



Thèse de Doctorat d'Etat

(Université de Ouagadougou)

Spécialité : Sciences Biologiques Appliquées

Option : Biochimie et Microbiologie

Présentée par :

Brice Serge KUMULUNGUI

Docteur de 3^{ème} cycle

Recherche du réservoir du virus Ebola dans les forêts d'Afrique Centrale

Soutenue publiquement, le

devant le jury composé de :

Président : Pr Francis FUMOUX, Université de la Méditerranée

Rapporteurs : Pr Jean Paul Gonzalez, IRD

Pr Lassana SANGARE, Université de Ouagadougou

Membres : Pr Alfred S. TRAORE, Université de Ouagadougou

Dr Eric Leroy, CIRMF / IRD, Directeur de Thèse

Pr Rasmata OUEDRAOGO, Université de Ouagadougou

Dédicace

Ce travail est dédié :

A

Toutes les personnes qui sont mortes ou qui ont été atteintes de la maladie Ebola.

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'Unité des Maladies Virales Emergentes du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (C.I.R.M.F.).

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à :

Monsieur le Professeur Philippe BLOT, Directeur Général du CIRMF, pour avoir accepté de financer cette thèse. Qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Eric LEROY, Directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité des Maladies Virales Emergentes et de m'avoir donné les moyens financiers et matériel de réaliser ce travail. Merci de m'avoir encadré, soutenu par ton enthousiasme et tes conseils avisés et constructifs. Merci pour tout.

Monsieur le Professeur Alfred S. TRAORE, Co Directeur de cette thèse, pour m'avoir initié à la recherche, et pour avoir autorisé à m'inscrire à l'Université de Ouagadougou, pour la préparation de cette thèse.

Messieurs les Professeurs Francis FUMOUX, Jean Paul GONZALEZ et Lassana SANGARE, pour avoir accepté d'instruire ce document en tant que Rapporteur.

Madame le Professeur Rasmata OUEDRAOGO née TRAORE, pour avoir accepté de faire parti de ce jury.

Monsieur le Docteur Xavier POURRUT, pour sa contribution à l'étude sérologique.

Monsieur le Docteur Pierre ROUQUET pour sa contribution à l'étude de terrain.

Mademoiselle Tatiana WITTMANN, pour sa contribution aux tentatives d'isolement viral.

Messieurs Philippe YABA et André DELICAT, pour leur contribution aux études de terrain et de laboratoire. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde reconnaissance.

A tous **mes collègues et amis** du CIRMF et de l'Université de Ouagadougou.

A **l'ensemble du personnel** du CIRMF, pour son soutien, son amitié et surtout, pour sa disponibilité.

A **ma famille**, ma mère, mes frères et sœurs, mes tantes, oncles et cousins pour leur soutien moral.

A **ma femme** Armelle et mes **enfants** Océane, Marie Floriane et Marc Ely pour le bonheur quotidien qu'ils m'ont procuré tout au long de ces années malgré mes absences fréquentes. Ils ont su m'apporter le réconfort que j'attendais lorsque j'en avais besoin.

Résumé

Le virus Ebola (famille des *Filoviridae*), a été identifié pour la première fois en 1976 en République Démocratique du Congo (ex-Zaïre). Il est à l'origine de plusieurs épidémies mortelles en Afrique centrale. Il existe quatre espèces de ce virus dont trois sévissent sur le continent africain. L'espèce zaïre, souche la plus pathogène pour l'homme, est responsable des huit épidémies ayant touché le Gabon et la République du Congo depuis 1995. L'infection par cette espèce se manifeste chez l'homme par une fièvre hémorragique qui entraîne la mort en quelques jours dans 80 % des cas. Depuis 1976, quatorze épidémies d'Ebola, dont dix dues à *zaïre Ebolavirus*, se sont succédées en Afrique, provoquant environ 1 850 cas dont 1 300 morts.

Le virus se transmet à l'homme notamment par contact direct avec des carcasses de primates infectés. Si ces animaux sont à l'origine de l'infection humaine, ils ne sont pas le réservoir du virus. Les grands singes développent la maladie et décèdent en quelques jours après avoir été, eux-mêmes, contaminés au contact du réservoir. De nombreuses études, effectuées depuis 1976 afin d'identifier ce réservoir, se sont toutes soldées par un échec.

Les épidémies humaines apparues depuis 2001 ont été liées à des flambées virales concomitantes chez plusieurs espèces animales dont les chimpanzés, les gorilles et les céphalophes. Pendant ces épisodes épidémiques, nous avons capturé entre 2001 et 2003, dans la région frontalière du Gabon et de la République du Congo, environ mille petits vertébrés sains (rongeurs, musaraignes, chauves-souris, oiseaux et écureuils) aux alentours de carcasses de primates infectés. Nous avons ensuite procédé à de multiples analyses : recherche d'anticorps spécifiques du virus Ebola dans le sérum, recherche de fragments du génome viral dans certains organes, isolement du virus sur des lignées cellulaires sensibles, immunohistochimie sur coupes d'organes. Pour la première fois, nous avons identifié des chauves-souris frugivores comme réservoir potentiel du virus Ebola. Nous avons détecté des anticorps spécifiques de *zaïre Ebolavirus* dans le sérum de trois espèces de chauves-souris : *hypsignasthus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata*. Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence la présence de séquences d'ARN viral dans le foie et la rate de ces mêmes animaux. Ceci montre donc que ces chauves-souris sont porteuses du virus Ebola sans être malades, ce qui les désigne comme des hôtes naturels potentiels du virus Ebola.

Mots clés : *Virus Ebola, Primates, Réservoir, Chauves-souris*

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Généralités.....	7
<i>Première partie : Généralités sur le virus Ebola</i>	
I. Epidémiologie des fièvres hémorragiques à virus Ebola	
I.1. Historique des épidémies.....	8
I.2 Transmission du virus Ebola.....	17
I.3 Caractéristiques cliniques.....	18
I.4 Diagnostic de l'infection Ebola.....	22
I.5 Moyens de lutte contre l'infection Ebola.....	27
II. Biologie du Virus Ebola	
II.1. Le virus.....	32
II.2 Génétique et phylogénie.....	34
II.3. Physiopathologie de l'infection Ebola.....	35
II.4. Les protéines du virus Ebola.....	37
III. Circulation du virus Ebola dans la nature	
III.1 Diffusion de la maladie dans les populations sauvages.....	40
III.2 Emergence du virus chez les animaux sensibles au virus.....	42
III.3 Travaux effectués sur la recherche du réservoir du virus Ebola.....	44

Deuxième partie : Production scientifique

I. Introduction générale	48
II. Méthodologie	49
II.1. Etude de terrain.....	49
II.2. Etude au laboratoire.....	51
III. Résultats	
III.1 Surveillance des mortalités animales (Article1).....	52
III.2 Diffusion de la maladie Ebola chez les espèces sensibles (Article 2).....	62
III.3 La place du chien dans la propagation des épidémies (Article 3).....	69
III.4 L'histoire naturelle du virus Ebola (Article 4).....	77
III.5 La chauve-souris frugivore : potentiel candidat réservoir (Article 5)... ..	90
III.6 Autres articles.....	94
IV. Discussion	96
V. Conclusion générale et perspectives	105
VI. Références Bibliographiques	108

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

CDC : Center of Control Disease

CIRMF : Centre International de Recherches Médicales de Franceville

EBOV : Virus Ebola

EBOV-S : espèce Soudan

EBOV-Z : espèce Zaïre

EBOV-CI : espèce Côte d'Ivoire

EBOV-R : espèce Reston

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FHV : Fièvre Hémorragique Virale

IgG : Immunoglobuline de type G

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Séquence de lecture ouverte

RCA : République de Centre Afrique

RDC : République Démocratique du Congo

SPM : Système des Phagocytes Mononucléés

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Introduction

Le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (C.I.R.M.F.) a été créé en 1979 à l'initiative du Président de la République Gabonaise, son Excellence El Hadj Omar BONGO ONDIMBA et du Président d'Elf Aquitaine, monsieur Pierre GUILLAUMAT. Le CIRMF est situé à Franceville, au Sud Est du Gabon, dans la province du Haut Ogooué.

Initialement orienté sur les pathologies parasitaires et notamment leurs conséquences sur la fécondité humaine, les thématiques de recherches du CIRMF se sont au cours des années élargies aux études fondamentales et épidémiologiques concernant les problématiques majeures d'Afrique Centrale ; notamment le paludisme, les rétrovirus et les fièvres hémorragiques virales.

En complément des activités de recherches, le CIRMF accueille de nombreux jeunes doctorants africains, européens et américains pour effectuer des stages entrant dans la préparation des thèses scientifiques, médicales et vétérinaires.

Le CIRMF apporte également un soutien en santé publique grâce à la présence en son sein d'un laboratoire d'analyses médicales impliqué dans les analyses hématologiques, biochimiques, mais aussi virologiques et parasitaires.

Le Centre dispose de nombreux laboratoires équipés d'un plateau technique moderne, dont un laboratoire de classe 3 (haute sécurité pour le VIH) et un laboratoire permettant de travailler sur des agents à très fort pouvoir pathogène tels que le virus Ebola (pathogène dit de classe 4).

Le CIRMF dispose en plus d'un centre de Primatologie, unique en Afrique, avec plus de 500 Primates appartenant à une dizaine d'espèces et d'une station d'étude de terrain située à la Lopé au Centre du Gabon. Ces deux structures sont mises à la disposition des chercheurs.

Les activités scientifiques du CIRMF portent sur quatre (4) grandes thématiques de recherches : les hémoglobinopathies, la génétique des écosystèmes tropicaux, les maladies parasitaires, et les maladies virales.

Les hémoglobinopathies sont des maladies génétiques que l'on appelle couramment la drépanocytose. Les travaux effectués au CIRMF dans cette thématique, portent sur l'étude du polymorphisme allélique des gènes de

prédisposition aux formes graves de la maladie dans les populations noires africaines.

Les travaux de recherche sur les écosystèmes tropicaux portent sur la génétique et le comportement de certaines populations animales sauvages (éléphants, mandrills, chimpanzés, potamochères...), de même que sur la génétique des populations végétales (Okoumé) et sur la sélection sexuelle chez le mandrill.

Parmi les maladies parasitaires, on distingue le paludisme, dont les études portent sur la physiopathologie des souches plasmodiales, la caractérisation des souches plasmodiales simiennes et la coinfection paludisme/hépatite B et C.

Pour la trypanosomiase, les travaux de recherches portent sur la recherche des marqueurs des différents stades de la maladie et sur les mécanismes de l'atteinte cérébrale chez le singe vert.

Pour la filariose à *Loa loa*, les études portent sur la mise au point d'un test de diagnostic basé sur la détection d'antigènes circulants et sur les mécanismes immunitaires de l'infection.

Les recherches sur les maladies virales s'effectuent au sein du laboratoire de rétrovirologie et celui des maladies virales émergentes.

Au laboratoire de Rétrovirologie, les études portent sur la prévalence et la diversité des virus humains (HIV, HTLV, HBV et HCV) et simiens (SIV et STLV), la physiopathologie de l'infection lentivirale (SIV et VIH), et sur des essais vaccinaux et prophylactiques (microbicides) contre le VIH chez les primates non humains.

Dans le laboratoire des maladies émergentes, au sein duquel, j'ai effectué mes travaux, les études portent principalement sur trois grands programmes : la santé publique, la physiopathologie de l'infection par le virus Ebola et le cycle naturel du virus Ebola.

En santé publique, le CIRMF est le laboratoire national de référence, pour le diagnostic des fièvres hémorragiques virales et le développement de nouvelles méthodes de diagnostic de l'infection Ebola. Il est également un Centre

partenaire de l'OMS pour des recherches sur les maladies infectieuses. C'est ainsi, qu'outre les méthodes classiques de diagnostic (antigène capture, sérologie, PCR), effectuées sur des prélèvements sanguins et des biopsies des cadavres animaux, ces méthodes ont été testées avec succès à partir des prélèvements de salive.

Plusieurs pays des régions équatoriales de l'Afrique sont touchés depuis près de trois décennies par des épidémies de fièvre hémorragique à virus Ebola. Ce virus, à la forme caractéristique de filament, possède pour matériel génétique de l'ARN, et est subdivisé en quatre espèces dont trois sévissent en Afrique. L'infection de l'homme par le virus Ebola s'exprime globalement par un syndrome fébrile aigu accompagné de troubles digestifs graves et de signes hémorragiques divers et multiples. Cette maladie est une zoonose transmise à l'homme de manière accidentelle et épisodique par contact direct avec un animal infecté, et se manifeste le plus souvent sous la forme de flambées épidémiques tuant entre 50 et 80% de personnes malades.

Depuis l'apparition de la fièvre hémorragique à virus Ebola au Gabon et en République du Congo, le CIRMF, en collaboration avec les autorités sanitaires de ces deux pays, et l'appui des équipes internationales (OMS, Croix rouge, etc.) se sont mobilisés pour circonscrire les épidémies, en optant pour des mesures de contrôles efficaces telles que l'identification et le suivi des cas contacts, la mobilisation des fonds destinés à soutenir les recherches sur l'infection Ebola.

Les recherches effectuées au sein du laboratoire des maladies émergentes portent sur : l'épidémiologie, la physiopathologie, la virologie et l'histoire naturelle du virus Ebola.

En épidémiologie, des enquêtes sérologiques, basées sur la recherche d'IgG spécifiques des antigènes Ebola chez les humains et les primates non humains sont effectuées, afin d'évaluer la séroprévalence du virus Ebola dans les forêts d'Afrique centrale. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que le virus circule vraisemblablement depuis longtemps dans les forêts d'Afrique centrale

et que ce virus provoque chez les grands singes la même proportion d'infections létales et non létales que chez l'homme (Leroy & al., 2004b).

En physiopathologie, les recherches portent sur la pathogénicité des souches virales, notamment la comparaison des charges virales infectieuses et non infectieuses. Le but de cette étude est de savoir si la charge virale infectieuse est liée à l'évolution clinique des patients. Cette étude consiste donc à déterminer les charges virales non infectieuses (c'est-à-dire totales par quantification de matériel génétique), et les charges virales infectieuses (c'est-à-dire la quantité de virus capables d'infecter des lignées cellulaires) à la fois chez les patients qui survivent de l'infection et chez ceux qui décèdent.

En virologie, Les travaux portent sur la caractérisation génétique et l'étude phylogénique des souches virales isolées chez l'homme et les grands primates. Cette étude a pour objectif de suivre l'évolution du virus, de détecter et de caractériser d'éventuelles souches moins pathogènes. Nous avons ainsi montré que les dernières épidémies étaient en fait constituées chacune de plusieurs chaînes épidémiques résultant chacune d'une introduction à partir de sources animales différentes (Leroy & al., 2004a).

La dernière étude virologique, consiste à explorer les mécanismes immunitaires impliqués dans l'infection par le virus Ebola. Les études antérieures ont montré que les réponses cytotoxiques (T et /ou NK) jouent un rôle majeur dans l'évolution fatale ou non fatale de l'infection de l'homme par le virus Ebola. La caractérisation phénotypique de ces réponses, l'exploration des mécanismes qui les gouvernent et les régulent, peuvent s'avérer nécessaire dans la compréhension de la maladie.

Le cycle naturel ou histoire naturelle du virus Ebola, peut se définir comme l'ensemble des modalités de circulation du virus dans son milieu naturel depuis son hôte (ou réservoir) jusqu'à l'homme. Il comprend donc la circulation du virus au sein de son hôte naturel, le passage du virus de celui-ci à des espèces animales intermédiaires et sensibles au virus (c'est-à-dire développant une infection mortelle), et enfin la contamination de l'homme à partir de l'hôte

naturel ou à partir des espèces intermédiaires. De nombreuses études ont été initiées dans le but d'élucider les modalités de circulation du virus dans son milieu naturel ? La recherche du réservoir (hôte naturel) du virus ? L'identification des espèces animales sensibles ? Et les conditions du milieu propices aux transmissions interspécifiques ?

Malgré les avancées majeures observées ces dernières années dans la connaissance de l'histoire naturelle du virus Ebola et les connaissances acquises de nos jours sur cette terrible maladie, le réservoir du virus reste inconnu, de même que les conditions d'émergences de la maladie ne sont pas totalement élucidées.

Cette thèse s'inscrit dans la problématique de la recherche du réservoir, hôte naturel du virus Ebola, afin de comprendre les conditions d'apparition, de transmission et de propagation des épidémies. En pratique, nous allons rechercher des marqueurs d'infection par le virus Ebola chez différentes espèces animales afin de déterminer celles qui sont sensibles au virus et celles qui l'hébergent de manière asymptomatique. Nous parlerons d'un réseau de surveillance des mortalités animales que nous avons mis en place afin de détecter les épidémies chez d'autres espèces animales. On s'interroge sur le rôle des carnivores domestiques dans le déclenchement et/ou la propagation des épidémies d'Ebola, de même que nous chercherons à comprendre la distribution et la propagation du virus en milieu naturel.

Ce document de thèse se subdivise en deux grandes parties :

Dans une première étape, nous présenterons les connaissances acquises sur l'infection Ebola, notamment l'épidémiologie du virus, sa biologie, les aspects cliniques, le diagnostic et les moyens de lutte.

Dans une seconde étape, nous présenterons les résultats obtenus à partir des études de terrain et de laboratoire que nous avons effectuées, et publiés dans les revues scientifiques avec comité de lecture. Nous discuterons de ces résultats et évoquerons les conséquences majeures qui en découlent. Nous présenterons enfin, une conclusion et les perspectives de cette thèse.

Généralités

I. Epidémiologie des fièvres hémorragiques à virus Ebola

I.1 Historique des épidémies

Le virus Ebola est un virus à ARN monocaténaire, de polarité négative appartenant à la famille des *Filoviridae*. On distingue 4 espèces génétiquement différents : *Zaire*, *Soudan*, *Côte d'Ivoire* et *Reston*.

Ce virus est responsable des fièvres hémorragiques à la fois chez l'homme et chez certaines espèces animales (Gorilles et Chimpanzés) avec une mortalité élevée, souvent supérieure à 70 %. Sa transmission se fait généralement par contact étroit, d'abord Primates non humains infectés vers l'Homme et ensuite Homme à Homme.

Depuis sa première apparition en 1976 au Soudan et en République Démocratique du Congo (ex Zaïre), plusieurs épidémies à virus Ebola ont touché l'Afrique subsaharienne.

I.1.1 Apparition des épidémies à virus Ebola : la période 1976-1979.

Le virus Ebola fit sa première apparition au cours de deux épidémies concomitantes, l'une due à *soudan Ebolavirus* et l'autre à *Zaire Ebolavirus*.

La première épidémie est due à *soudan Ebolavirus* (Figure 1). Elle est apparue au Soudan, à la frontière avec la République Démocratique du Congo (RDC), principalement dans les villes de Nzara et de Maridi, et s'est étendue entre juin et novembre 1976. Le taux de mortalité de 53% associé à cette épidémie (284 malades dont 150 morts) est une caractéristique de l'espèce soudan (*Smith, 1978b*).

