi

398 Formenty P. Leroy E.M., Epelboin A., Libama F., Lenzi M., Sudeck H., Yaba P., Allarangar Y., Boumandouki P., Nkounkou V.B., Drosten C., Grolla A., Feldmann H., Roth C.: Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus Hemorrhagic Fever in the Republic of Congo. *Clin Infect Dis*, 2006; **42**(1521-26

399 Stroher U. Feldmann H.: Progress towards the treatment of Ebola haemorrhagic fever. *Expert Opin Investig Drugs.*, 2006; **15**(12):1523-35

400 Feldmann H. Jones S.M., Schnittler H.J., Geisbert T.: Therapy and prophylaxis of Ebola virus infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; **6**(8):823-30

401 Jenkins G.M. Rambaut A., Pybus O.G., Holmes E.C.: Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.*, 2002; **54**(2):156-65

402 Charrel R.N. Feldmann H., Fulhorst C.F., Khelifa R., de Chesse R., de Lamballerie X.: Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *BBRC*, 2002; **296**(1118-24

403 Weaver S.C. Salas R.A., de Manzione N., Fulhorst C.F., Travasos da Rosa A.P.A., Duno G., Utrera A., Mills J.N., Ksiazek T.G., Tovar D., Guzman H., Kang W., Tesh R.B.: Extreme genetic diversity among Pirital virus (*Arenaviridae*) isolates from western Venezuela. *Virology*, 2001; **285**(110-8

404 Archer A.M. Rico-Hesse R.: High genetic divergence and recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology*, 2002; **304**(274-81

405 Sibold C. Meisel H., Krüger D.H., Labuda M., Lysy J., Kozuch O., Pejcoch M., Vaheri A., Plyusnin A.: Recombination in Tula Hantavirus evolution: Analysis of genetic lineages from Slovakia. *Journal of Virology*, 1999; **73**(1):667-75

406 Bourhy H. Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., Tordo N., Zmudzinski J.F., Holmes E.C.: Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*, 1999; **80**(2545-57

407 Bausch D.G. Nichol S.T., Muyembe-Tamfum J.J., Borchert M., Rollin P.E., Sleurs H., Campbell P., Tshioko F.K., Roth C., Colebunders R., Pirard P., Mardel S., Olinda L.A., Zeller H., Tshomba A., Kulidri A., Libande M.L., et al.: Marburg Hemorrhagic Fever associated with multiple genetic lineages of virus. *N Engl J Med*, 2006; **355**(909-19

408 Becker S. Feldmann H., Will C., Slenczka W.: Evidence for occurrence of filovirus antibodies in human and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide ? *Med Microbiol Immunol*, 1992; **181**(43-55

409 Leroy E.M. Telfer P., Kumulungui B., Yaba P., Rouquet P., Roques P., Gonzalez J-P., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Nerrienet E.: A serological survey of Ebola virus infection in central african nonhuman primates. *Journal of Infectious Diseases*, 2004; **190**(1895-9

410 Jarvis T.C. Kirkegaard K.: Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.*, 1992; **11**(8):3135-45

411 Lai M.M.C.: RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.*, 1992; **56**(1):61-79

412 Brunier D. Michel B., Ehrlich S.D.: Copy choice illegitimate DNA recombination. *Cell.*, 1988; **52**(6):883-92

413 Meselson M. Weigle J.J.: Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *PNAS*, 1961; **47**(857-68

414 Chare E.R. Gould E.A., Holmes E.C.: Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *Journal of General Virology*, 2003; **84**(2691-703

415 Worobey M. Holmes E.C.: Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 1999; **80**(2535-43

416 Gmyl A.P. Korshenko S.A., Belousov E.V., Khitrina A.V., Agol V.I.: Nonreplicative homologous RNA recombinaison: Promiscuous joining of RNA pieces ? *RNA*, 2003; **9**(1221-31

417 Gallei A. Pankraz A., Thiel H-J., Becher P.: RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *Journal of Virology*, 2004; **78**(12):6271-81

418 Hahn C.S. Lustig S., Strauss E.G., Strauss J.H.: Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *PNAS*, 1988; **85**(5997-6001

419 Holmes E.C. Worobey M., Rambaut A.: Phylogenetic evidence for recombination in Dengue Virus. *Mol. Biol. Evol.*, 1999; **16**(3):405-9

420 Bowen M.D. Trappier S.G., Sanchez A.J., Meyer R.F., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Dunster L.M., Peters C.J., Ksiazek T.G., Nichol S.T., and the RVF Task Force: A reassortant Bunyavirus isolated from acuter hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*, 2001; **291**(185-90

421 Lukashev A.N.: Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.*, 2005; **86**(2333-8

422 Gibbs M.J. Armstrong J.S., Gibbs A.J.: Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish Flu". *Science*, 2001; **293**(1842-5

423 Worobey M. Rambaut A., Pybus O.G., Robertson D.L.: Questioning the Evidence for Genetic Recombination in the 1918 "Spanish Flu" Virus. *Science*, 2002; **296**(211a