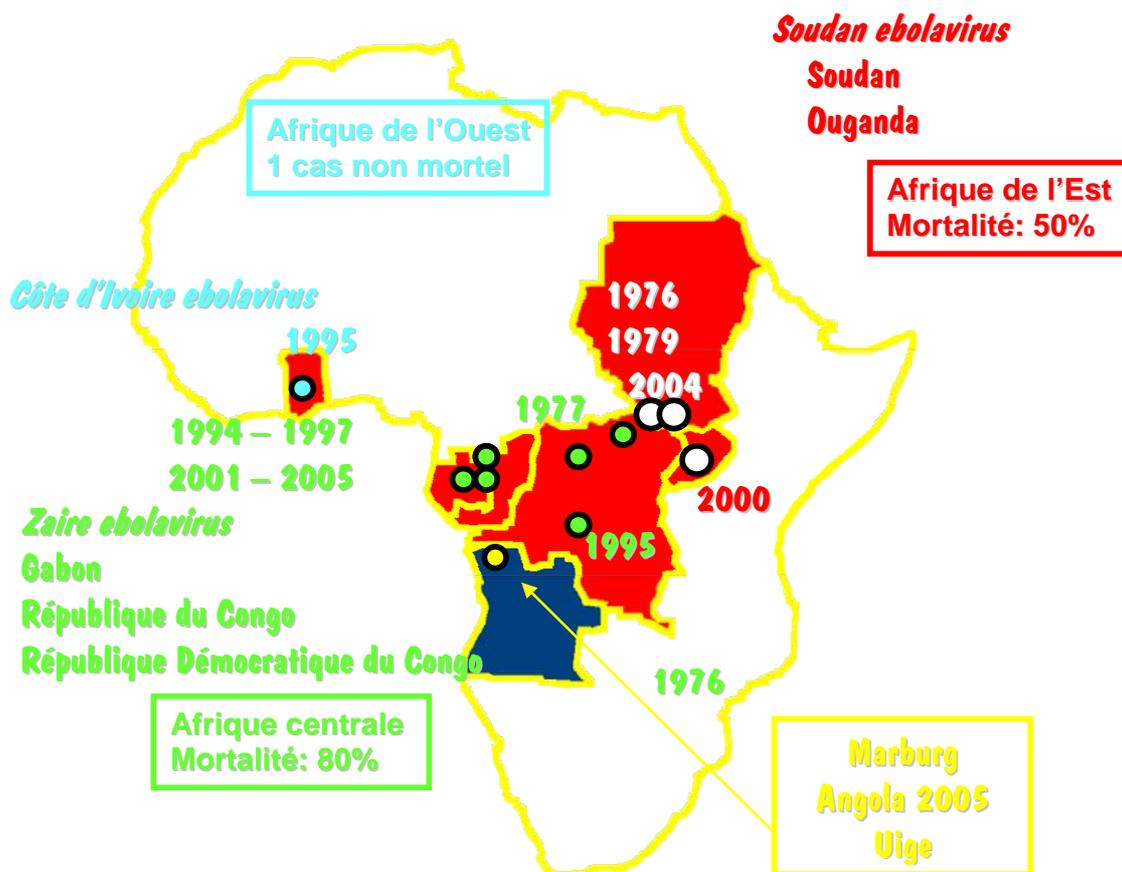


Figure 1 : Les épidémies à virus Ebola en Afrique.

La deuxième épidémie est due à *Zaire Ebolavirus* (Figure 1). Elle est survenue en RDC, près des frontières avec le Soudan et la République de Centre Afrique (RCA), quasiment au même moment que la première épidémie, entre août et novembre 1976 (Johnson, 1978). L'épicentre de cette épidémie était situé à Yambuku distant de Nzara d'environ 800 km. Le long de Yambuku coule une rivière (la rivière Ebola) qui est à l'origine de la dénomination de cette nouvelle maladie. Cette épidémie fut plus meurtrière que la précédente puisqu'elle provoqua la mort de 284 personnes sur un total de 318 malades déclarés. Le taux de mortalité de 89% associé à *Zaire Ebolavirus* lors de cette épidémie

témoigne d'un pouvoir pathogène plus élevé de cette espèce par rapport à l'espèce *soudan*.

Le virus Ebola fit une troisième apparition en juin 1977 chez une petite fille de 9 ans vivant à Tandala, une ville de RDC proche de la frontière avec la RCA (Heymann & al., 1980) à 325 km de Yambuku (Figure 1). Elle mourut avec un tableau clinique typique de fièvre hémorragique due à *Zaire Ebolavirus*, mais aucun cas secondaire ne fut déclaré.

Enfin, la troisième épidémie (la deuxième due à *soudan Ebolavirus*) survint entre juillet et octobre 1979 au même endroit que la première, c'est à dire à Nzara au Soudan (Baron & al., 1983). Comme en 1976, les premières personnes atteintes par le virus travaillaient dans la fabrique de coton de Nzara. Cette épidémie, moins dramatique que la première, toucha 34 personnes dont 22 décédèrent.

I.1.2. Résurgence d'Ebola : la période 1994-1997.

Après un silence épidémiologique long de 15 années pendant lequel aucun cas ne fut déclaré, Ebola a surgi de nouveau en 1994 pour une période de 3 années. Cette période est marquée par l'apparition d'une nouvelle espèce, *côte d'ivoire Ebolavirus*, et par une intensification des épidémies dues à *Zaire Ebolavirus*.

Le continent africain fut donc de nouveau confronté à ce terrible fléau une première fois en juin 1994 quand une ethnologue suisse tomba malade quelques jours après avoir autopsié un chimpanzé trouvé mort dans le parc national de Taï (Figure 1), situé en Côte d'Ivoire non loin de la frontière avec le Libéria (Le Guenno & al., 1995), (Le Guenno & al., 1999), (Formenty & al., 1999). Le diagnostic d'infection par Ebolavirus (EBOV) fut établi à la fois chez la femme et chez le chimpanzé. Même s'il survint dans un biotope similaire à celui dans lequel ont eu lieu les premières épidémies, à égale distance de l'équateur (environ 5° nord), ce malade fut le premier et le seul cas humain observé en Afrique de l'ouest, et le seul cas attribué à *côte d'ivoire Ebolavirus*.

La première épidémie de cette période (la quatrième au total) frappa une nouvelle fois la RDC et plus précisément la ville de Kikwit située à environ 500 Km au sud de Kinshasa, la capitale (Khan & al., 1999) (Figure 1). Entre janvier et

juillet 1995, l'épidémie provoqua la mort de 256 personnes sur un total de 315 malades, d'où un taux de mortalité de 81% spécifique à l'espèce *zaïre*. Malgré des moyens scientifiques et médicaux plus modernes et performants que ceux utilisés en 1976, cette épidémie fut d'aussi grande ampleur que celle de 1976 parce qu'elle sévit principalement dans une ville à forte population (la ville de Kikwit a plus d'un million d'habitants) où la promiscuité était propice aux contaminations interhumaines.

Enfin, 3 épidémies toutes dues à *zaïre Ebolavirus* frappèrent successivement le nord-est du Gabon (*Georges & al., 1999*) (Figure 1); la première à Mékouka entre 1994 et 1995, la deuxième à Mayibout au début de 1996, et la troisième entre 1996 et 1997 à Booué.

La première épidémie est survenue au Nord-Est du Gabon près de la frontière du Cameroun, entre décembre 1994 et février 1995 (*Amblard & al., 1997*). Elle s'est étalée en 2 vagues successives et a touché dans un premier temps 3 camps d'orpailleurs situés au cœur de la forêt, en décembre 1994, où 32 cas cliniques furent recensés. Certains malades ont alors quitté les camps pour aller se faire soigner à l'hôpital de la ville la plus proche, Makokou. La contamination d'autres patients à l'hôpital fut à l'origine d'une deuxième flambée épidémique qui affecta également les villages situés à proximité de Makokou où 16 cas furent rétrospectivement répertoriés. Au total, 49 cas cliniques dont 29 morts furent notés, d'où un taux de mortalité de 59%. Les données épidémiologiques concernant cette épidémie sont peu précises et le recensement des cas cliniques est incomplet parce que l'infection Ebola ne fut identifiée que rétrospectivement chez les malades dont on avait gardé des échantillons biologiques.

En février 1996, une deuxième épidémie est apparue dans les villages de Mayibout I et II, situés à une quarantaine de kilomètres au sud de Mékouka le long du fleuve Ivindo (*Georges & al., 1999*). Cette épidémie a débuté tout d'abord chez 18 enfants du village de Mayibout II qui avaient participé au transport puis au dépeçage d'un chimpanzé trouvé mort dans la forêt. Ces 18 cas index ont ensuite contaminé leurs familles et amis dont certains propagèrent

à leur tour la maladie dans les villages voisins, Mayibout I au sud et Mvadi au nord. Au total, cette épidémie fit 31 malades dont 21 morts, d'où un taux de mortalité de 67,7%.

La troisième épidémie, l'épidémie de Booué, s'est étendue entre Octobre 1996 et Mars 1997. Elle débuta officiellement le 5 octobre 1996, date à laquelle les premiers patients furent diagnostiqués positifs par antigène capture (*Georges & al., 1999*). Mais, une enquête épidémiologique indique que cette épidémie aurait réellement commencé 2 mois auparavant à partir d'un chasseur mort après avoir présenté des symptômes évocateurs d'une fièvre hémorragique. Simultanément à ce cas, plusieurs chimpanzés ont été trouvés morts dans la forêt de la même région. Les analyses histologiques (effectuées au CDC d'Atlanta) de coupes d'organes prélevées chez l'un d'entre eux, démontrent que cet animal était infecté par le virus Ebola. A la fin du même mois, un 2^{ème} chasseur meurt dans les mêmes conditions que le premier, puis un de ses amis tombe également malade 12 jours plus tard, et est évacué à l'hôpital de Booué où il reçoit des soins médicaux. Il rejoint ensuite un village voisin de Booué pour y recevoir des soins de médecine traditionnelle prodigués par un ngangas, basés sur des scarifications. Les autres patients de ce tradipraticien, lui-même et son assistant, se contaminent alors à cette occasion, puis diffusent à leur tour la maladie dans plusieurs villes et villages du Gabon. Ainsi, 15 cas dont 11 morts ont été déclarés à Libreville, 3 cas à Lastourville, ville située à 130 Km au sud-Est de Booué, et 1 cas en Afrique du Sud à partir d'un médecin gabonais exerçant à Libreville qui, ignorant qu'il était atteint par le virus Ebola, partit se faire soigner à Johannesburg, contamina une infirmière qui mourut quelques jours plus tard. Cette épidémie, qui fit 60 cas dont 45 morts sur une période de 6 mois, se caractérise par une dispersion géographique très importante qui explique probablement son étendue dans le temps.

I.1.3. Zaire *Ebolavirus* et la résurgence de soudan *Ebolavirus*: la période 2000-2004.

Cette période est marquée par une multiplication des épidémies dues à *Zaire Ebolavirus* dans une même zone, la région frontalière du Gabon et de la République du Congo (Figure 2), et à la résurgence de *soudan Ebolavirus* au Soudan et en Ouganda (Figure 1). L'autre grande caractéristique de cette période est l'apparition de grandes épidémies chez certaines espèces animales, principalement les gorilles et les chimpanzés (Figure 2).

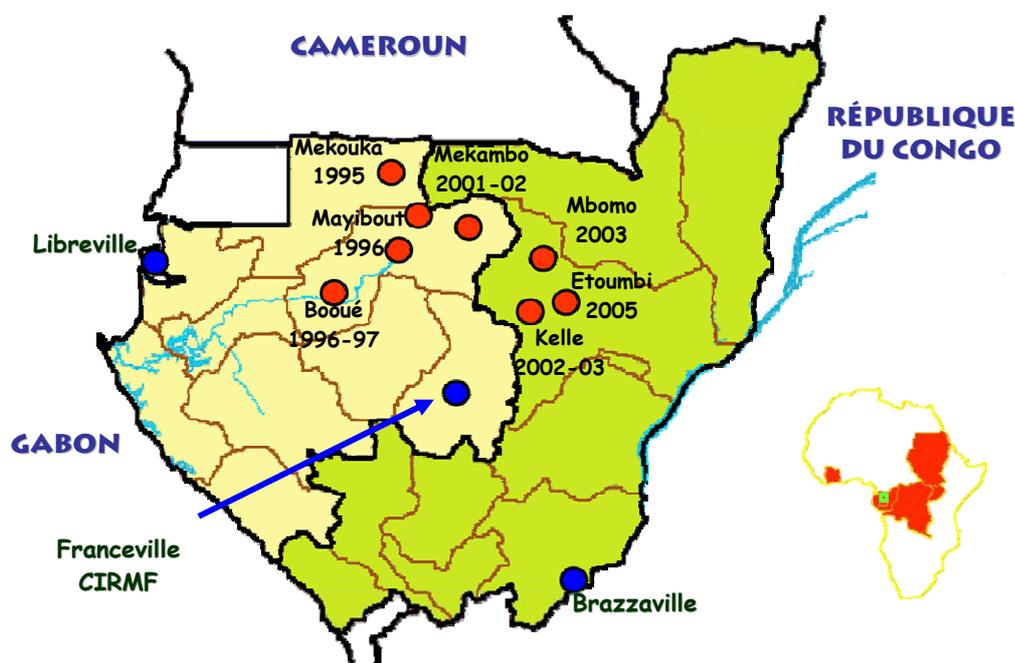


Figure 2 : Région frontalière entre le Gabon et la République du Congo

I.1.3.1 Les épidémies dues à *Zaire Ebolavirus*.

La première épidémie de cette période est l'épidémie de Mékambo qui s'est étendue entre Octobre 2001 et Mai 2002 (Nkoghe & al., 2005) (Leroy & al., 2002b) (Figure 3). Elle était en fait composée de plusieurs chaînes épidémiques différentes indépendantes les unes des autres (Leroy & al., 2004a).

La première chaîne épidémique est issue du village Mendemba le 25/10/2001 (Figure 3). Elle est la chaîne la plus importante et est à l'origine de plusieurs foyers secondaires (Mékambo, villages Ntolo, Iahounene, Ekata et Olloba en République du Congo). Le foyer secondaire de Mékambo a lui-même généré un foyer tertiaire à Makokou suite à l'évacuation d'un malade de Mékambo vers l'hôpital de Makokou. Cette chaîne serait apparue suite à la manipulation d'une antilope trouvée morte par des chasseurs. Deux autres chaînes épidémiques sont apparues plus ou moins simultanément les 28/11/2001 et 01/12/2001 dans les villages Ekata et Olloba situé de l'autre côté de la frontière au Congo. Ces chaînes proviendraient de la manipulation d'une antilope (Ekata) et d'un gorille (Olloba) tous deux trouvés morts par des chasseurs du village. Deux autres chaînes épidémiques sont apparues quasiment simultanément 3 semaines plus tard dans deux zones géographiques relativement éloignées : l'une le 22/12/2001 dans le village Ekata situé sur l'axe routier du sud à partir de Mékambo en direction de la République du Congo, et l'autre le 29/12/2001 dans le village Etakangaye situé sur l'axe du nord. La source de contamination de la première chaîne n'a pu être identifiée alors que la deuxième résulte de la manipulation d'un chimpanzé trouvé mort. Enfin, la dernière chaîne clairement identifiée est apparue le 27/03/2002 lorsque des chasseurs du village Grand-Etombi (sur l'axe du nord) ont dépecé puis consommé un gorille trouvé mort dans la forêt. Les chaînes épidémiques qui ont émergé sur l'axe Mékambo-Olloba se sont propagées de l'autre côté de la frontière, en République du Congo jusqu'à la ville de Mbomo, située à environ 80 Km d'Olloba.

Simultanément, une deuxième flambée épidémique s'est développée vers la mi-janvier dans les villages Entsiami, Abolo et Ambomi situés en République du Congo tout près de la frontière gabonaise à près de 200 Km au sud d'Olloba (Figure 3). Cette épidémie s'est propagée jusque dans la ville de Kellé à environ 65 Km (Figure 2). L'origine de cette épidémie est inconnue. Le séquençage des souches virales obtenues à partir des échantillons positifs montre également l'existence de plusieurs chaînes épidémiques concomitantes.



Figure 3 : Epidémies humaines à virus Ebola au Gabon et au Congo Brazza.

La troisième flambée épidémique, confirmée par le laboratoire, a de nouveau touché la région de Mbomo en République du Congo entre Décembre 2002 et Mai 2003 (Formenty & al., 2003) (Figure 3). Cette épidémie est apparue à partir de deux foyers indépendants, à Yembelengoye (près d'Entsiami) et à Mvoula un camp d'orpailleurs situé plus à l'est, suite à la manipulation de carcasses d'animaux. Le foyer de Mvoula s'est principalement développé à Mbomo et celui de Yembelengoye à Kellé. Au total, 143 cas dont 128 morts ont été enregistrés.

Une quatrième flambée épidémique observée lors de cette période a une nouvelle fois touché la région de Mbomo entre Octobre et Décembre 2003 (O.M.S, 2004). Les premiers cas sont apparus à Mbanza, village situé à une

trentaine de kilomètres au nord de Mbomo (Figure 3). Cette fois-ci, aucune source animale n'a clairement été mise en évidence. Au total, 35 cas dont 29 morts ont été recensés.

Une dernière flambée épidémique s'est déclarée en mai 2005 à Etoumbi, dans la cuvette Ouest, en République du Congo faisant au total, 12 cas dont 9 morts.

Simultanément à ces épidémies humaines, de véritables et grandes épidémies d'Ebola ont également touché certaines espèces animales dont les gorilles, les chimpanzés et les céphalophes principalement. Ces épidémies seraient responsables du déclin brutal des populations sauvages observé dans ces régions (Leroy & al., 2004a), (Rouquet & al., 2005).

I.1.3.2 Les épidémies dues à *soudan Ebolavirus*.

Deux épidémies dues à *soudan Ebolavirus* se sont déclarées pendant cette période (Figure 1). La première a touché l'Ouganda entre Octobre 2000 et Janvier 2001 où elle causa la mort de 173 personnes sur les 425 malades recensés, d'où un taux de mortalité de 40,7% (O.M.S., 2001). Essentiellement parce qu'elle s'est répandue sur une grande partie du territoire ougandais, cette épidémie est responsable du plus grand nombre de cas observés au cours d'une même épidémie.

Enfin, la deuxième épidémie est la plus petite jamais observée puisqu'elle fit 17 cas dont 7 morts pendant les mois de Mai et de Juin 2004, d'où un taux de mortalité de 41% caractéristique de *soudan Ebolavirus* (O.M.S., 2004). Cette épidémie se développa une nouvelle fois au Soudan à Yambio, ville située à quelques dizaines de kilomètres seulement des villes de Nzara et Maridi, lieux des épidémies de 1976 et de 1979.

I.2 Transmission du virus Ebola

I.2.1 Transmission du virus d'homme à homme

Le virus Ebola se transmet par des contacts directs avec des fluides d'une personne infectée (sang, salive, vomissures, sperme, selles et peut-être la sueur). Ce virus ne se transmet pas par voie aérienne. Après la contamination accidentelle d'une personne, le virus se transmet ensuite par contact direct et étroit du malade, par l'intermédiaire de son sang et de ses sécrétions, à son entourage et à ses proches lors des soins ou des préparatifs du corps en cas de décès. La contamination a aussi un caractère familial ou nosocomial marqué.

Dans la plupart des épidémies, la source de contamination de la première personne identifiée comme infectée (cas primaire) n'est pas connue. C'est le cas pour toutes les épidémies de la période 1976-1979, des épidémies de *Mékouka* (Gabon) en 1995, de *Booué* (Gabon) en 1996, de *Kikwit* (RDC) en 1995, et de toutes les épidémies dues à *soudan Ebolavirus* en 1976, 1979 et 2004 au Soudan et en 2000 en Ouganda.

I.2.2 Transmission du virus de l'animal à l'homme

Depuis l'apparition du virus Ebola en 1976, l'origine de plusieurs épidémies a pu être identifiée et attribuée à un animal mort. En 1994, une ethnologue suisse, seul cas d'infection par *côte d'ivoire Ebolavirus*, se contamina au cours d'une autopsie d'un chimpanzé. Cet animal s'est avéré être infecté par la même souche virale que celle isolée chez l'ethnologue (*Le Guenno & al., 1995*). De même, l'épidémie de *Mayibout* en 1996 au Gabon est apparue d'abord chez des enfants qui avaient trouvé puis dépecé un chimpanzé trouvé mort dans la forêt (*Georges & al., 1999*). Un tel événement s'est également produit pour le virus de Marburg, l'autre membre de la famille des *Filoviridae*. L'épidémie survenue en 1967 à Marburg et à Belgrade résulta en effet de la manipulation d'organes et de tissus de singes vervets infectés qui avaient été importés d'Ouganda (*Martini & al., 1969*), (*Smith & al., 1967*).

La situation des épidémies qui ont sévi dans la région frontalière du Gabon et de la République du Congo entre 2001 et 2003 a été beaucoup plus claire. Les épidémies de cette période (plus exactement la plupart des chaînes épidémiques) sont toutes apparues à la suite de la manipulation de carcasses infectées d'animaux, principalement de gorilles, chimpanzés et de céphalophes (Leroy & al., 2004a). Ainsi, des carcasses de gorilles seraient à l'origine des chaînes de *Olloba* 2001, *Grand Etoumbi* 2002, *Entsiami* 2002 et *Yembelengoye* 2002. Des carcasses de chimpanzés seraient à l'origine des chaînes de *Etakangaye* 2001 et *Olloba* 2002. Enfin, des carcasses de céphalophes seraient à l'origine des chaînes de *Mendemba* 2001, *Ekata* 2001 et *Mvoula* 2003.

Aucune preuve de contamination de l'homme directement à partir du réservoir n'a été à ce jour apportée. Seul un faisceau de présomptions laisse envisager une telle possibilité.

I.3 Caractéristiques cliniques

I.3.1. Période d'incubation.

Chez l'homme, dans les conditions naturelles, il est toujours difficile de déterminer avec précision la période d'incubation (la période d'incubation est l'intervalle de temps qui sépare le jour de l'infection et celui de l'apparition des premiers symptômes) en raison de l'absence d'indicateurs cliniques et épidémiologiques fiables pour situer réellement le jour de l'infection.

Celle-ci s'étend en général de 5 à 8 jours selon les patients et correspond à une durée moyenne de 6,2 jours (Bwaka & al., 1999).

I.3.2. Les symptômes.

Même s'il existe une assez grande variabilité dans l'expression des symptômes selon les individus, il est possible de diviser la phase symptomatique en 3 grandes périodes : la première phase, commune aux patients décédés et survivants, est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal ; la deuxième phase, également commune aux deux types de patients, voit l'apparition de

symptômes plus spécifiques liés aux atteintes de différents organes ; la troisième phase constitue la phase terminale intéressant les 2-3 jours qui précèdent la mort chez les décédés, ou bien la période de convalescence chez les survivants.

Les signes d'atteintes organiques commencent généralement entre 2 et 4 jours après l'apparition des symptômes généraux de la phase I, mais peut également apparaître plus ou moins simultanément à cette dernière. A ce stade, aucune différence entre les décédés et les survivants ne peut être détectée.

Les symptômes digestifs se manifestent par de la diarrhée liquide marquée par de fortes douleurs abdominales, des vomissements incoercibles accompagnés de nausées, et de l'anorexie. En quelques jours seulement, ces symptômes induisent une perte de poids et une déshydratation importantes.

Les symptômes respiratoires apparaissent au même moment et témoignent principalement d'une atteinte de l'appareil respiratoire superficiel qui se caractérise le plus souvent par un violent mal de gorge très évocateur de FHV (certaines personnes ont la sensation d'avoir une balle dans la gorge) résultant de lésions pharyngées variables dans leur aspect et leur intensité, et par de la toux sèche. Ces symptômes entravent la déglutition et entraînent de cette manière un défaut d'apport alimentaire qui induit un amaigrissement. Des douleurs thoraciques ont également été notées surtout lors des épidémies de 1976.

Les symptômes cutanés constituent les signes qui apparaissent le plus tardivement dans la phase II, souvent vers les 4^{ème} et 5^{ème} jours après le début des symptômes généraux. Ces signes, évocateurs de FVH, comprennent une congestion conjonctivale bilatérale et un exanthème maculo-papuleux cutané semblable à celui rencontré dans la rougeole (*Bowen & al., 1978*). Cet exanthème intéresse dans un premier temps les parties supérieures des bras et des jambes, puis s'étend progressivement à l'ensemble du corps, et conduit généralement à une desquamation subséquente portant essentiellement sur les parties les plus atteintes. Pouvant persister pendant une semaine, il est classiquement observé

dans les infections à filovirus ; il fut en effet décrit au cours des épidémies de 1976 (*Isaacson & al., 1978*), (*Piot & al., 1978*), (*Smith & al., 1978a*), chez le patient anglais de 1976 (*Emond & al., 1977*) et chez les patients hospitalisés à Kikwit (*Bwaka & al., 1999*) ou à Mosango (*Ndambi & al., 1995*) lors de l'épidémie de 1995.

Les manifestations hémorragiques sont fréquentes mais pas constantes. Celles qui apparaissent à la phase II consistent en la présence de sang dans les selles (méléna), dans les vomissures (hématémèse), dans les urines (hématurie, parfois microscopique), dans le nez (épistaxis), et dans la bouche (hémoptysie). Les femmes enceintes présentent des hémorragies utérines qui aboutissent généralement à un avortement. Certains signes hémorragiques sont le plus fréquemment rencontrés chez les personnes qui vont mourir (hématémèse par exemple), au contraire, d'autres le sont chez celles qui vont guérir (hémoptysie). Les autres types d'hémorragies affectent indistinctement les deux types de patients et concernent environ 41% des personnes infectées (*Bwaka & al., 1999*). Les survivants ont une convalescence longue et pénible qui débute environ 2 semaines après le commencement des symptômes et peut s'étendre sur une période d'un mois. Les patients sont le plus souvent asthénisés et subissent des pertes de poids allant de 5 à 10% du poids corporel de départ. Ils présentent de la diarrhée et des douleurs abdominales intermittentes, et sont victimes d'arthralgies et de myalgies correspondant aux séquelles de la longue période de forte fièvre observée pendant la phase symptomatique. Chez les hommes, des signes d'orchite ont parfois été observés lors de l'épidémie de Yambuku (*Emond & al., 1977*) et celle de Kikwit (*Ndambi & al., 1999*). Ces orchites peuvent être dues à des effets secondaires des réactions immunitaires ou à la présence de virus dans les testicules. Le virus Ebola (*Emond & al., 1977*) et le virus de Marburg (*Martini & Siegert, 1971*) ont en effet été retrouvés dans le sperme plus de 2 mois après les symptômes.

Certains survivants possèdent des lésions oculaires irréversibles résultant d'uvéites. En effet, 4 rescapés de l'épidémie de Kikwit avaient des signes de

douleur oculaire, de photophobie, d'hyper-sécrétion lacrymale, et de perte de l'acuité visuelle plus d'un mois après la fin des symptômes (Kibadi & al., 1999). Des cas d'uvéite tardive ont également été décrits au cours de l'infection du technicien anglais par le virus Ebola en 1976 (Emond & al., 1977) et dans celle de plusieurs personnes par le virus de Marburg (Gear & al., 1975), (Kuming & Kokoris, 1977). A Kikwit, un cas de mucor mycose, survenu pendant la phase symptomatique, fut également observé. Cette infection secondaire des yeux par un champignon induisit tout d'abord la collection d'abcès oculaire et une atteinte du nerf optique. L'infection envahit ensuite les sinus frontaux et les oreilles internes provoquant une cécité et une perte d'audition sur le côté le plus touché (Kalongi & al., 1999).

I.3.3 Les paramètres biochimiques et hématologiques.

L'exploration hématologique des cas cliniques de filovirose révèle une augmentation importante du nombre de globules blancs dans le sang (leucocytose) à partir du 4^{ième} jour de symptômes, indépendamment du devenir des patients. Cette leucocytose se manifeste essentiellement par l'augmentation des granulocytes neutrophiles (neutrophilie) qui peuvent représenter jusqu'à 90% des globules blancs, et s'accompagne simultanément d'une lymphopénie prononcée.

Certaines constantes biochimiques subissent également des modifications qui attestent des altérations des organes correspondants. Ainsi, l'élévation de certaines enzymes hépatiques, notamment l'aspartate et l'alanine aminotransférase, et certains marqueurs biochimiques (urée et créatinine) sont respectivement le témoin de lésions hépatiques et rénales (Formenty & al., 1999). Néanmoins, les faibles taux de bilirubine retrouvés dans le sang montrent que les fonctions hépatiques et rénales ne sont pas très altérées. Ces lésions s'aggravent dramatiquement dans les 2-3 jours qui précèdent la mort, alors qu'elles disparaissent progressivement chez les survivants durant la convalescence.

Les troubles de la coagulation observés chez les patients sont de deux catégories : diminution de la coagulation et coagulation intravasculaire disséminée.

D'un côté, la diminution du nombre de thrombocytes dans le sang périphérique, l'augmentation du temps de coagulation et la baisse de production de certains facteurs de coagulation (facteur II et facteur VII notamment) sont les indicateurs des difficultés de coagulation que rencontrent les patients lors de plaies cutanées ou lors des ponctions et injections pendant la phase terminale des symptômes (Gear, 1989). De l'autre côté, la présence dans le sang d'une plus grande quantité de produits de dégradation de la fibrine chez les patients infectés par des filovirus est le reflet de la formation permanente et spontanée de microthrombus à l'origine des phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée (Gear, 1989).

I.4 Diagnostic de l'infection Ebola

En l'absence de traitement spécifique, le diagnostic et la recherche de l'infection Ebola, revêtent une importance capitale pour la mise en œuvre rapide de mesures de lutte, de même que pour comprendre les modalités d'apparition, de transmission et de propagation de l'infection Ebola. C'est la raison pour laquelle, nous allons dans un premier temps, présenter le laboratoire de sécurité maximale (niveau 4 ou P4) du CIRMF, et ensuite, nous allons explorer les différentes techniques de laboratoire que nous avons utilisées dans le cadre de cette étude.

I.4.1 Présentation du laboratoire P4 du CIRMF

Le CIRMF dispose d'un laboratoire spécial dont les conditions maximales de sécurité permettent de travailler sur des agents pathogènes aussi dangereux que le virus Ebola (Figure 4). Ce laboratoire est constitué d'une grande pièce séparée du milieu extérieur par 3 sas successifs. Le 1^{er} sas est un simple local où règne une pression atmosphérique. Le 2^{ème} sas constitue la salle d'habillage, et

renferme une pression inférieure à celle de l'air ambiant mais supérieure à celle du sas qu'il précède. On y revêt une combinaison étanche couvrant tout le corps de la tête aux pieds, des sur-chaussures, un masque anti-poussière et 3 paires de gants en latex. Le 3^{ème} et dernier sas est en pression négative par rapport au 2^{ème}, et correspond au local de déshabillage dans lequel on se débarrasse de la combinaison potentiellement contaminée au retour de l'aire de travail. Avant d'entrer dans l'aire de travail, on s'équipe d'un masque spécial qui crée une surpression autour du visage et qui comporte un filtre absolu.

La pièce principale du laboratoire renferme tout le matériel de travail, et se situe en pression négative par rapport au 3^{ème} sas. Outre le matériel classique (incubateur à CO₂, hotte à flux laminaire, centrifugeuses, congélateur, frigidaire, bombonne d'azote...), ce laboratoire dispose d'un isolateur de virus hermétique, en pression négative par rapport à un petit sas présent à son entrée, lui-même en pression négative par rapport à la pièce centrale. Cet isolateur est une boîte à gants (ou bulle), comportant 4 postes de travail, à l'intérieur de laquelle se trouvent un incubateur, une centrifugeuse, et un microscope optique relié à un système vidéo (Figure 4). L'air rentre et sort dans la pièce principale par l'intermédiaire de 2 ouvertures couvertes chacune par un filtre absolu. Un autoclave double-face est encastré, de manière hermétique, dans le mur séparant la pièce centrale du 1^{er} sas. Il assure la décontamination de tous les déchets produits à l'intérieur de l'aire de travail et dans le 3^{ème} sas.

Par mesure supplémentaire de sécurité, ce laboratoire est connecté individuellement à un onduleur d'une autonomie de 30 minutes, assurant le relais entre le secteur général et un groupe électrogène en cas de coupure générale du courant.

Figure 4 : Laboratoire à sécurité maximale du CIRMF



I.4.2 Techniques sérologiques

I.4.2.1 Recherche d'antigènes spécifiques du virus Ebola.

Initialement appliquée à la détection des antigènes d'EBOV-R dans les tissus (Ksiazek & al., 1992), cette méthode est maintenant couramment utilisée pour la détection de tout antigène Ebola dans le sérum ou le plasma. Le test est basé sur le principe d'une double capture. Les antigènes viraux présents dans le sérum sont reconnus dans un premier temps par un mélange d'anticorps monoclonaux fixés sur des plaques ELISA, et, dans un deuxième temps, par un sérum polyclonal de lapin anti-EBO. Ce dernier est ensuite reconnu par un sérum polyclonal anti-lapin couplé à l'enzyme peroxydase qui, mise en présence d'un substrat spécifique, émet un rayon lumineux dont la longueur d'onde est lue par un spectrophotomètre. Depuis sa mise au point en 1990, cette méthode fut utilisée dans le diagnostic de toutes les épidémies d'Ebola qui ont sévi en Afrique. Les avantages logistiques de cette technique sont également indéniables. Elle peut être réalisée très rapidement en 4-5 heures, et donne des résultats positifs dès les premiers jours de symptômes (Ksiazek & al., 1992).

I.4.2.2 Recherche d'anticorps (IgG) spécifiques du virus Ebola.

Le dosage des IgG s'effectue selon une méthode standard qui consiste à faire réagir les sérums sur du lysat de cellules véro infectées par du virus Ebola fixé sur des plaques ELISA, puis à détecter les IgG spécifiques à l'aide d'un polyclonal anti-IgG conjugué à l'enzyme peroxydase (Ivanov & al., 1986).

Les IgG sont détectées à partir des 10-12^{ième} jours après l'infection expérimentale de macaques, et persistent pendant environ une année (*Ksiazek & al., 1999*). Chez l'homme, elles apparaissent vers le 3^{ième} jour de symptômes, persistent pendant au moins 2 ans, et ne sont que très rarement observées chez les personnes qui succombent à l'infection (*Ksiazek & al., 1999*). Des IgG ont même été retrouvées chez 2 patients qui avaient survécu à l'infection Ebola lors de l'épidémie de Yambuku en 1976 plus de 10 ans après les symptômes (*Ksiazek & al., 1999*). Pour toutes ces raisons, le dosage d'IgG ne peut être appliqué pour établir le diagnostic d'infection Ebola au cours d'une épidémie, mais ce test constitue en revanche un outil approprié pour des études épidémiologiques rétrospectives. Récemment, outre le sérum ou le plasma, des IgG ont même été détectées dans la salive de certains individus vivants en zone d'épidémies (*Formenty & al., 2006*).

I.4.3 Techniques microscopiques

I.4.3.1 Immunohistochimie.

La méthodologie de cette technique est semblable à celle de la microscopie électronique (*Zaki & al., 1999*). Le marquage se fait par l'intermédiaire de la phosphatase alcaline dans un substrat au naphthol/rouge, et est suivi d'une contre coloration à l'hématoxyline. Cette technique permet de visualiser les virus au sein de la matrice extracellulaire ainsi que les inclusions virales intracytoplasmiques. Elle fut utilisée pour diagnostiquer, sur des coupes de foie et de peau, des cas post-mortem lors de l'épidémie humaine de Kikwit (*Zaki & al., 1999*), et animale de Côte d'Ivoire (*Wyers & al., 1999*). Cette technique possède une très grande sensibilité. A Kikwit, tous les cas diagnostiqués par les outils classiques de diagnostic ont été explorés et confirmés par cette méthode d'examen direct (*Zaki & al., 1999*).

Cette technique possède néanmoins certains inconvénients qui la rende inutilisable en routine dans l'identification rapide d'une épidémie, notamment

sa haute technicité nécessite des laboratoires spécialisés, et les délais trop longs qu'elle requière pour l'établissement du diagnostic en sont les principales raisons.

I.4.3.2 Isolement viral

Il constitue la technique de référence, et fut la méthode qui permit la première identification des virus Ebola et de Marburg.

L'isolement viral consiste en l'inoculation de lignées cellulaires ou d'animaux sensibles par du matériel biologique.

Les cellules sont cultivées en flasques dans un milieu de culture adéquat (*Ksiazek, 1991*). Lorsque les cellules sont confluentes, le prélèvement suspect est déposé sur le tapis cellulaire. L'infection des cellules est identifiée grâce à l'apparition des effets cytopathogènes provoqués par le virus. Ces derniers sont caractérisés par des images en "lachers de ballons" dès les 3^{ème} et 4^{ème} jours, puis par la formation de trous de taille croissante entre les cellules dès le 7^{ème} jour après l'inoculation (*Johnson & al., 1977*). La caractérisation du virus se réalise par l'analyse de coupes de cellules véro en microscopie électronique, en immunohistochimie et même par la recherche d'antigène capture (*Ellis & al., 1979*).

I.4.4 Technique de biologie moléculaire

I.4.4.1 La Polymerase Chain Reaction ou PCR

La polymérase Chain Reaction (PCR), est une technique d'amplification génique qui permet de synthétiser des copies multiples d'une matrice donnée à l'aide d'amorces spécifiques, sans avoir à renouveler l'enzyme après dénaturation de l'ADN (*Mullis & al., 1987*). La PCR nécessite deux outils de base (amorces spécifiques et l'ADN polymérase) et un protocole expérimental approprié. Le principe de la méthode est le suivant : deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence située aux extrémités 5' Phosphate des brins du fragment d'ADN à amplifier sont mis à hybrider avec le fragment. Les

extrémités 3' OH libre des oligonucléotides servent d'amorce à une ADN polymérase, chaque brin du fragment sert alors de matrice à l'enzyme qui synthétise les brins complémentaires, le facteur de multiplication est alors de deux. Les produits issus de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur et les oligonucléotides ou primers sont à nouveau remis à hybrider avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à l'ADN polymérase. Le facteur d'amplification sera alors de quatre. On obtient ainsi un doublement des copies du fragment d'ADN à chaque cycle.

L'électrophorèse est la méthode par laquelle on fait migrer des molécules chargées en solution, souvent des protéines ou des acides nucléiques, sous l'effet d'un champ électrique. Leur vitesse de migration et leur mobilité à travers le champ électrique dépendent de la puissance du champ, de la charge nette, de la taille et de la forme des molécules et, également, de la force ionique, de la viscosité et de la température du milieu, dans lequel se déplacent les molécules. L'électrophorèse en gel d'Agarose est utilisée pour visualiser les produits amplifiés par la méthode PCR. C'est un outil d'analyse simple, rapide et très sensible.

I.5 Moyen de lutte contre l'infection Ebola

I.5.1 Mesures sanitaires à prendre pour les patients

Il n'existe, à ce jour aucun traitement ni vaccin spécifique contre l'infection à virus Ebola, malgré quelques avancées significatives dans la recherche sur les stratégies thérapeutiques et vaccinales que nous développerons dans les paragraphes suivants. Le seul recours, même pour les hôpitaux les mieux équipés, est un traitement symptomatique, c'est-à-dire qu'on va s'efforcer d'agir pour soulager les souffrances du patient, sans pouvoir agir sur leurs causes. Les cas graves sont placés, dans la mesure du possible, en unité de soins intensifs, où ils sont hydratés. Ce traitement a pour but de maintenir la fonction rénale, l'équilibre électrolytique et de combattre l'hémorragie et l'état de choc.

En l'absence de traitement, seules des mesures sanitaires permettent à l'heure actuelle de limiter efficacement l'extension des épidémies. Lors des différentes

épidémies d’Ebola, des équipes médicales et scientifiques internationales (OMS, CDC, Croix rouge...) sont venus compléter le personnel local.

Dans un premier temps, l’intervention doit être le plus rapide possible afin de limiter l’extension de la maladie, notamment en diagnostiquant rapidement les cas suspects (*Lloyd & al., 1999*).

La manipulation des malades par le personnel soignant doit être réalisée avec une extrême précaution. Des mesures de protection physique, comme le port systématique de gants, de blouses et de couvre chaussures jetables après chaque manipulation, sont préconisées. La désinfection du matériel médical, des vêtements, des déchets et des locaux souillés doit être systématiquement effectuée. De même, sans être draconiennes, des mesures de protection et des recommandations concernant les modes de contamination sont prises et enseignées au sein de la cellule familiale entourant les patients.

D’autres mesures sanitaires doivent également être prises, notamment la mise en place d’un cordon sanitaire autour des foyers épidémiques afin de limiter au maximum la contamination des personnes extérieures au foyer épidémique primaire au cours des mouvements réciproques entre la population du secteur touché et celle des zones périphériques saines (*Nkoghe & al., 2004*).

I.5.2 Traitement

Une fois les cas suspects identifiés, les patients hospitalisés reçoivent dans la mesure du possible, des soins médicaux à visées palliative et symptomatique (*Guimard & al., 1999*). Ces soins consistent à lutter contre les symptômes digestifs par l’emploi de pansements digestifs, d’antispasmodiques, de réhydratant par voie veineuse en cas de déshydratation sévère, d’antibiotiques contre les surinfections bactériennes secondaires. A l’encontre de la fièvre, les patients reçoivent des médicaments antipyrétiques non spécifiques et/ou des antipaludéens si des accès palustres compliquent le tableau clinique. Enfin, les patients reçoivent quelquefois des fortifiants (vitamines, sels minéraux...) oraux

ou parentéraux et des compléments nutritionnels afin de s'opposer au dépérissement et à l'affaiblissement dus au défaut d'alimentation.

I.5.3 Surveillance des mortalités animales

En 2002, un réseau de surveillance des mortalités animales, a été mis en place en collaboration avec les Ministères de la Santé et ceux des Eaux et Forêts de différents pays de la sous région. A chaque découverte de carcasse animale, des prélèvements sont effectués pour que soient réalisées des analyses biologiques. C'est ainsi que plusieurs carcasses de gorilles et de chimpanzés provenant du Gabon et de la République du Congo ont été trouvées positives en antigène capture (*Leroy & al., 2004a*) (*Rouquet & al., 2005*). Un tel résultat permet de mettre en place des mesures préventives afin d'éviter voir de réduire l'apparition et/ou la propagation des épidémies de l'animal à l'homme.

I.5.4 Stratégies vaccinales et thérapeutiques

Bien que des mesures sanitaires basées sur la mise en quarantaine des malades suffisent à endiguer les épidémies, l'absence de traitement et de vaccin contre la fièvre Ebola suscite plusieurs interrogations de la part de la communauté scientifique et des populations touchées par cette terrible maladie.

Plusieurs candidats vaccins sont en cours d'évaluation, mais il va falloir attendre quelques années avant qu'un vaccin puisse être utilisé. Certains effets protecteurs ont été obtenus après immunisation de primates ou de cobayes avec du virus inactivé ou avec les antigènes totaux du virus (*Lupton & al., 1980*).

Ainsi, un nombre grandissant d'équipes concentre aujourd'hui leurs efforts sur la mise au point de vaccins. Cependant, les infrastructures nécessaires à la manipulation du virus Ebola ainsi que le manque de modèles animaux pour l'évaluation des candidats vaccin freinent considérablement les avancées.

Plusieurs candidats vaccins se sont montrés efficaces chez le cochon d'Inde mais partiellement voire complètement inefficaces chez le macaque (*Geisbert & al., 2002*). Il s'agit de préparations virales inactivées par la chaleur, le formol, ou

les rayons γ (Lupton & al., 1980), de plasmides codant la glycoprotéine (GP) ou la nucléoprotéine (NP) du virus Ebola (Xu & al., 1998), de particules virales recombinantes du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne exprimant la GP (Pushko & al., 2000), de vaccins varioliques recombinants exprimant la GP, et enfin de particules virales Ebola encapsulées dans des liposomes (Rao & al., 2002). En revanche, un candidat vaccin, basé sur une triple préimmunisation par de l'ADN codant la GP à 4 semaines d'intervalle suivie d'un boost par un *adenovirus* recombinant inactivé exprimant la GP Ebola, protège les macaques d'un challenge 1 semaine plus tard (Sullivan & al., 2000). Cependant, la faible dose utilisée pour l'inoculation (6 pfu) ainsi que la durée du protocole d'immunisation rendent inutilisable ce candidat vaccin.

Une nouvelle étape a été franchie tout récemment avec la mise au point de 2 candidats vaccins qui se montrés efficaces à la fois chez le cochon d'Inde et le macaque.

Le premier candidat vaccin consiste à obtenir une immunisation unique par une dose de 2×10^{12} particules de l'adenovirus 5 recombinant, inactivé, exprimant à la fois la GP et la NP (ADV-GP/NP). Une variante composée de 2 injections à 9 semaines d'intervalle a également été testée. Les 2 variantes assurent une protection totale et induisent une réponse CD8+IFN γ + et une réponse humorale après un challenge à faible dose (13 pfu) et à forte dose (1500 pfu) 1 ou 4 semaines après. Aucune modification des lymphocytes T CD4+ n'est observée. La variante simple offre une protection plus rapide mais moins durable que la variante double (Sullivan & al., 2003).

Le second candidat vaccin consiste à obtenir une immunisation unique par une dose de 10^7 pfu particules du virus de la stomatite vésiculeuse recombinant, vivant et atténué, exprimant la GP Ebola (VSV Δ G/ZEBOV). Cette immunisation assure une protection totale des macaques après un challenge à forte dose (1000 pfu) 28 jours plus tard. Elle induit une augmentation modérée des IgG anti-GP (essentiellement des anticorps neutralisants), et une forte augmentation des CD8+IFN γ + et des CD8+TNF γ + ainsi que des CD4+IFN γ + et

CD4+TNF γ +. A ce jour, près de 30 macaques ont reçu cette immunisation, aucun d'entre eux n'a exprimé un quelconque signe clinique après challenge (Jones & al., 2005).

L'exploration plus poussée de l'efficacité de ces deux candidats vaccins se fait de nos jours par différentes équipes de recherches. L'évaluation sur les êtres humains n'est pas envisageable et celle chez le chimpanzé, génétiquement et physiologiquement très proche de l'homme, se heurte à des problèmes d'éthique.

Le degré de parenté entre les chimpanzés et l'homme ainsi que le fait que les chimpanzés et les gorilles sont les principales victimes des épidémies d'Ebola constituent indéniablement un intérêt majeur pour accélérer les recherches sur ces candidats vaccins, afin qu'ils soient disponibles dans les meilleurs délais.

II. Biologie du Virus Ebola

II.1 Le virus

II.1.1. Morphologie

La forme caractéristique du virus Ebola, comme celle du virus de Marburg, est celle d'un long filament d'environ 80 nm de diamètre et de longueur extrêmement variable pouvant aller de quelques dizaines de nanomètres à 10-15 μm (Murphy & al., 1990). Le pic d'infectivité de ces virus serait associé à une longueur d'environ 800 nm (Feldmann & al., 1996a). Toutefois, le pléiomorphisme du virus est tel que des formes en "6", des formes circulaires, des formes en "U" ou en épingle, et des formes branchées sont fréquemment observées tant en cultures que sur des coupes histologiques d'organes (Figure 5).

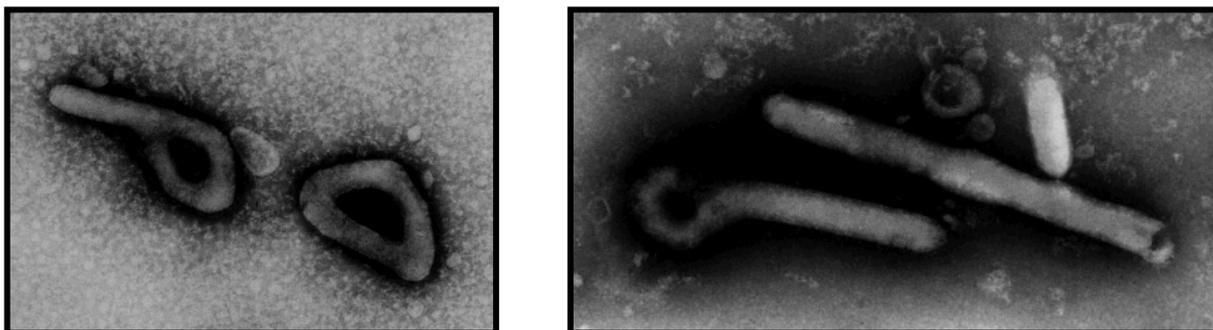


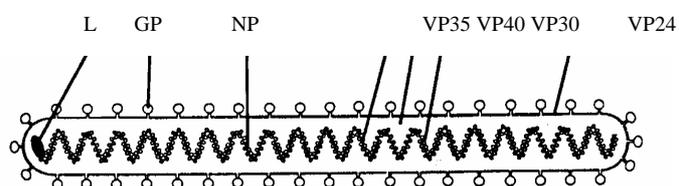
Figure 5 : Images du virus Ebola en microscopie électronique. Les formes filamenteuses caractéristiques, en 6, et en épingle sont représentées.

II.1.2 Structure.

Les filovirus sont composés de 7 protéines, et de 2 éléments structuraux distincts, l'enveloppe et le complexe ribonucléocapsidique central (Figure 6). L'enveloppe virale est constituée par les glycoprotéines associées, sur la face interne, à 2 autres protéines de structure, la VP24 et la VP40.

Les spicules qui recouvrent l’enveloppe sont entièrement formés par les glycoprotéines. Le complexe ribonucléocapsidique est composé d’un brin d’ARN linéaire, de polarité négative, et de 4 protéines virales impliquées dans la formation de la nucléocapside (Becker & al., 1998) : la protéine L (correspondant à la polymérase), la nucléoprotéine (NP), une protéine virale de 35 kDa (VP35) et la VP30. La nucléocapside possède une longueur d’environ 50 nm, présente une forme hélicoïdale d’une périodicité de 5 nm par tour d’hélice (Regnery & al., 1980) ,(Jahrling, 1995).

Figure 6: Structure du virus Ebola. L représente la protéine L (ou polymérase), GP la glycoprotéine, les VP sont des protéines virales structurales.



II.1.3 Le génome du virus Ebola.

Le génome de EBOV et plus généralement celui des filovirus, est représenté par un simple brin d’ARN, linéaire, de polarité négative, et possède un poids moléculaire de 18,9 kb (Figure 7).

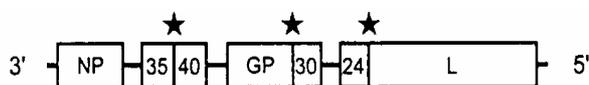


Figure 7: Organisation génomique du virus Ebola, d’après Feldmann & al, 1996.). Les astérix indiquent les chevauchements de gènes.

Cette particularité classe les *Filoviridae* dans l’ordre des *Mononegavirales* (virus non ségmentés à simple brin d’ARN de polarité négative) dans lequel on retrouve également les *Paramyxoviridae* et les *Rhabdoviridae* (Feldmann & al., 1993) ,(Feldmann & al., 1992).

Le génome est composé de 7 gènes successivement disposés comme le montre la Figure 6 : 3’ leader-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5’ trailer.

II.2 Génétique et phylogénie

Le virus Ebola est un virus à ARN génétiquement très stable. Il diffère du virus de Marburg d'au moins 67% au niveau nucléotidique et d'au moins 55% au niveau peptidique (Sanchez & al., 1996). La figure 8 indique que EBOV est divisé en 4 espèces distinctes différant l'une de l'autre de 37 à 41% au niveau nucléotidique et de 34 à 43% au niveau peptidique. Cette analyse fut réalisée à partir de la totalité du gène codant la GP (Sanchez & al., 1996).

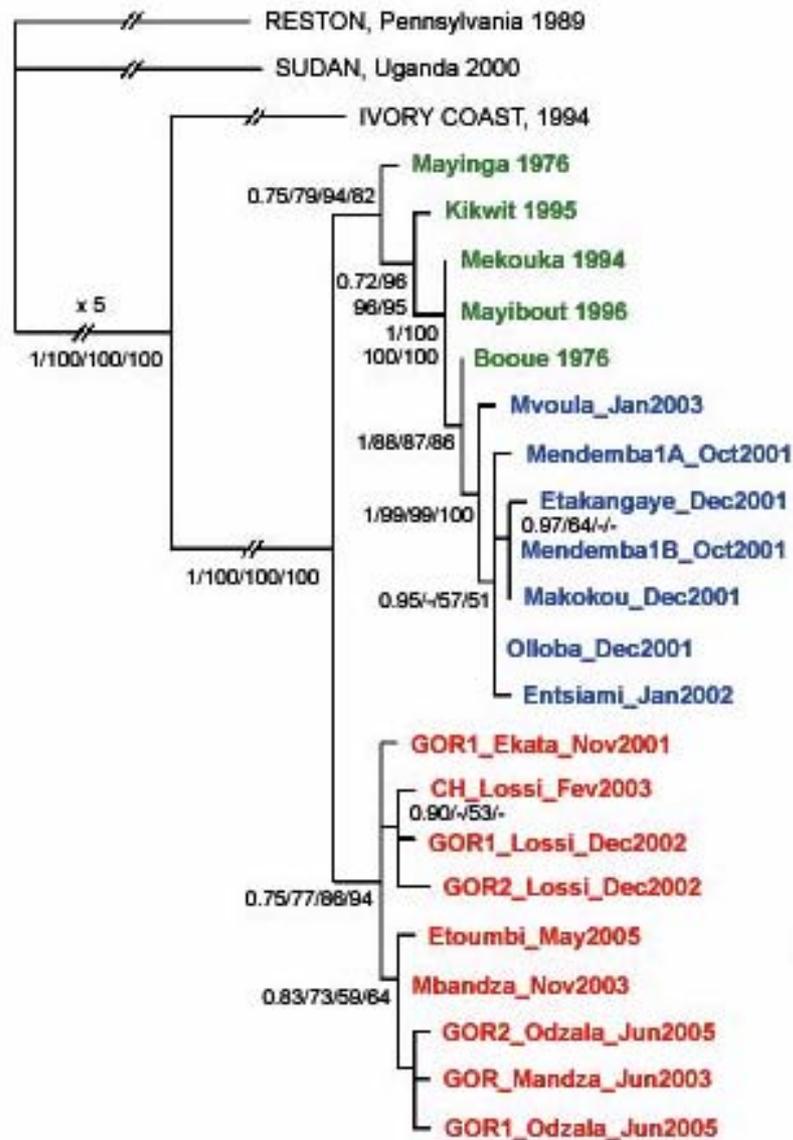


Figure 8: Arbre phylogénétique des Filoviridae..

A l'intérieur de chaque espèce, il y'a une grande stabilité génétique. A titre d'exemple, les taux de mutations entre les souches Booué 96 (Gabon) et Zaïre 76 ne sont que de 1,7% pour

la glycoprotéine membranaire (GP), 1,3% pour la nucléoprotéine (NP), 1,2% pour la protéine virale de structure de 40 KDa (VP40) et 0,9% pour la protéine virale de structure de 24 KDa (VP24), alors que ces souches ont été isolées à plus de 1000 Km et 20 années de distance (Leroy & al., 2002a). Des différences similaires ont été retrouvées entre les gènes des souches des épidémies de 2001-2003, de la souche *Mékouka* 94 (Gabon) et de la souche Zaïre 76 (Leroy & al., 2004a). De même, le séquençage de la partie la plus variable de la GP, portant sur 249 nucléotides, ne montra aucune mutation entre 9 patients (5 convalescents et 4 décédés) prélevés lors de l'épidémie de Kikwit au Zaïre (RDC) en 1995 (Rodriguez & al., 1995). La stabilité génétique du virus Ebola s'exprime également au cours d'une chaîne épidémique. Les gorilles (GOR) et les chimpanzés (CH) (Figure 8), de même que les personnes qui décèdent de la maladie et ceux qui survivent, sont infectés par des souches virales génétiquement identiques.

L'analyse phylogénétique des gènes provenant des carcasses animales et des prélèvements humains obtenus pendant les épidémies qui ont sévi dans la région frontalière du Gabon et de la République du Congo depuis 2001, a mis en évidence la présence autant de souches de virales que de carcasses. Ces découvertes ont montré pour la première fois que de nombreuses souches virales circulent au même moment aussi bien chez les primates que chez l'homme.

II.3 Physiopathologie de l'infection Ebola

Dans l'infection naturelle, le virus pénètre vraisemblablement par des microlésions cutanées. A ce niveau, il infecte les monocytes présents dans les vaisseaux capillaires. La circulation lymphatique et la circulation sanguine acheminent alors les monocytes infectés vers la plupart des organes, principalement les ganglions lymphatiques, le foie et la rate. Dans ces organes, les cellules de la lignée monocyttaire constituent les cibles privilégiées du virus. Il s'agit des cellules de Kupffer (foie), des macrophages de la rate et des ganglions, des pneumocystes (poumon), des macrophages des cavités pleurale et péritonéale, des cellules microgliales (tissu nerveux)... La généralisation de l'infection à d'autres types de cellules, notamment les cellules endothéliales, ne survient que dans le stade terminal de la maladie, et se produit soit par la circulation sanguine après libération des virions par cytolysse des cellules infectées, soit par circulation tissulaire des monocytes infectés.

Les cellules cibles initiales du virus Ebola sont les cellules de lignée monocyttaire. Chez le

cobaye, les premières cellules monocytaires infectées sont détectées dès 24h après l'inoculation et restent les seules cibles du virus pendant environ 7 jours (*Connolly & al., 1999*). Diverses techniques utilisant la microscopie électronique ou l'immunohistochimie démontrent *in vivo* et *in vitro* l'infection des cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM). Chez le cobaye (*Ryabchikova & al., 1994*), (*Skripchenko & al., 1994*) ainsi que chez le singe (*P'iankov & al., 1995*), les macrophages alvéolaires et péritonéaux sont montrés infectés par le virus de Marburg. De même, des expériences identiques, réalisées chez les mêmes espèces animales, montrent que les cellules du SPM sont infectées également par le virus Ebola (*Ryabchikova & al., 1996*). *In vitro*, la réplication virale a été mise en évidence dans les monocytes d'homme (*Zlotnik, 1969*), de singe (*Geisbert & al., 1992*), de cobaye (*Ryabchikova & al., 1996*) et de hamster (*Zaki & al., 1997*). La synthèse des premiers brins d'ARN subgénomique (+) a lieu environ 6h après infection de monocytes *in vitro*, les premiers signes de réplication virale apparaissent à 12h, la sortie des virions survient à 24-32h, et les effets cytopathogènes débutent 5-6 jours après l'infection des monocytes (*Feldmann & al., 1996b*). A l'intérieur des cellules, le virus se réplique soit directement dans le cytoplasme, soit plus fréquemment au sein de vacuoles bien individualisées et de taille variable. Lorsque les virus sont enfermés dans des vacuoles, la sortie des virions s'effectue par bourgeonnement à la surface de la cellule. C'est le cas des monocytes et des cellules endothéliales au niveau de leur surface apicale. En revanche, lorsque les virus sont situés directement dans le cytoplasme, la sortie des virions, se produit lors de la cytolyse des cellules comme c'est le cas des monocytes et des cellules endothéliales au niveau de leur surface basale.

Les autres cellules infectables par les filovirus ne le sont que tardivement au cours de l'infection naturelle ou expérimentale, le plus souvent au stade terminal de la maladie. Ainsi, chez le cobaye ou le singe, les cellules endothéliales (*Jaax & al., 1996*), (*Johnson & al., 1995*), les hépatocytes et quelques rares cellules appartenant au tissu interstitiel du tractus digestif ou du tissu pulmonaire ne sont infectés qu'à partir de 6-7 jours après l'inoculation (*Connolly & al., 1999*) . En revanche, aucune expérience n'a pu montrer à ce jour que les lymphocytes étaient infectables.

II.4 Les protéines du virus Ebola

L'ARN génomique du virus Ebola est transcrit en 7 ou 8 ARN messagers, chacun codant

une protéine. On distingue la nucléoprotéine (NP), la protéine L (L), la glycoprotéine (GP) et les protéines virales (VP) de 35 kDa ; 40 kDa ; 30 kDa et 24 kDa.

II.4.1 La Nucléoprotéine.

Cette protéine résulte de la traduction du 1^{er} gène du génome du virus Ebola. Elle comprend 739 acides aminés et possède un poids moléculaire de 105 kDa.

La NP possède une double fonction structurale et fonctionnelle. En premier lieu, elle constitue l'élément majoritaire de la nucléocapside où elle se trouve intimement liée à la protéine L et aux protéines VP35 et VP30 (*Becker & al., 1998*). Sa partie C-terminale, hydrophile et très acide, interviendrait dans l'assemblage des protéines entre elles (*Kiley & al., 1988*), (*Elliott & al., 1985*). De plus, son caractère phosphorylé lui permet d'entrer en interaction avec l'ARN afin de former le complexe ribonucléoprotéique. En second lieu, la conception d'un système de répllication et de transcription de minigénomes monocistroniques artificiels a permis de déterminer que la NP est indispensable à la transcription, à la répllication et à l'encapsidation des virions (*Mühlberger & al., 1999*), (*Mühlberger & al., 1998*).

II.4.2 La protéine L.

Protéine codée par le 7^{ième} et dernier gène, la protéine L n'est entièrement identifiée que chez le virus de Marburg où elle est composée de 2331 acides aminés (*Volchkov & al., 1999a*) (*Bukreyev & al., 1995*). Elle possède beaucoup d'homologies avec les autres virus à ARN de polarité négative et elle est essentiellement localisées dans la région N-terminale (*Mühlberger & al., 1992*). Même si son activité n'a pas été démontrée, elle est considérée comme l'ARN polymérase.

II.4.3 Les glycoprotéines.

Les glycoprotéines du virus Ebola sont synthétisées à partir du 4^{ième} gène, qui est composé de 2 séquences de lecture ouverte (ORF). La séquence de lecture 1 (ORF I) est responsable de la synthèse d'une glycoprotéine soluble de 50-70 kDa, la sGP. L'ensemble des ORF I et ORF II gouverne la synthèse d'une glycoprotéine membranaire de 150 kDa, la GP, après insertion d'une base adénosine supplémentaire au cours de la transcription de l'ARN génomique. Deux ARNm monocistroniques sont alors formés, chacun responsable de la

synthèse d'une protéine, la sGP ou la GP. Les 295 acides aminés des parties N-terminales de la GP et de la sGP sont identiques, et seules les parties C-terminales diffèrent.

La GP est une protéine très glycosylée qui comporte 676 acides aminés. Les parties N- et C-terminales sont hydrophobes et très conservées parmi les différentes espèces de EBOV, alors que le milieu de la protéine est extrêmement hydrophile et variable et contient la majeure partie des carbohydrates (*Volchkov & al., 1999b*). L'attachement à la membrane a lieu au niveau de la partie C-terminale hydrophobe de la protéine. Dans l'enveloppe virale, les GP s'organisent sous forme d'homotrimères (*Feldmann & al., 1996b*), (*Sanchez & al., 1998*).

La glycoprotéine soluble (sGP) est une glycoprotéine soluble de 50-70 kDa et de 364 acides aminés synthétisée à partir de ORF I. C'est un homodimère dont les 2 monomères, reliés entre eux par un pont disulfure entre 2 résidus cystéine aux positions 53 et 306, sont parallèles mais orientés en sens contraire (*Volchkova & al., 1998*). Seuls les 295 acides aminés de la partie N-terminale de la sGP sont identiques à la GP. La sGP est retrouvée dans le milieu de culture de virus ou dans le sang des patients infectés par EBOV (*Sanchez & al., 1996*), (*Sanchez & al., 1999*).

II.4.4 La protéine virale de 35 kDa (VP35).

Protéine codée par le 2^{ème} gène du génome, la VP35 pèse 35 kDa et comporte entre 340 et 351 acides aminés. Comme la NP, elle existe aussi bien sous la forme phosphorylée que non phosphorylée. Mais, contrairement à la NP, seule la forme non phosphorylée est incorporée dans les virions (*Elliot & al., 1993*). Elle constitue la protéine la plus solidement ancrée dans le complexe ribonucléoprotéique et participe par conséquent à la composition de la nucléocapside (*Becker & al., 1998*). L'étude de ce minigénome artificiel a montré qu'elle était également indispensable à la transcription, à la réplication et à l'encapsidation des virions (*Mühlberger & al., 1999*).

II.4.5 La protéine virale de 40 kDa (VP40).

Issue du 3^{ème} gène, cette protéine comporte 326 acides aminés et possède un poids moléculaire d'environ 40 kDa (*Bukreyev & al., 1993*). Sa mobilité électrophorétique est très variable selon les espèces de EBOV et MBG (*Feldmann & al., 1994*). La VP40 n'est pas associée au complexe nucléoprotéique. Sa position sous-membranaire et son extrême

abondance la font considérer comme une protéine de matrice associée à la membrane. Enfin, elle aurait un rôle dans la régulation de la transcription et de la réplication.

II.4.6 La protéine virale de 30 kDa (VP30).

Protéine codée par le 5^{ème} gène, la VP30 a un poids moléculaire de 30 kDa et contient 260 acides aminés (*Sanchez & al., 1993*). Elle constitue la phosphoprotéine virale la moins représentée et fait partie des 4 protéines qui forment la nucléocapside. A ce titre, elle aurait un rôle dans le déclenchement de l'encapsidation du génome (*Becker & al., 1998*). Des études récentes, portant sur des systèmes artificiels, ont démontré que la VP30 était la seule protéine de la nucléocapside qui n'est pas nécessaire à la réplication ni à la transcription de minigénomes de virus de Marburg (*Mühlberger & al., 1998*). Des systèmes similaires avec le virus Ebola ont montré que la VP30 n'était pas non plus nécessaire pour la réplication mais était au contraire indispensable pour la transcription de minigénomes (*Mühlberger & al., 1999*). Dans ce cas, la VP30 agirait soit comme régulateur positif de l'initiation de la transcription, soit comme facteur d'élongation lors de la synthèse de l'ARNm ou lors de la polyadénylation, soit comme élément de stabilisation des ARNm.

II.4.7 La protéine virale de 24 kDa (VP24).

Issue de l'expression du 6^{ème} gène, la VP24 a une masse moléculaire de 24 kDa et possède 251 acides aminés (*Sanchez & al., 1993*). Elle constitue la 2^{ème} protéine de matrice et servirait à lier les protéines membranaires au complexe nucléoprotéique (*Bukreyev & al., 1995*). Son rôle est en fait mal connu, mais des études descriptives indiquent qu'elle interviendrait dans la pathogénicité. En effet, l'apparition de la pathogénicité au cours de passages séquentiels du virus Ebola chez le cobaye s'accompagne de mutations de plusieurs protéines dont les propriétés physico-chimiques ne sont modifiées que pour la VP24 (*Volchkov & al., 1994*).

III. Circulation du virus Ebola

III.1 Diffusion de la maladie dans les populations sauvages

Entre 1994 et 2005, la région frontalière du Gabon et de la République du Congo a été touchée par huit (8) épidémies à virus Ebola, suggérant une forte endémicité dans cette région.

Les différents épisodes épidémiques qui se sont produits entre 2001 et 2003 au Gabon et en République du Congo ont été associés pour la première fois à des mortalités chez les animaux, principalement les gorilles, les chimpanzés et les céphalophes.

Les enquêtes épidémiologiques menées sur 790 prélèvements issus d'une vingtaine d'espèces de primates du Cameroun, du Gabon et de la République du Congo (*Leroy & al., 2004b*), ont montré que 12,9% des chimpanzés sauvages de ces pays possèdent des IgG anti-Ebola, certains des échantillons positifs datant d'avant les premières épidémies dans ces régions. Ces résultats suggèrent que ces animaux sont régulièrement en contact avec l'animal réservoir du virus, que certains d'entre eux développent des infections non létales et que le virus Ebola est vraisemblablement présent depuis très longtemps dans le bloc forestier d'Afrique centrale (*Gonzalez & al., 2005*).

La découverte de cadavres d'espèces de primates infectées par le virus Ebola suggère fortement une implication prépondérante de ce virus dans ces mortalités. Entre 2001 et 2003, 50 carcasses de gorilles, 15 carcasses de chimpanzés et 14 carcasses de céphalophes ont été retrouvées dans la zone d'épidémie du Gabon et de la République du Congo. Sachant qu'une carcasse disparaît complètement en moins de trois semaines en forêt tropicale, et que ces carcasses ont été découvertes à moins de 3-4 heures de marche des villages pour la plupart d'entre elles, on peut estimer que plusieurs centaines voire milliers d'animaux ont péri pendant ces deux années dans toute cette région frontalière du nord-est du Gabon et de la République du Congo. Par ailleurs, les calculs d'indices de présence des animaux dans certains endroits (excréments, empreintes de pattes, végétaux brisés par le passage des animaux, présence de nids ...) ont révélé une hausse importante de la mortalité chez certaines espèces animales juste avant et pendant les épidémies humaines. Les populations de gorilles et de céphalophes auraient ainsi chuté de 50 % entre 2002 et 2003 dans le sanctuaire de Lossi (320 km²) en République du Congo (*Rouquet & al., 2005*), celles de chimpanzés de 88 % (*Leroy & al., 2004a*). Même si ces résultats restent approximatifs dans la

mesure où l'on sait par exemple que la disparition d'un mâle adulte gorille dominant provoque l'éclatement du groupe et que les individus dispersés sont alors difficiles à recenser, ils suggèrent fortement que le virus Ebola se manifesterait chez ces populations animales sous la forme de gigantesques épidémies provoquant la mort de centaines voire de milliers d'animaux en un laps de temps très court. Ces résultats interpellent par ailleurs sur le fait que le virus Ebola pourrait être à l'origine d'un déclin brutal et rapide, difficile à compenser, des populations animales dans les zones touchées par les épidémies d'Ebola.

Ces études récentes basées à la fois sur l'observation de mortalités animales parallèlement et simultanément aux épidémies humaines, et à la fois sur la confirmation biologique au laboratoire de l'infection Ebola des carcasses retrouvées prouvent et confirment ce que d'autres études avaient suggéré quelques années auparavant dans d'autres endroits. Tout d'abord, une équipe de primatologues ont relevé que les densités de populations de gorilles et de chimpanzés avaient fortement chuté entre 1994 et 1998 dans le bloc forestier de *Minkebe* au nord-est du Gabon près de la frontière avec le Cameroun (*Huijbregts & al., 2003*). La survenue d'épidémies d'Ebola chez l'homme en 1995 et 1996 dans les mêmes zones (*Mékouka et Mayibout*) laisse supposer que ce dramatique déclin des populations de gorilles et de chimpanzés dans cette région serait dû au virus Ebola. De même, une autre étude conduite dans la forêt Taï en Côte d'Ivoire a montré la disparition de 11 membres d'un groupe de 43 chimpanzés (soit 26% du groupe) dans le seul mois de novembre 1994 (*Formenty & al., 1999*). L'apparition du seul cas humain d'infection par *côte d'ivoire Ebolavirus* et l'analyse positive par immunohistochimie de tissus provenant d'un cadavre de chimpanzé, deux évènements survenus pendant la même période et au même endroit, suggèrent que la disparition d'une partie du groupe de chimpanzés serait également due au virus Ebola.

La présence d'anticorps spécifiques anti-Ebola chez d'autres espèces de singes (5 drills, 1 babouin, 1 mandrill et 1 cercopithèque) suggère que la circulation du virus pourrait être beaucoup plus complexe que le simple passage du réservoir aux gorilles et aux chimpanzés. L'existence de plusieurs espèces réservoirs et la possibilité que de nombreuses autres espèces animales soient sensibles au virus et susceptibles de participer à la propagation du cycle naturel du virus dans la nature ne sont pas à exclure.

III.2 Emergence du virus chez les animaux

La prise en compte des périodes et des localisations géographiques des différents épisodes épidémiques survenus au Gabon et en République du Congo entre 1995 et 2003 semblent montrer un déplacement des épidémies d’Ebola du nord-est du Gabon vers la République du Congo. Cette évolution a fait émettre l’hypothèse chez certains chercheurs que les gorilles et les chimpanzés seraient victimes d’une seule et même épidémie se propageant depuis une dizaine d’années dans un mouvement nord-ouest / sud-est au sein des populations animales (Walsh & al., 2003). Cette épidémie affecterait de manière dramatique les populations lors de son passage.

Fort de ces résultats et afin de comprendre les modes de contamination des grands singes, nous avons amplifié puis séquencé systématiquement la partie codante de la GP (gène le plus variable du génome du virus Ebola) à partir des échantillons prélevés chez toutes les carcasses de gorilles et de chimpanzés. Ces études ont identifié une séquence virale différente pour chacune des carcasses analysées (Leroy & al., 2004a).

Des séquences différentes ont été obtenues à partir des carcasses appartenant aux mêmes espèces (gorilles ou chimpanzés) découvertes au même moment à plusieurs centaines de mètres les unes des autres. Précédemment, nous avons évoqué la grande stabilité génétique du virus qui se manifeste par une absence totale de variation génétique au cours d’une même chaîne épidémique, même à la suite de nombreux passages de personnes en personnes. Par analogie, la présence de nombreuses mutations entre les séquences obtenues à partir des carcasses animales réfute l’hypothèse d’une contamination entre animaux de même espèce qui supposerait au contraire une identité de séquences. La diversité génétique des souches virales isolées à partir des cadavres indique donc que l’infection des grands singes résulterait de contaminations simultanées mais indépendantes les unes des autres à partir des animaux réservoirs.

La différenciation des souches virales résulterait alors probablement d’une adaptation avec l’hôte naturel du virus qui serait subdivisé en de nombreuses sous-espèces ou de nombreux groupes génétiques différents. Par conséquent, les épidémies d’Ebola chez les grands singes ne résulteraient pas de la propagation d’une seule épidémie d’individu à individu, mais plutôt de contaminations massives et simultanées de ces primates à partir de l’animal réservoir à la faveur de conditions environnementales particulières (les épidémies

surviennent toujours au même moment de l'année, pendant les périodes de transition entre la saison sèche et la saison des pluies). La contamination de l'homme s'effectue alors dans un second temps, généralement au contact des cadavres animaux.

S'il apparaît que les épidémies chez les primates surviennent principalement lors des changements de saisons, on ne connaît cependant pas exactement les conditions environnementales requises pour leur émergence, ni quel est l'hôte, réservoir naturel du virus, qui contamine ces derniers. Les recherches sont en cours pour tenter de caractériser ces paramètres

III.3 Travaux effectués sur la recherche du réservoir du virus Ebola

Le réservoir (hôte naturel) du virus Ebola reste encore inconnu. Depuis la première épidémie en 1976, de nombreuses études ont été initiées, aussi bien sur le terrain de l'épidémie qu'au laboratoire, afin de pouvoir identifier l'animal, vertébré ou invertébré, qui pourrait héberger de manière asymptomatique le virus.

La première étude de terrain remonte à l'épidémie de Yambuku, en 1976 en République Démocratique du Congo (RDC). Elle consistait à tenter d'infecter *in vitro* des lignées cellulaires sensibles au virus Ebola, telles que les cellules épithéliales de reins de singes (cellules véro). Pour cela, différents arthropodes capturés autour et dans les habitations des malades, étaient regroupés, puis écrasés. Le milieu de suspension obtenu était ensuite déposé sur des cellules véro. Des prélèvements de sang étaient également effectués chez les vertébrés capturés aux alentours des maisons et des villages, puis les cellules véro infectées par le sérum après centrifugation du sang total (Johnson & al., 1978). Aucun isolement viral n'a pu être obtenu à partir des animaux capturés comprenant 818 punaises de lit, 1500 moustiques, 10 cochons domestiques, 1 vache, 7 chauves-souris, 123 rongeurs, 8 écureuils, 6 singes cercopithèques, et 2 petites antilopes. Une étude similaire, portant sur un échantillon de 499 vertébrés, a pu être effectuée au moment de l'épidémie de 1976 au Soudan ; elle ne fournit également que des résultats négatifs (Arata & al., 1977).

Après le cas isolé d'infection par *zaire Ebolavirus* survenu à Tandala, RDC, en 1977 (Heymann & al., 1980), d'importantes investigations furent entreprises en 1979 dans une vaste région du nord de la RDC englobant Tandala et Yambuku distants d'environ 300 Km. Cette étude, réalisée entre juin et août 1979, pendant la saison sèche, concerna une première région centrée sur Yambuku s'étendant sur une superficie de 2800 km² et renfermant une

population d'environ 50000 habitants, et une deuxième région centrée sur Tandala définie par une superficie de taille équivalente à la précédente et renfermant une population de 80000 habitants (Bremner & al., 1999). La collection d'animaux capturés au cours de cette étude comportait 267 primates, 463 chauves-souris, 661 rongeurs, 173 autres mammifères, 67 oiseaux, et 33 reptiles et amphibiens. Là non plus, aucun isolement viral n'a pu être obtenu.

Deux autres études de terrain furent réalisées en 1995 autour de Kikwit immédiatement après l'épidémie. Les captures de 2814 vertébrés (Leirs & al., 1999) et de 27843 arthropodes (Reiter & al., 1999) se sont échelonnées respectivement sur 3 et 6 mois après la fin de l'épidémie. L'isolement viral fut tenté à partir des 2 catégories d'animaux, et les dosages d'IgG spécifiques pour zaire *Ebolavirus* ne furent pratiqués que chez les vertébrés. Aucune réponse IgG ne fut détectée, et aucun isolement viral ne fut obtenu sur cellules véro. La collection de vertébrés était notamment constituée de 1759 rongeurs, 539 chauves-souris, 114 insectivores, 184 oiseaux, 127 reptiles et amphibiens. Les arthropodes comprenaient 15118 moustiques, 124 phlébotomes, 6538 punaises de lit, 144 puces, 103 poux, et 5816 tiques.

Dans la forêt Taï, Côte d'Ivoire, 1642 vertébrés (652 chauves-souris, 283 rongeurs, 398 insectivores, 27 singes et 282 oiseaux) ont été capturés puis autopsiés entre 1996 et 1997 (Formenty & al., 1999). Les organes ont été prélevés puis analysés par les mêmes méthodes que celles décrites précédemment. Excepté une sérologie Ebola positive mise en évidence chez un singe colobe bai (*Colobus badius*), aucune réponse IgG ne fut détectée ni aucun isolement viral sur lignées cellulaires ne fut obtenu.

Enfin, une dernière étude, au cours de laquelle 242 vertébrés (24 chiroptères, 163 rongeurs et 56 insectivores) furent capturés, a été menée en République Centrafricaine (RCA) en 1998 (Morvan & al., 1999). Les analyses réalisées sur les organes prélevés ont permis cette fois-ci d'amplifier des petites séquences génétiques du virus Ebola à partir d'organes de 6 souris (*Mus setulosus* et *Praomys* sp) et d'une musaraigne (*Sylvisorex ollula*). Cependant, bien que ces résultats constituent à l'heure actuelle la seule preuve biologique d'indicateurs de présence du virus chez des animaux sains, l'absence de réponse sérologique spécifique, l'absence de particularité nucléotidique dans les séquences virales amplifiées, les échecs d'isolement viral et la non reproductibilité des résultats ne permettent pas d'énoncer que ces animaux suspects sont le réservoir du virus Ebola.

Simultanément aux études de terrain, l'infection expérimentale de nombreuses espèces animales et végétales a été tentée (Turell & al., 1996) (Swanepoel & al., 1996). Entre autres, nous pouvons citer différentes espèces de rongeurs (souris, mulots, rats, cochons d'inde ...), de chiroptères (chauves-souris), d'oiseaux (pigeons essentiellement), de reptiles (tortues, serpents, geckos, grenouilles), de mollusques (escargots essentiellement), d'arthropodes (araignées, cafards, fourmis, mille-pattes, moustiques, papillons ...) et plus de 33 variétés de plantes appartenant à 24 espèces différentes (tomates, concombres, blé, coton, lupin, maïs, tabac ...).

Les tentatives d'inoculation des rongeurs, oiseaux, reptiles, mollusques et végétaux se sont toutes soldées par un échec. De même, les tentatives d'inoculation d'arthropodes par voie intra-thoracique avec *zaïre Ebolavirus* ou *reston Ebolavirus* n'ont pu mettre en évidence une quelconque réplication virale.

En revanche, certaines espèces de chiroptères (du genre *Epomophorus* et *Tadarida*) ont développé une virémie transitoire pendant près de 4 semaines après inoculation par voie intraveineuse. Cependant, compte tenu du manque de reproductibilité de ces expériences, des conditions très particulières de l'infection (dose et voie d'inoculation etc.), ces résultats ne permettent pas de retenir non plus les chauves-souris comme réservoir du virus Ebola. Cependant, elles ouvrent des perspectives de recherche que les études ultérieures pourraient explorer.

C'est pourquoi, malgré quelques résultats positifs, malheureusement fragmentaires et partiels, donc non reproductibles, la problématique du réservoir du virus Ebola reste à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique. Cette thèse est une contribution à la recherche du réservoir " hôte naturel " du virus Ebola, afin de mieux comprendre les modalités d'apparition, de transmission et de propagation des épidémies.

La connaissance du réservoir du virus Ebola constitue un intérêt majeur pour la mise en place des stratégies préventives, thérapeutiques et vaccinales pour lutter contre cette terrible maladie.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Introduction générale

Plusieurs pays des régions forestières équatoriales de l'Afrique sont touchés depuis près de trois décennies par des épidémies de fièvre hémorragique à virus Ebola. Ce virus, à la forme caractéristique de filament, possède pour matériel génétique de l'ARN, et est subdivisé en quatre espèces dont trois sévissent en Afrique. L'infection de l'homme par le virus Ebola s'exprime globalement par un syndrome fébrile aigu accompagné de troubles digestifs graves et de signes hémorragiques divers et multiples. Cette maladie est une zoonose transmise à l'homme de manière accidentelle et épisodique par contact direct avec un animal infecté, et se manifeste le plus souvent sous la forme de flambées épidémiques tuant entre 50% et 80% des personnes malades. Très tôt, de nombreuses études ont été initiées dans le but d'élucider les modalités de circulation du virus dans son milieu naturel : Quel est le réservoir du virus Ebola ? Quelles sont les différentes espèces animales sensibles au virus ? Quelles sont les conditions environnementales propices aux transmissions interspécifiques ? Comment et auprès de quels animaux l'homme se contamine-t-il ? Autant de questions, auxquelles nous apportons des éléments de réponse, à travers les différents articles présentés ci-dessous.

Les études de terrain et de laboratoire ont été effectuées selon la méthodologie décrite à la page suivante.

II/ Méthodologie

II.1 Etude de terrain

Au cours des années 2002 et 2003, nous avons effectué 3 missions de captures d'animaux dans deux zones forestières touchées par les différentes épidémies à virus Ebola survenues entre 2001 et 2004. Les captures d'animaux se sont effectuées dans un rayon d'une dizaine de kilomètres autour d'une carcasse de gorille infectée par le virus Ebola, se sont étendues sur 3 semaines, et ont débuté seulement quelques jours après la découverte de la carcasse animale. Les conditions étaient donc réunies pour que les captures se déroulent au plus fort de la circulation du virus dans son milieu naturel.

Les trois sites de capture choisis, le village Ekata situé à 75 kilomètres de la ville de Mékambo au nord-est du Gabon, le district de Mbomo (60 Km d'Oloba, village frontalier entre le Gabon et le Congo Brazzaville) et le sanctuaire de Lossi (12 km de Mbomo), dans la cuvette ouest du Congo Brazzaville, présentent une végétation constituée en majorité des *Marantaceae* et *Zingiberaceae*. Le climat est de type équatorial, avec deux saisons sèches (Décembre à Février et Juin à Août) et deux saisons de pluies (Mars à Mai et Septembre à Novembre).

Les précipitations moyennes sont de l'ordre de 1500 mm par an et la température moyenne est de 24°C. L'humidité relative excède souvent 80%. Lorsque la présence d'une carcasse en zone d'épidémie est établie, sa localisation précise est effectuée à partir du GPS (Global Positioning System).

Nous avons eu recours aux filets pour capturer les oiseaux et les petits mammifères volants (chauves-souris), et aux pièges de type Sherman pour la capture des petits mammifères terrestres (souris, musaraigne etc.).

Au total, 1030 animaux ont été capturés, autopsiés et analysés. Les captures et les analyses de laboratoire se sont échelonnées sur 4 années.

Après notification de la date de capture en zone d'épidémie de chacune des espèces animales, un numéro d'identification a été attribué à chaque espèce, par exemple CHA001, pour l'animal numéro 1, qui est une chauve-souris, SOU002, pour l'animal numéro 2, qui est une souris, OIS004 pour l'animal numéro 4, qui est un Oiseau etc. La famille, le genre et l'espèce ont été répertoriés pour chaque espèce animale, ainsi, CHA001, appartient à la

famille des *Pteropodidae*, au genre *Epomops* et à l'espèce *franqueti*. SOU002, appartient à la famille des *Muridae*, au genre *Praomys* et à l'espèce *tullbergi*. Il en est de même pour *Hypsignathus monstrosus*, *Alethe iademata*, *Lissonycteris angolensis* etc (tableau I).

date	Numéro	famille	genre	espèce	sexe	localisat	type
03-févr-03	CHA001	<i>Pteropodidae</i>	<i>Epomops</i>	<i>franqueti</i>	M	Lossi	Mammifère
03-févr-03	SOU002	<i>Muridae</i>	<i>Praomys</i>	<i>tullbergi</i>	F	Lossi	Rongeur
03-févr-03	CHA003	<i>Pteropodidae</i>	<i>Hypsignathus</i>	<i>monstrosus</i>	M	Ekata	Mammifère
03-févr-03	OIS004	<i>Turdidae</i>	<i>Alethe</i>	<i>lademata</i>	M	Mbomo	Oiseau
03-févr-03	SOU005	<i>Pteropodidae</i>	<i>Lissonycteris</i>	<i>angolensis</i>	M	Ekata	Mammifère

Tableau I : Identification des petits mammifères capturés en zone d'épidémie.

Une localisation fine de chaque animal capturé a été faite grâce à l'utilisation du GPS (Tableau II). Les données indiquant la longitude et la latitude ont permis de mieux affiner cette localisation des animaux. Enfin, nous avons précisé l'ordre, selon qu'il s'agisse d'un mammifère, d'un oiseau, d'un rongeur etc. (tableau II).

GPS N : 00°40+/-2 E : 14°15+/-2								
longitude					latitude			
Numéro	lieu	deg N	min	sec	deg E	min	sec	type
CHA001	Lossi	0	40	31	14	17	36	Mammi
SOU002	Lossi	0	41	20	14	17	33	rongeur
CHA003	Ekata	0	40	31	14	15	29	Mammi
OIS004	Mbomo	0	41	31	14	17	26	Oiseau
SOU005	Ekata	0	41	22	14	15	28	Mammi

Tableau II : Données GPS obtenues pour chaque espèce animale.

II.2 Etude au laboratoire

Les échantillons biologiques (sérums et parties d'organes) provenant des zones épidémiques sont transférés dans leur totalité au laboratoire de sécurité maximale (niveau 4 ou P4).

Les sérums sont utilisés pour la recherche d'antigènes et d'anticorps spécifiques du virus

Ebola. Les broyats d'organes d'animaux (foie et rate en particulier) sont utilisés pour extraire l'ARN viral nécessaire à l'amplification par PCR des séquences spécifiques du virus Ebola à partir d'amorces dégénérées. Plusieurs autres analyses sont également effectuées à partir des broyats d'organes de chauves-souris, notamment les études immunohistochimiques et les tentatives d'isolement viral. Les fragments amplifiés trouvés positifs sont ensuite extraits puis séquencés. Un arbre phylogénétique est enfin constitué afin de comparer les séquences obtenues à partir d'organes de chauves-souris aux séquences de *Zaire Ebolavirus*, espèce qui prédomine au cours des épidémies apparues au Gabon et en République du Congo.

III/ Résultats

Les résultats obtenus à l'issue des études de terrain et de laboratoire, sont contenus dans les articles présentés et commentés ci-dessous, selon la chronologie:

III.1 Surveillance des mortalités animales (Article 1)

III.2 Diffusion de la maladie Ebola chez les espèces sensibles (Article 2)

III.3 La place du chien dans la transmission et la propagation des épidémies à virus Ebola ? (Article 3)

III.4 L'histoire naturelle du virus Ebola (Article 4)

III.5 La chauve-souris frugivore : potentiel candidat "réservoir du virus Ebola " (Article 5)

III.1 Surveillance des mortalités animales

ARTICLE 1 :

Rouquet P., Froment J.M., Bermejo M., Kilbourne A., Karesh W., **Kumulungui B.**, Yaba P., Délicat A., Rollin P.E., Leroy E.M. (2005).

Wild Animal Mortality Monitoring and Human Ebola Outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003. *Emerg. Inf. Dis.*, 11: 283-290.

Voir article joint séparément

RESUMÉ

Au cours des épidémies humaines et animales de fièvres hémorragiques virales à virus Ebola apparues entre 2001 et 2003 au Gabon et en République du Congo, nous avons mis en place un réseau de surveillance des mortalités animales 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 (Ecosystèmes Forestiers d'Afrique Centrale).

A chaque découverte de carcasse animale, notre équipe s'est déplacée pour effectuer des prélèvements pour que soient réalisées des analyses biologiques. C'est ainsi qu'au cours des épidémies d'août 2001 à juin 2003, plusieurs carcasses d'animaux ont été retrouvées dans deux sites, 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) aurait baissé de presque 50% entre 2002 et 2003.

Après analyse de 21 carcasses de primates au laboratoire, 14 carcasses dont 10 gorilles, 3 chimpanzés et 1 céphalophe, ont été trouvées PCR positives pour le virus Ebola. Ces résultats indiquent dans un premier temps que la plupart des épidémies humaines corrént avec une forte mortalité animale, et que l'homme est contaminé en manipulant des cadavres animaux, les grands singes en particulier.

Ces résultats interpellent en outre la communauté nationale et internationale sur l'observation selon laquelle une détection rapide des causes de mortalité permettrait de mettre en place des mesures préventives à l'égard des populations humaines dans le but de limiter l'ampleur des épidémies chez l'homme, voire d'éviter leurs apparitions.

III.2 Diffusion de la maladie Ebola chez les espèces sensibles.

ARTICLE 2

Leroy E.M., Telfer P., **Kumulungui B.**, Yaba P., Rouquet P., Roques P., Gonzalez J.P., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Nerrienet E. (2004)

A Serological Survey of Ebola Virus Infection in Central African Non-human primates. *J. Infect. Dis.*, 190: 1895-1899.

voir article joint séparément

RESUMÉ

Entre 1985 et 2000, une enquête sérologique menée sur 790 prélèvements issus d'une vingtaine d'espèces de primates du Cameroun, du Gabon et de la République du Congo, a montré que 12,9% des chimpanzés sauvages du Cameroun, du Gabon et de la République du Congo possèdent des IgG anti-Ebola, certains des échantillons positifs datant d'avant les premières épidémies dans ces régions. Ces résultats suggèrent que ces animaux sont régulièrement en contact avec l'animal réservoir du virus, que certains d'entre eux développent des infections non létales et que le virus Ebola est vraisemblablement présent depuis très longtemps dans le bloc forestier d'Afrique centrale. La présence d'anticorps spécifique anti-Ebola chez d'autres espèces de singes (5 drills, 1 babouin, 1 mandrill et 1 cercopithèque) suggère que la circulation du virus pourrait être beaucoup plus complexe que le simple passage du réservoir aux gorilles et aux chimpanzés.

Ces résultats obtenus à partir des carcasses animales montrent également que les grands singes des forêts d'Afrique centrale sont particulièrement exposés au virus Ebola. L'existence de plusieurs espèces réservoirs et la possibilité que de nombreuses autres espèces animales soient sensibles au virus et susceptibles de participer à la propagation du cycle naturel du virus dans la nature ne sont pas à exclure.

III.3 La place du Chien dans la transmission et la propagation des épidémies à virus Ebola

ARTICLE 3

Allela L., Boury O., Pouillot R., Delicat A., Yaba P., **Kumulungui B.**, Rouquet P., Gonzalez J.P., Leroy E.M. (2005).

Ebola Virus Antibody Prevalence in Dogs and Human Risk, *Emerg. Infect. Dis.*, **11** : 385-390.

Voir article joint séparément

RESUMÉ

Au cours des épidémies survenues au Gabon et en République du Congo en 2001 et 2002, plusieurs chiens ont été observés en train de consommer des restes d'animaux infectés par le virus Ebola, sans présenter de signes cliniques visibles. Afin de vérifier si les chiens ont bien été en contact avec le virus, nous avons recherché la présence d'anticorps spécifiques du virus Ebola dans leur sang. Le pourcentage de chiens porteurs de tels anticorps est apparu croître de manière linéaire et significative à mesure que l'on s'approche des foyers épidémiques: de 9% dans les deux grandes villes du Gabon (Libreville et Port-Gentil), pour atteindre 32% dans les villages (Ekata) où des cas humains ont pu être imputés à une source de contamination animale. Les chiens pourraient donc être infectés par le virus Ebola, et peut être aussi excréter du virus pendant un temps donné, devenant de fait une source potentielle d'infection pour l'homme. Ceci pourrait expliquer certaines contaminations humaines non élucidées. Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire de prendre en compte ce risque dans les mesures de lutte contre les épidémies.

III.4 L'histoire naturelle du virus Ebola

ARTICLE 4

Pourrut X., **Kumulungui B.**, Wittmann T., Moussavou G., Délicat A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J.P., Leroy E.M. (2005).

The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect.*, 7: 1005-1014.

Voir article joint séparément

RESUMÉ

Depuis la découverte du virus Ebola en 1976, 13 flambées épidémiques (9 dues à *Ebola zaire* et 4 à *Ebola soudan*) et 2 cas isolés (1 dû à *Ebola zaire* et l'autre à *Ebola côte d'ivoire*) ont affecté le continent africain en 3 périodes distinctes : 3 flambées entre 1976 et 1979, 4 entre 1994 et 1997 et 6 entre 2000 et 2004. Au total, le virus Ebola est responsable d'environ 1850 malades dont près de 1300 décès

Cet article fait le point sur l'ensemble des connaissances disponibles à l'heure actuelle sur l'histoire naturelle du virus Ebola en Afrique. Bien que quelques zones d'ombre persistent encore, il met particulièrement en lumière les avancées importantes qui ont été réalisées ces dernières années sur les modalités de circulation du virus dans son milieu naturel. Malgré une apparente disparité géographique des épidémies et une diversité génétique évidente entre les 3 espèces "africaines", le virus Ebola évolue et sévit au sein d'une entité écologique homogène représenté globalement par le bloc forestier des zones équatoriales de l'Afrique. Certes, le réservoir du virus n'est pas encore identifié. Mais, les étapes qui conduisent à l'apparition des épidémies chez l'homme à partir du réservoir sont globalement élucidées. Plusieurs espèces animales comme les grands singes sont naturellement infectées par le virus et contractent vraisemblablement le virus directement à partir du réservoir. Ces animaux intermédiaires développent la maladie, puis décèdent pour la plupart d'entre eux. Morts, ils constituent autant de sources potentielles de contamination pour l'homme qui, contaminé lors d'un contact, diffuse à son tour la maladie dans son écosystème. Ces animaux accidentellement infectés participent ainsi à la diffusion du virus dans d'autres niches écologiques liées à leurs milieu et mode de vie spécifiques à chacun d'entre eux. Cependant, la multiplicité des espèces animales permissives au virus, la diversité de sensibilité de ces espèces au virus ainsi que la grande disparité dans les modes de vie de ces espèces animales témoignent de la complexité potentielle du (ou des) cycle(s) de transmission du virus Ebola au sein de son milieu naturel.

La connaissance du réservoir et du cycle naturel du virus permettra sans doute de concevoir puis de mettre en place des stratégies adaptatives de prévention des épidémies chez l'homme ainsi que des stratégies visant à diminuer l'incidence du virus sur certaines espèces animales telles que les grands singes dont les populations sauvages se trouvent très sérieusement menacées dans les régions endémiques.

III.5 La chauve-souris frugivore : potentiel candidat réservoir du virus Ebola

ARTICLE 5

Leroy E.M., **Kumulungui B.**, Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R. (2005)

Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005 ; 438: 575-576.

Voir article joint séparément

RESUMÉ

Nous avons effectué entre 2001 et 2003, des captures d'animaux en zones forestières touchées par les différentes épidémies à virus Ebola, survenues dans la cuvette Ouest de la République du Congo. Au total, 1030 animaux ont été capturés, autopsiés puis analysés.

Des analyses effectuées en sérologie et en biologie moléculaire, il ressort que trois espèces de chauves-souris frugivores ont présenté des anticorps de type IgG anti-Ebola et certaines d'entre elles ont présentées des marqueurs d'infections Ebola dans leurs organes, notamment au niveau du foie et de la rate, deux organes intervenant dans la physiopathologie du virus. Il s'agit de *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonictoris torquata*.

Le séquençage des fragments amplifiés a confirmé la spécificité des séquences. L'analyse phylogénétique de ces séquences par les méthodes bayésienne et maximum de parcimonie montre l'appartenance de ces séquences à l'espèce *zaire* du virus Ebola. Ces trois espèces de chauves souris sont donc des porteurs asymptomatiques du virus Ebola.

Nous présentons dans cet article, pour la première fois, la chauve-souris frugivore comme un potentiel candidat " réservoir " du virus Ebola.

Nous confortons cette hypothèse des chauves-souris comme réservoir des virus Ebola et probablement Marburg, en prenant pour exemple plusieurs virus appartenant à des familles génétiquement proches des *Filoviridae*, telles que les *Paramyxoviridae* et les *Rhabdoviridae*, ayant pour réservoir des chauves-souris, comme le virus de la rage, le virus de Hendra ou le virus Nipah.

L'identification récente des chauves-souris en tant que réservoirs du virus Ebola permettra de concevoir puis de mettre en place des stratégies adaptatives de prévention des épidémies chez l'homme ainsi que des stratégies visant à diminuer l'incidence du virus sur certaines espèces animales telles que les grands singes dont les populations sauvages se trouvent très sérieusement menacés dans les régions endémiques.

AUTRES ARTICLES

Flori L., **Kumulungui B.**, Aucan C., Esnault C., Traoré A.S., Fumoux F., Rihet P. (2003). Linkage and association between *Plasmodium falciparum* blood infection levels and chromosome 5q31-q33. *Genes and Immunity*, 4: 265-268.

Rihet P., Traoré Y., Aucan C., Traoré-Leroux T., **Kumulungui B.S.**, Traoré A.S., Abel L., Fumoux F. (1999). Genetic dissection of *Plasmodium falciparum* blood infection levels and other complex traits related to human malaria infection. *Parassitologia*, 41 : 83-87.

COMMUNICATIONS ORALES

Leroy E.M., Pourrut X., **Kumulungui B.**, Nkoghe D. Histoire naturelle du virus Ebola en Afrique. *Quatrièmes rencontres médicales d'EL Rapha*. Libreville, Gabon 2005

Pourrut X., **Kumulungui B.**, Rouquet P., Leroy E.M. The natural history of Ebola virus : consequences in animal mortality monitoring network. *National network for the control of wildlife epidemics*. Limbe, Cameroon 2005

Kumulungui B., Pourrut X., Wittman T., Leroy E.M. L'histoire naturelle du virus Ebola. *Exposition universelle d'Aichi*. Japon 2005

Kumulungui B., Pourrut X., Leroy E.M. Histoire naturelle du virus Ebola en Afrique. *Troisième congrès de pathologie infectieuse et parasitaire*. Kinshasa, République Démocratique du Congo 2004.

Pourrut X **Kumulungui B.**, Leroy E.M. Réponses immunes et physiopathologiques à l'infection par le virus Ebola. *Troisième congrès de pathologie infectieuse et parasitaire*. Kinshasa, République Démocratique du Congo 2004

Kumulungui B.S., Ouattara C.A.T., Esposito F., Fumoux F. & Traoré A.S. Etude de l'activité antiplasmodique des tanins et des alcaloïdes sur les souches de *Plasmodium falciparum in vitro*. *Actes des III^{èmes} journées de Parasitologie*, Ouagadougou, Burkina Faso 1997.

Kumulungui B.S., Ouattara C.A.T., Fumoux F., Esposito F & Traoré A.S. Rôle pharmacodynamique des alcaloïdes et des tanins extraits des racines de *Mitragyna inermis* sur les cultures de *Plasmodium falciparum in vitro*. *Société Ouest Africaine de Parasitologie*, Dakar, Sénégal 1998.

Kumulungui B.S., Sanon S., Ouattara C.A.T., Barro N., Fumoux F. & Traoré A.S. Etude comparative de l'activité hémolytique de quelques plantes utilisées dans le traitement du paludisme au Burkina Faso. *Actes des V^{èmes} journées de Parasitologie*, Ouagadougou, Burkina Faso 1999.

Discussion

IV/ Discussion

IV.1 Surveillance des mortalités animales.

Entre 2001 et 2003, de nombreux animaux morts ont été retrouvés dans les forêts des régions touchées par les épidémies à virus Ebola. Au total, 50 carcasses de gorilles, 15 carcasses de chimpanzés et 14 carcasses de céphalophes ont été retrouvées dans la zone épidémique du Gabon et de la République du Congo (*Leroy & al., 2004a*).

Ces carcasses étaient toutes dans un état de décomposition tel que seuls des échantillons de muscle, de peau, ou voire des os ont pu être prélevés.

En fonction de leur état de décomposition, 22 carcasses ont été découvertes, prélevées puis analysées dans notre laboratoire entre 2001 et 2003. Sur les 22 carcasses analysées, 10 animaux (6 gorilles, 3 chimpanzés et 1 céphalophe) ont été diagnostiqués positifs pour l'infection Ebola, ce qui indique que ces trois espèces animales sont naturellement infectées par le virus Ebola et qu'elles développent dans la plupart des cas une infection létale (*Rouquet & al., 2005*). Ces résultats confirment les observations faites chez différents singes pour qui l'infection expérimentale par le virus Ebola conduit à une infection mortelle. Cependant, la rapidité et la gravité de la maladie lors des infections expérimentales dépendent de la dose et de la voie d'entrée du virus ainsi que de l'espèce virale.

Ces résultats obtenus à partir des carcasses animales montrent que les grands singes des forêts d'Afrique centrale sont particulièrement exposés au virus Ebola.

Une fois infectés, ces animaux intermédiaires développent la maladie, puis décèdent rapidement pour la majorité d'entre eux. Morts, ils constituent alors des sources potentielles de contamination pour l'homme qui diffuse ensuite la maladie à ses proches.

Au cours de nos travaux, nous avons montré pour la première fois que les épidémies humaines qui ont récemment touché le Gabon et la République du Congo corrèlent avec une forte mortalité animale, principalement les gorilles, les chimpanzés et les céphalophes (*Rouquet & al., 2005*).

La découverte de cadavres de ces trois espèces infectées par le virus Ebola suggère fortement une implication prépondérante de ce virus dans ces mortalités.

Sachant qu'une carcasse disparaît complètement en moins de trois semaines en forêt

tropicale, et que ces carcasses ont été découvertes à moins de 3-4 heures de marche des villages pour la plupart d'entre elles, on peut estimer que plusieurs centaines voire milliers d'animaux ont péri pendant ces deux années dans toute cette région frontalière du nord-est du Gabon et de la République du Congo. Par ailleurs, les calculs d'indices de présence des animaux dans certains endroits (excréments, empreintes de pattes, végétaux brisés par le passage des animaux, présence de nids ...) ont révélé une hausse importante de la mortalité chez certaines espèces animales juste avant et pendant les épidémies humaines. Les populations de gorilles et de céphalophes auraient ainsi chuté de 50 % entre 2002 et 2003 dans le sanctuaire de Lossi (320 km²) en République du Congo, celles de chimpanzés de 88 % (Leroy & al., 2004a). Même si ces résultats restent approximatifs dans la mesure où l'on sait par exemple que la disparition d'un mâle adulte gorille dominant provoque l'éclatement du groupe et que les individus dispersés sont alors difficiles à recenser, ils suggèrent fortement que le virus Ebola se manifesterait chez ces populations animales sous la forme de gigantesques épidémies provoquant la mort de centaines voire de milliers d'animaux en un laps de temps très court. Ces résultats interpellent par ailleurs sur le fait que le virus Ebola pourrait être à l'origine d'un déclin brutal et rapide, difficile à compenser, des populations animales dans les zones touchées par les épidémies d'Ebola. Ces études récentes basées à la fois sur l'observation de mortalités animales parallèlement et simultanément aux épidémies humaines, et à la fois sur la confirmation biologique au laboratoire de l'infection Ebola des carcasses retrouvées prouvent et confirment ce que d'autres études avaient suggéré quelques années auparavant dans d'autres endroits. Tout d'abord, une équipe de primatologues ont relevé que les densités de populations de gorilles et de chimpanzés avaient fortement chuté entre 1994 et 1998 dans le bloc forestier de *Minkebe* au nord-est du Gabon près de la frontière avec le Cameroun (Huijbregts & al., 2003). La survenue d'épidémies d'Ebola chez l'homme en 1995 et 1996 dans les mêmes zones (*Mékouka* et *Mayibout*) laisse supposer que ce dramatique déclin des populations de gorilles et de chimpanzés dans cette région serait dû au virus Ebola. De même, une autre étude conduite dans la forêt Taï en Côte d'Ivoire a montré la disparition de 11 membres d'un groupe de 43 chimpanzés (soit 26% du groupe) dans le seul mois de novembre 1994 (Formenty & al., 1999). L'apparition du seul cas humain d'infection par *côte d'ivoire Ebolavirus* et l'analyse positive par immunohistochimie de tissus provenant d'un cadavre de chimpanzé, deux évènements survenus pendant la même période et au même endroit,

suggèrent que la disparition d'une partie du groupe de chimpanzés serait également due au virus Ebola.

Ces résultats, nous amène à interpeller les populations vivant en zone d'épidémie sur les risques qu'elles encourent en manipulant tout animal trouvé mort dans la forêt.

IV.2 Diffusion de la maladie Ebola chez les espèces sensibles

Nous avons montré à l'issu d'une enquête sérologique menée sur plusieurs prélèvements issus d'une vingtaine d'espèces de primates du Cameroun, du Gabon et de la République du Congo que 12,9 % de chimpanzés possèdent des IgG anti-Ebola (*Leroy & al., 2004b*). Certains de ces échantillons trouvés positifs avaient été prélevés avant les premières épidémies dans ces régions. Ces résultats montrent que ces primates sont régulièrement en contact avec l'animal réservoir du virus, que certains d'entre eux développent des infections non létales et que le virus Ebola est vraisemblablement présent depuis très longtemps dans le bloc forestier d'Afrique centrale. La présence d'anticorps spécifiques anti-Ebola chez d'autres espèces de singes (5 drills, 1 babouin, 1 mandrill et 1 cercopithèque), suggère que la circulation du virus pourrait être beaucoup plus complexe que le simple passage du réservoir aux gorilles et aux chimpanzés. L'existence de plusieurs espèces réservoirs et la possibilité que de nombreuses autres espèces animales soient sensibles au virus et susceptibles de participer à la propagation du cycle naturel du virus dans la nature ne sont donc pas à exclure.

En prenant en compte les périodes et les localisations géographiques des différents épisodes épidémiques survenus au Gabon et en République du Congo entre 1995 et 2003, nous observons un déplacement des épidémies d'Ebola du nord-est du Gabon vers la République du Congo. Cette évolution a fait émettre l'hypothèse chez certains chercheurs que les gorilles et les chimpanzés seraient victimes d'une seule et même épidémie se propageant depuis une dizaine d'années dans un mouvement nord-ouest / sud-est au sein des populations animales (*Walsh & al., 2003*). Cette épidémie affecterait de manière dramatique les populations lors de son passage.

Le virus Ebola est un virus à ARN génétiquement très stable. A titre d'exemple, les taux de

mutations entre les souches *Booué* 96 (Gabon) et *Zaire* 76 ne sont que de 1,7% pour la glycoprotéine membranaire (GP), 1,3% pour la nucléoprotéine (NP), 1,2% pour la protéine virale de structure de 40 KDa (VP40) et 0,9% pour la protéine virale de structure de 24 KDa (VP24), alors que ces souches ont été isolées à plus de 1000 Km et 20 années de distance (*Leroy & al., 2002a*). Des différences similaires ont été retrouvées entre les gènes des souches des épidémies de 2001-2003, de la souche *Mékouka* 94 (Gabon) et de la souche *Zaire* 76 (*Leroy & al., 2004a*). De même, le séquençage de la partie la plus variable de la GP, portant sur 249 nucléotides, ne montra aucune mutation entre 9 patients (5 convalescents et 4 décédés) prélevés lors de l'épidémie de Kikwit au Zaïre (RDC) en 1995 (*Rodriguez & al., 1999*).

Fort de ces résultats et afin de comprendre les modes de contamination des grands singes, nous avons amplifié puis séquencé systématiquement la partie codante de la glycoprotéine membranaire (GP), qui est le gène le plus variable du génome du virus Ebola à partir des échantillons prélevés chez toutes les carcasses de gorilles et de chimpanzés. Ces études ont identifié une séquence virale différente pour chacune des carcasses analysées (*Leroy & al., 2004a*). Des séquences différentes ont été obtenues à partir des carcasses appartenant aux mêmes espèces (gorilles ou chimpanzés) découvertes au même moment à plusieurs centaines de mètres les unes des autres. Précédemment, nous avons évoqué la grande stabilité génétique du virus qui se manifeste par une absence totale de variation génétique au cours d'une même chaîne épidémique, même à la suite de nombreux passages de personnes en personnes. Par analogie, la présence de nombreuses mutations entre les séquences obtenues à partir des carcasses animales réfute l'hypothèse d'une contamination entre animaux de même espèce qui supposerait au contraire une identité de séquences. La diversité génétique des souches virales isolées à partir des cadavres indique donc que l'infection des grands singes résulterait de contaminations simultanées mais indépendantes les unes des autres à partir des animaux réservoirs. La différenciation des souches virales résulterait alors probablement d'une adaptation avec l'hôte naturel du virus qui serait subdivisé en de nombreuses sous-espèces ou de nombreux groupes génétiques différents. Par conséquent, les épidémies d'Ebola chez les grands singes ne résulteraient pas de la propagation d'une seule épidémie d'individu à individu, mais plutôt de contaminations massives et simultanées de ces primates à partir de l'animal réservoir à la faveur de conditions environnementales particulières (les épidémies surviennent toujours au même moment de l'année, pendant les périodes de transition entre la saison sèche et la saison des

pluies). La contamination de l'homme s'effectue alors dans un second temps, généralement au contact des cadavres animaux.

S'il apparaît que les épidémies chez les primates surviennent principalement lors des changements de saisons, on aimerait connaître cependant les conditions environnementales requises pour leur émergence, de même que l'animal réservoir naturel du virus, qui contaminerait ces derniers.

IV.3 La place du chien dans la transmission et la propagation des épidémies Ebola ?

Au cours des dernières épidémies survenues au Gabon et en République du Congo, plusieurs chiens ont été observés en train de consommer des restes d'animaux infectés par le virus Ebola, sans présenter de signes cliniques visibles. Afin de vérifier si les chiens ont bien été en contact avec le virus, avons recherché la présence d'anticorps spécifiques du virus Ebola dans leur sang.

Des résultats préliminaires ont montré que 4 sur 5 chiens prélevés dans le village de Mayibout, touché par une épidémie d'Ebola en 1996, possédaient des taux élevés d'anticorps anti-Ebola. Une étude sérologique de grande envergure a donc été effectuée entre mai et août 2003 dans le département de la Zadié, zone touchée par l'épidémie d'Ebola ayant sévi au Gabon en 2001-2002. Sur un total de 439 chiens prélevés puis analysés, le pourcentage de chiens porteurs d'anticorps anti-Ebola est apparu croître de manière linéaire et significative à mesure que l'on s'approche des foyers épidémiques.

De 9% dans les deux grandes villes du Gabon (Libreville et Port-Gentil), pour atteindre 32% dans les villages (Ekata) où des cas humains ont pu être imputés à une source de contamination animale. Les chiens pourraient donc être infectés par le virus Ebola, et peut être aussi excrétés du virus pendant un temps donné, devenant de fait une source potentielle d'infection pour l'homme. Ceci pourrait expliquer certaines contaminations humaines non élucidées. Il apparaît donc aujourd'hui nécessaire de prendre en compte ce risque dans les mesures de lutte contre les épidémies.

IV.4 L'histoire naturelle du virus Ebola

Les travaux de recherche que nous avons effectué dans le cadre de la préparation de cette

thèse, sont une contribution à la compréhension de l'histoire naturelle du virus Ebola en région tropicale.

L'histoire naturelle du virus Ebola comprend l'identification du réservoir naturel du virus, la circulation du virus au sein de son hôte naturel, le passage du virus de celui-ci à des espèces animales intermédiaires et sensibles au virus (c'est-à-dire développant une infection mortelle) et enfin la contamination de l'homme à partir de l'hôte naturel ou à partir des espèces intermédiaires.

Depuis la découverte du virus Ebola en 1976, 13 flambées épidémiques ont affecté le continent africain en 3 périodes distinctes (3 flambées entre 1976 et 1979, 4 entre 1994 et 1997 et 6 entre 2000 et 2004).

Cette description montre une tendance à une spécificité régionale des espèces du virus Ebola : *côte d'Ivoire Ebolavirus* en Afrique de l'ouest ; *soudan Ebolavirus* en Afrique de l'est et *zaïre Ebolavirus* en Afrique centrale.

Cependant, malgré cette relative spécificité géographique, le contexte écologique des épidémies humaines dues aux espèces " africaines " du virus Ebola est relativement homogène et englobe diverses régions forestières situées autour de l'équateur. Ces régions possèdent des caractéristiques écologiques et climatiques similaires : La végétation y est dense, et le climat de type tropical, chaud et humide comprenant deux pics de précipitations séparés par deux saisons sèches.

Au total, le virus Ebola est responsable d'environ 1850 malades dont près de 1300 décès, soit une létalité de 70%, correspondant au pourcentage de mortalité de l'espèce Ebola-Zaïre, qui sévit de façon endémique au Gabon et en République du Congo. Face à ce fort taux de mortalité, il devient plus que nécessaire aux responsables de la politique en matière de Santé Publique des pays touchés par des épidémies à virus Ebola, de prendre toutes les dispositions nécessaires afin de contrôler les risques d'apparition et de propagation des épidémies.

Nos travaux montrent que contrairement aux épidémies antérieures, la contamination de l'homme, lors des épidémies de 2001 à 2005, est survenue suite à la manipulation de carcasses infectées de Gorilles, Chimpanzés et de Céphalophes.

IV.5 La chauve souris frugivore: potentiel candidat " réservoir du virus Ebola " ?

Nous avons effectué entre 2001 et 2003, des captures d'animaux en zones forestières touchées par les différentes épidémies survenues entre 2001 et 2005. Ces captures d'animaux se sont effectuées dans un rayon d'une dizaine de kilomètres autour d'une carcasse de gorille infectée par le virus Ebola, elles se sont étendues sur 3 semaines, et ont débuté seulement quelques jours après la découverte de la carcasse animale. Les conditions étaient donc réunies pour que les captures se déroulent au plus fort de la circulation du virus dans son milieu naturel.

Au total, 1030 animaux ont été capturés, autopsiés puis analysés. Les captures et les analyses se sont échelonnées sur 4 années.

Des analyses effectuées en sérologie et en biologie moléculaire, il ressort que trois espèces de chauves-souris frugivores ont présenté des anticorps de type IgG anti-Ebola et certaines d'entre elles ont présentées des marqueurs d'infections Ebola dans leurs organes, notamment au niveau du foie et de la rate, deux organes intervenant dans la physiopathologie du virus. Il s'agit de *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* et *Myonictoris torquata*.

Le séquençage des fragments amplifiés a confirmé la spécificité des séquences. L'analyse phylogénétique de ces séquences par les méthodes bayésienne et maximum de parcimonie montre l'appartenance de ces séquences à l'espèce *zaire* du virus Ebola. Ces trois espèces de chauves souris sont donc des porteurs asymptomatiques du virus Ebola.

Les enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain ont montré que les mortalités des grands singes dues au virus Ebola surviennent principalement pendant les périodes de transition entre les saisons sèches et les saisons humides, à un moment de l'année où les ressources alimentaires se raréfient. L'appauvrissement en ressources alimentaires favoriserait la consommation de mêmes fruits au même moment par différentes espèces animales au régime alimentaire de type frugivore telles que les chauves-souris et les grands singes. Ces rassemblements augmenteraient alors la probabilité de contact entre ces deux espèces. De plus, un certain nombre d'événements comportementaux et physiologiques se produisent chez les espèces de chauves-souris incriminées pendant cette période tels que l'appauvrissement alimentaire, les compétitions intra spécifiques entre mâles, et les mises bas groupées des femelles. Ces événements participeraient à modifier la nature et le niveau des réponses immunitaires, propices à la reprise de la réplication virale dans les organes

cibles voire à l'apparition de virus dans la circulation sanguine. La contamination des grands singes interviendrait alors à la faveur de contacts directs avec le sang et/ou les tissus placentaires des femelles chauves-souris au moment de la parturition.

L'identification récente des chauves-souris en tant que réservoirs du virus Ebola permettra de concevoir puis de mettre en place des stratégies adaptatives de prévention des épidémies chez l'homme ainsi que des stratégies visant à diminuer l'incidence du virus sur certaines espèces animales telles que les grands singes dont les populations sauvages se trouvent très sérieusement menacées dans les régions endémiques.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons présenté dans cette thèse l'ensemble des connaissances acquises à l'heure actuelle sur l'histoire naturelle du virus Ebola en Afrique équatoriale. Bien que quelques zones d'ombre persistent encore, notre étude met particulièrement en lumière les avancées importantes qui ont été réalisées ces dernières années sur les modalités de circulation du virus dans son milieu naturel. Malgré une apparente disparité géographique des épidémies et une diversité génétique évidente entre les 3 espèces "africaines", le virus Ebola évolue et sévit au sein d'une entité écologique homogène représenté globalement par le bloc forestier des zones équatoriales de l'Afrique. Bien que, le réservoir du virus Ebola ne soit pas encore totalement identifié, nous avons pour la première fois présenté la chauve-souris frugivore comme un candidat potentiel " réservoir " du virus Ebola. Nous confortons cette hypothèse des chauves-souris comme réservoir des virus Ebola, en prenant pour exemple plusieurs virus appartenant à des familles génétiquement proches des *Filoviridae*, telles que les *Paramyxoviridae* et les *Rhabdoviridae*, qui ont pour réservoir des chauves-souris, l'exemple du virus de la rage (Amengual & al., 1997), du virus de Hendra (Halpin & al., 2000) ou du virus Nipah (Johara & al., 2001).

L'identification des chauves-souris frugivores comme candidat potentiel " réservoir " du virus Ebola, permettra d'explorer les mécanismes immunologiques de cet " hôte réservoir asymptotique et ce, dans le but de mettre en place des stratégies thérapeutiques et vaccinales afin de lutter contre cette terrible maladie.

Les étapes qui conduisent à l'apparition des épidémies chez l'homme à partir du réservoir sont globalement élucidées. Plusieurs espèces animales comme les grands singes sont naturellement infectées par le virus et contractent vraisemblablement le virus directement à partir du réservoir. Ces animaux intermédiaires développent la maladie, puis décèdent pour la plupart d'entre eux. Morts, ils constituent autant de sources potentielles de contamination pour l'homme qui, une fois contaminé lors d'un contact, propage à son tour la maladie dans son écosystème. Ces animaux accidentellement infectés participent ainsi à la diffusion du virus dans d'autres niches écologiques liées à leurs milieu et mode de vie spécifiques à chacun d'entre eux. Cependant, la multiplicité des espèces animales permissives au virus, la diversité de sensibilité de ces espèces au virus ainsi que la grande disparité dans les modes de vie de ces espèces animales témoignent de la complexité potentielle du (ou des) cycle(s) de transmission du virus Ebola au sein de son milieu naturel.

La connaissance du réservoir et du cycle naturel du virus permettra sans doute de concevoir puis de mettre en place des stratégies adaptatives de prévention des épidémies chez l'homme ainsi que des stratégies visant à diminuer l'incidence du virus sur certaines espèces animales telles que les grands singes dont les populations sauvages se trouvent très sérieusement menacées dans les régions endémiques.

Références bibliographiques

1. Allela L., Bourry O., Pouillet R., Delicat A., Yaba P., Kumulungui B., Rouquet P., Gonzalez J.P., Leroy E.M. (2005). Ebola virus Antibody Prevalence in Dogs and Human Risk. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 385-390.
2. Amblard J., Obiang P., Edzang S., Prehaud C., Bouloy M., Le Guenno B. (1997). Identification of the Ebola virus in Gabon in 1994. *Lancet*, 349:181-182.
3. Amengual B., Whitby J.E., King A., Cobo J.S., Bourhy H. (1997). Evolution of European bat lyssaviruses. *J. Gen. Virol.*, 78: 2319-2328.
4. Arata A.A., Johnson B. (1978). Approaches towards studies on potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in southern Sudan (1977), in Ebola virus haemorrhagic fever. Edited by Pattyn SR. Amsterdam, Elsevier/Netherland biomedical : 191-202
5. Baron R.C., McCorminck J.B., Zubier O.A. (1983). Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull. W.H.O.*, 61:997-1003.
6. Becker S., Rinne C., Hofsäb U., Klenk H-D., Mühlberger E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology*, 406-417.
7. Becker S., Rinne C., Hofsäb U., Klenk H-D., Mühlberger E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology*, 249: 406-417.
8. Bowen E.T.W., Platt G.S., Simpson D.I.H., McArdell L.B., Raymond R.T. (1978). Ebola haemorrhagic fever: Experimental infection of monkeys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72(2): 188-191.
9. 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. (1999). 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: S139-S147.
10. Bukreyev A.A., Belanov E.F., Blinov V.M., Netesov S.V. (1995). Complete nucleotide sequences of Marburg virus genes 5 and 6 encoding VP30 and VP24 proteins. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35(3): 605-613.
11. Bukreyev A.A., Belanov E.F., Blinov V.M., Netesov S.V. (1995). Complete nucleotide sequences of Marburg virus genes 5 and 6 encoding VP30 and VP24 proteins. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 35(3): 605-613.
12. Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. (1993). The VP35 and VP40 proteins of filoviruses: Homology between Marburg and Ebola viruses. *FEBS Lett.*, 322: 41-46.

13. Bwaka M.A., Bonnet M.J., Calain P., Colebunders R., De Roo A., Guimard Y., Katwiri K.R., Kibadi K., Kipasa M.A., Kuvula K.J., Mapanda B.B., Massamba M., Mupapa K.D., Muyembe-Tamfum J.J., Ndaberey E., Peters C.J., Rollin P.E., Van den Enden E. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J.Infect.Dis.*, 179:S1-S7.
14. Connolly B.M., Steele K.E., Davis K.J., Geisbert T.W., Kell W.M., Jaax N.K., Jahrling P.B. (1999). Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in Guinea pigs. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S203-S217.
15. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, 147: 169-176.
16. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, 147: 169-176.
17. Ellis D.S., Stamford S., Lloyd G., Bowen E.T., Platt G.S., Way H., Simpson D.I. (1979). Ebola and Marburg viruses: Some ultrastructure differences between strains when grown in Vero cells. *J. Med. Virol.*, 4(3): 201-211.
18. Emond R.T., Evans B., Bowen E.T., Lloyd G. (1977). A case of Ebola virus infection. *Br. Med. J.*, 2(6086): 541-544.
19. Feldmann H., Bugany H., Mahner F., Klenk H.D., Drenckhahn D., Schnittler H.J. (1996b). Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Clin. Invest.*, 70: 2208-2214.
20. Feldmann H., Jones S.M., Daddario-Dicaprio K.M., Geisbert J.B., Stroher U., Grolla A., Bray M., Fritz E.A., Fernando L., Feldmann F., Hensley L.E., Geisbert T.W. (2007). Effective Post-Exposure Treatment of Ebola Infection. *PloS Pathog.*, 3(1): e2
21. Feldmann H., Klenk H.D. (1996a). Marburg and Ebola viruses. *Adv. Virus Res.*, 47: 1-52.
22. Feldmann H., Klenk H.D., Sanchez A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch.Virol.Suppl.*, 7:81-100.
23. Feldmann H., Muhlberger E., Randolph A., Will C., Kiley M.P., Sanchez A., Klenk H.D. (1992). Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res.*, 24(1): 1-19.
24. Feldmann H., Nichol S.T., Klenk H-D., Peters C.J., Sanchez A. (1994). Characterization of filoviruses based on difference in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology*, 199: 469-473.

25. Formenty C., Boesch C., Wyers M., Steiner C., Donati F., Dind F., Walker B., LeGuenno B. (1999). Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of cote d'Ivoire. *J. Infect. Dis.*, 179: S120-S126.
26. Formenty P., Hatz C., Le Guenno B., Stoll A., Rogenmoser P., Wildmer A. (1999). Human infection due to Ebola virus, subtype côte d'ivoire: clinical and biologic presentation. *J.Infect.Dis.*, 179:S48-S53.
27. Formenty P., Leroy E.M., Epelboin A., Libama F., Lenzi M., Sudeck H., Yaba P., Allarangar Y., Boumandouki P., Nkoundou V.B., Drosten C., Grolla A., Feldmann H., Roth C. (2006). Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo. *Clin. Infect. Dis.*, 42(11) : 1521-1526.
28. Formenty P., Libama F., Epelboin A., Allarangar Y., Leroy E.M., Moudzeo H., Tarangonia P., Molamou A., Lenzi M., Ait-Ikhlef K., Hewlett B., Roth C., Grein T. (2003). L'épidémie de fièvre hémorragique à virus Ebola en République du Congo, 2003: une nouvelle stratégie ? *Med.Trop.*, 63:291-295.
29. Gear J.H.S. (1989). Clinicals aspects of african viral hemorrhagic fevers. *Rew. Infect. Dis.*, 11:S777-S782.
30. Gear J.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., Isaacson M., Gear J.H. (1975). Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br. Med. J.*, 4(5995): 489-493.
31. Geisbert T.W., Jahrling P.B., Hanes M.A., Zack P.M. (1992). Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J. Comp. Pathol.*, 106: 137-152.
32. Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jarling P.B. (2002). Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 8:503-507.
33. 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., Benoni D.D., Wickings E.J., Amblard J.P., Lansoud-Soukate J.M., Milleliri J.M., Baize S., Georges-Courbot M.C. (1999). Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and Health control issues. *J.Infect.Dis.*, 179:S65-S75.

34. Gonzalez J.P., Herbreteau V., Morvan J., Leroy E.M. (2005). Ebola virus circulation in Africa : a balance between clinical expression and epidemiological silence. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 98(3): 210-217.
35. Guimard Y., Bwaka M.A., Colebunders R., Calain P., Massamba M., De Roo A., Mupapa K.D., Kibadi K., Kuvula K.J., Ndaberey D.E., Katwiki K.R., Mapanda B.B., Nkuku O.B., Fleerackers Y., Van den Enden E., Kipasa M.A. (1999). Organization of patient care during the Ebola hemorrhagic fever epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.*, 179: S268-S273.
36. Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.*, 81: 1927-1932.
37. Heymann D.L., Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H. (1980). Ebola hemorrhagic fever: Tandala, 1977-1978. *J. Infect. Dis.*, 142:372-376.
38. Huijbregts B., De Wachter P., Ndong Obiang S., Akou Ella M. (2003). Ebola and the decline of gorilla *Gorilla gorilla* and chimpanzee *Pan troglodytes* populations in Minkebe forest, north-eastern Gabon. *Oryx.*, 37:437-443.
39. Isaacson M., Sureau P., Courteille G., Pattyn S.R. (1978). Clinical aspects of Ebola virus disease as the Ngaliema hospital, Kinshasa, Zaire, 1976, in Ebola virus haemorrhagic fever. Edited by Pattyn SR. New York, Elsevier/North-Holland biomedical press, pp 15-20.
40. Ivanov A.P., Tkachenko E.A., van der Groen G., Butenko A.M., Konstantinov O.K.(1986). Indirect enzyme-immunoassay for the laboratory diagnosis of Lassa and Ebola hemorrhagic fevers. *Vopr. Virusol.*, 31: 186-190.
41. Jaax N.K., Davis K.J., Geisbert T.J., Vogel P., Jaax G.P., Tropper M., Jahrling P.B. (1996). Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 120(2): 140-155.
42. Jahrling P.B. (1995). Filoviruses and Arenaviruses. pp 1068-1081.
43. Johara M.Y., Field H.E., Rashdi A.M., Morissy C., Van der Heide B., Rota P., Adzhar A.B., White J., Daniels P., Jamaluddin A., Ksiazek T.G. (2001). Nipah virus infection in bats (order chiroptera) in peninsular Malaysia, *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 439-441.
44. Johnson E.D., Jaax N., White J., Jahrling P. (1995). Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int. J. Exp. Pathol.*, 76(4): 227-236.
45. Johnson K.M. (1978). Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. World Health Organ.*, 56: 271-293.

46. Johnson K.M., Webb P.A., Lange J.V., Murphy F.A. (1977). Isolation and partial characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*, 1: 569-571.
47. Jones S.M., Feldmann H., Stroher 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. (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.*, 11(7):720-721.
48. Kalongi Y., Mwanza K., Tshisuaka M., Lusiana N., Ntando E., Kanzake L., Shieh W.-J., Zaki S.R., Lloyd E.S., Ksiazek T.G., Rollin P.E. (1999). Isolated case of Ebola hemorrhagic fever with mucormycosis complications, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S15-S17.
49. Khan A.S., Tshioko F.K., Heymann D.L., Le Guenno B., Nabeth P., Kerstiëns D.L., Fleerackers Y., Kilmarx P.H., Rodier G.R., Nkulu 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. (1999). The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.*, 179:S76-S86.
50. Kibadi K., Mupapa K., Kuvula K., Massamba M., Ndaberey D., Muyembe-Tamfum J.J., Bwaka M.A., De Roo A., Colebunders R. (1999). Late ophtalmologic manifestations in survivors of the 1995 Ebola virus epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S13-S14.
51. Kiley M.P., Cox N.J., Elliott L.H., Sanchez A., DeFries R., Buchmeier M.J., Richman D.D., McCormick J.B. (1988). Physicochemical properties of Marburg virus: Evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *J. Gen. Virol.*, 69: 1957-1967.
52. Ksiazek T.G. (1991). Laboratory diagnosis of filovirus infections in nonhuman primates. *Lab. Anim.*, 20: 34-46.
53. Ksiazek T.G., E. R.P., 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. (1999). 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.*, 179(Suppl 1): S177-187.
54. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J. (1992). Enzyme Immunosorbent Assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J.*

- Clin. Microbiol.*, 30(4): 947-950.
55. Ksiazek T.G., West C.P., Rollin P.E., Jahrling P.B., Peters C.J. (1999). ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl 1): S192-198.
 56. Kuming B.S., Kokoris N. (1977). Uveal involvement in Marburg virus disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 61: 265-266.
 57. Le Guenno B., Formenty P., Boesch C. (1999). 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*, Springer-Verlag, Berlin, 235:77-84.
 58. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C.(1995). Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola. *Lancet*, 345:1271-1274.
 59. Leirs H., Mills J.N., Krebs J.W., Childs J.E., Akaibe D., Woolen N., Ludwig G., Peters C.J., Ksiazek T.G. (1999). Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Reflections on a vertebrate collection. *J. Infect. Dis.*, 179: S155-S163.
 60. Leroy E.M., Baize S., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E., Apetrei C. (2002a). 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: 67-73.
 61. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P. & Swanepoel R. (2005). Fruits bats as potential reservoirs of Ebola virus. *Nature*, 438:575-576.
 62. Leroy E.M., Rouquet P., Formenty P., Souquere S., Kilbourne A., Froment J.M., Bermejo M., Smit S., Karesh W., Swanepoel R., Zaki S.R., Rollin P.E. (2004a). Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science*, 303:387-390.
 63. Leroy E.M., Souquiere S., Rouquet P., Drevet D. (2002b). Re-emergence of Ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Lancet*, 359:712.
 64. Leroy E.M., Telfer P., Kumulungui B., Yaba P., Rouquet P., Roques P., Gonzalez J.P., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Nerrrienet E. (2004b). A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates. *J. Infect. Dis.*, 190:1895-1899.
 65. 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 (1999). A model for early detection and prevention of Ebola Hemorrhagic. *J.*

- Infect. Dis.*, 179: S274-S280.
66. Lupton H.W., Lambert R.D., Bumgardner D.L., Moe J.B., Eddy G.A. (1980). Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model. *Lancet*, 2: 1294-1295.
 67. Lupton H.W., Lambert R.D., Bumgardner D.L., Moe J.B., Eddy G.A.(1980). Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model. *Lancet*, 2:1294-1295.
 68. 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. (2006). A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol.*, 13(11): 1267-1277.
 69. Martini G.A. (1969). Marburg agent disease in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 295-302.
 70. Martini G.A., Siegert R. (1971). Marburg virus disease. New York, Springer;
 71. Morvan J.M., Deubel V., Gounon P., Nakoune E., Barriere P., Murri S., Perpète O., Selekon B., Coudrier D., Gautier-Hion A., Colyn M., Volechkov V. (1999). Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes and Infection*, 1: 1193-1201.
 72. Mühlberger E., Lötfering B., Klenk H-D., Becker S. (1998). Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.*, 72(11): 8756-8764.
 73. Mühlberger E., Sanchez A., Randolph A., Will C., Kiley M.P., Klenk H-D., Feldmann H. (1992). The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology*, 187: 534-547.
 74. Mühlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H-D., Becker S. (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg and Ebola virus by using artificial replication systems. *J. Virol.*, 73(3):2333-2342.
 75. Mühlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H-D., Becker S. (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg and Ebola virus by using artificial replication systems. *J. Virol.*, 73(3):
 76. Mullis K., Faloona T. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155: 335-351.
 77. Murphy F.A., Kiley M.P., Fisher-Hoch S.P. (1990). Marburg and Ebola viruses, in

- Virology. Edited by Fields BN, Knipe DM. New York, Raven Press, pp 933-942
78. Ndambi R., Akamituna P., Bonnet M.J., Tukadila A.M., Muyembe-Tamfum J.J., Colebunders R. (1999). Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S8-S10.
 79. Nkoghe D., Formenty P., Leroy E.M., Nnegue S., Edou S.Y., Ba J.I., 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., Kone L.M., Yada A., Roth C., Mve M.T. (2005). Multiple Ebola virus haemorrhagic fever outbreaks in Gabon, from October 2001 to April 2002. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 98(3) : 224-229.
 80. Nkoghe D., Formenty P., Nnegue S., Mve M.T., Hypolite I., Leonard P., Leroy E. (2004). Recommandations pratiques pour la prise en charge sur le terrain des patients infectés par le virus Ebola. *Med. Trop.*, 64 : 199-204
 81. P'iankov O.V., Sergeev A.N., P'iankova O.G., Chepurnov A.A. (1995). Experimental Ebola fever in *Macaca mulatta*. *Vopr. Virusol.*, 40: 113-115.
 82. Piot P., Sureau P., Breman G. (1978). Clinical aspects of Ebola virus infection in Yambuku area, Zaire, 1976, in Ebola virus haemorrhagic fever. Edited by Pattyn SR. New York, Elsevier/North-Holland biomedical press, pp 7-14
 83. Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T., Moussavou G., Delicat A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J.P., Leroy E.M. (2005). The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes and Infection*, 7:1005-1014.
 84. Pushko P., Bray M., Ludwig G.V., Parker M., Schmaljohn A., Sanchez A., Jahrling P.B., Smith J.F. (2000). Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 19:142-53.
 85. Rao M., Bray M., Alving C.R., Jahrling P., Matyas G.R. (2002). Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J. Virol.*, 76:9176-85.
 86. Regnery R.L., Johnson K.M., Kiley M.P. (1980). Virion nucleic acid of Ebola virus. *J. Virol.*, 36(2): 465-469.
 87. 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.J., Ksiazek T.G.

- (1999). Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: Arthropod studies. *J. Infect. Dis.*, 179: S148-S154.
88. 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., Nichol S.T. (1999). Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.*, 179: S170-S176.
89. 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. (2005). Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003. *Emerg. Infect. Dis.*, 11:283-290.
90. Ryabchikova E., Kolesnikova L., Smolina M., Tkachev V., Pereboeva L., Baranova S., Grazhdantseva A., Rassadkin Y. (1996). Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch. Virol.*, 141: 909-921.
91. Ryabchikova E.I., Vorontsova L.A., Skripchenko A.A., Shestopalov A.M., Sandakhchiev L.S. (1994). Involvement of internal organs of experimental animals infected with Marburg disease virus. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 117: 430-434.
92. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., Auperin D.D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: Organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Research*, 29: 215-240.
93. Sanchez A., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Miranda M.E.G., Trappier S.G., Khan A.S., Peters C.J., Nichol S.T. (1999). Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl 1): S164-169.
94. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W.J., Peters C.J., Nichol S.T. (1996). The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3602-3607.
95. Sanchez A., Yang Z-Y., Xu L., Nabel G.J., Crews T., Peters C.J. (1998). Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J. Virol.*, 72(8): 6442-6447.
96. Skripchenko A.A., Ryabchikova E.I., Vorontsova L.A., Shestopalov A.M., Viazunov S.A. (1994). Marburg virus and mononuclear phagocytes: study of interactions. *Vopr. Virusol.*, 39: 214-218.
97. Smith C.E.G., Simpson D.I.H., Bowen E.T.W. (1967). Fatal human disease from vervet

monkeys. *Lancet*, 2: 1119-1121.

98. Smith D.H., Francis F., Simpson D.I.H. (1978a). African haemorrhagic fever in Southern Sudan, 1976: the clinical manifestations, in Ebola virus haemorrhagic fever. Edited by Pattyn SR. New York, Elsevier/North-Holland biomedical press, pp 21-26.
99. Smith D.I.H. (1978b). Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull. World Health Organ.*, 56: 247-270.
100. Stroher U., Feldmann H. (2006). Progress towards the treatment of Ebola haemorrhagic fever. *Expert Opin Investig Drugs*, 15(12): 1523-1535.
101. 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. (2003). Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 424:681-684.
102. Sullivan N.J., Sanchez A., Rollin P.E., Yang Z-Y., Nabel G.J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, 408:605-609.
103. Swanepoel R., Leman P.A., Burt F.J. (1996). Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 2:321-325.
104. Turell M.J., Bressler D.S., Rossi C.A. (1996). Lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:89-90.
105. Volchkov V.E. (1999b). Processing of the Ebola virus glycoprotein, in Current topics in microbiology and immunology: Marburg and Ebola viruses. Edited by Klenk H-D. Berlin, Springer-Verlag, 235: 35-47
106. Volchkov V.E., Chepurnov A., Dryga S., Becker S., Blinov S., Kotov A., Ternovoj V., Klenk H-D., Netesov S.V. (1994). Molecular characterization of a pathogenicity variant of Ebola virus, in International conference of negative strand RNA viruses. Estoril, Portugal, p 176.
107. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H-D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5762-5767.
108. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Chepurnov A.A., Blinov V.M., Dolnik O., Netesov S.V., Feldmann H. (1999a). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.*, 80:
109. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Slenczka W., Klenk H-D., Feldmann H. (1998). Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology*, 245: 110-119.

110. Volchkova V.A., Feldmann H., Klenk H-D., Volchkov V.E. (1998). The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology*, 250: 408-414.
111. Walsh P.D., Abernethy K.A., Bermejo M., Beyers R., De Wachter P., Ella Akou M., Huijbregts B., Idiata Mambounga D., Kamdem-Toham A., Kealbourn 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., Wilkie D.S. (2003). Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature*, 422:611-614.
112. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever in south Sudan-update (2004), Wkly. *Epidemiol. Rec.*, 79: 253.
113. World Health Organization. Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, august 2000-January 2001 (2001), Wkly. *Epidemiol. Rec.*, 76: 41-48.
114. Wyers M., Formenty P., Cherel Y., Guigand L., Fernandez B., Boesch C., Le Guenno B. (1999). Histopathological and immunohistochemical studies of lesions associated with Ebola virus in a naturally infected chimpanzee. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S54-S59.
115. Xu L., Sanchez A., Yang Z-Y, Zaki S.R., Nabel E.G., Nichol S.T., Nabel G.J. (1998). Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med.*, 4:37-42.
116. Zaki S.R., Peters C.J. (1997). Viral hemorrhagic fevers, in Diagnostic pathology of infectious diseases. Edited by Connor DH, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE. Stamford, Appleton and Lange, pp 347-364.
117. 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., Lloyd E., Rollin P.E., Ksiazek T.G, Peters C.J. (1999). A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: Implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 1): S36-S47.
118. Zlotnik I. (1969). Marburg agent disease: Pathology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 310-327.