La fièvre hémorragique à virus Ebola : généralités sur le virus et rôle d'une unité militaire de recherche en virologie au cours d'une épidémie

O. Ferraris[a], O. Reynard[b], A. Ferrier[a], S. Emonet[a], I. Drouet[a], F. Jarjaval[a], F. Iseni[a], C.N. Peyrefitte[a, c]

a Unité de virologie de l'Institut de recherche biomédicale des armées, 21 avenue Tony Garnier – 69365 Lyon Cedex 07.
b Unité Molecular basis of viral pathogenicity, *INSERM, 21 avenue Tony Garnier – 69365 Lyon Cedex 07.*
c École du Val-de-Grâce, 1 place Alphonse Laveran – 75230 Paris Cedex 05.

Résumé

L'épidémie de fièvre hémorragique de la maladie à virus Ebola qui a sévi entre 2013 et 2015 a été la plus importante depuis la découverte du virus en 1976. Le rôle étiologique d'un virus de classe 4 pour lequel il n'existait au début de l'épidémie ni vaccin ni molécule antivirale commercialisés, associé à une transmission interhumaine par les fluides biologiques dans des pays aux systèmes de santé fragiles et non préparés explique en grande partie la flambée épidémique et les difficultés à la maîtriser. La connaissance du virus Ebola, de sa pathogénicité, des stratégies d'échappement immunitaire constitue la base indispensable pour relever les multiples défis en termes de diagnostic, de prévention, de développement de contre-mesures médicales.

Mots-clés : Filovirus. Pouvoir pathogène. Structure virale. Virus Ebola.

Abstract

Ebola virus hemorrhagic fever: the virus description and the role during an outbreak of a military research group specialized in highly pathogenic viruses.

Since its first description in 1976, the largest Ebola virus disease outbreak occurred from 2013 through 2015 in Western Africa. The magnitude of this epidemic might be largely explained by the high pathogenicity of the BSL-4 virus, the absence of any validated vaccine or antiviral molecules at the beginning of the outbreak, its human transmission route through the infected body fluids. Additionally, worsening factors were a fragile health care system in developing countries and the lack of preparedness plans. Scientific knowledge on Ebola virus, including on its pathogenicity and its immune escape system are fundamental to respond to the multiple challenges such as its diagnosis, prevention and therapeutics development.

Keywords: Filovirus. Pathogenicity. Viral structure. Ebola virus.

Introduction

Le 23 mars 2014 le ministère de la Santé de la République de Guinée déclarait à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) une épidémie de fièvre hémorragique à virus Ebola dans le sud du pays en zone forestière. L'épidémie s'était propagée au Liberia et en Sierra Leone. Elle s'est révélée être la plus importante depuis la découverte du virus en 1976. À la date du 30 décembre 2015, l'OMS rapportait un total de 28 601 cas confirmés, probables et suspects et 11 300 décès pour ces trois pays. Le rôle étiologique d'un agent viral de classe 4 dans une épidémie d'une telle ampleur constituait un défi. Le diagnostic de ce virus n'était jusqu'alors réalisé en routine qu'en laboratoire de niveau de sécurité biologique de classe 4. Le développement de contre-mesures médicales (molécules antivirales, immunothérapie par anticorps ou vaccins) n'était alors réalisé que par de rares équipes de recherche. L'intérêt de l'industrie pour leur développement et leur production était faible en raison du petit nombre de cas humains rapportés entre 1976 et fin 2013. Une équipe de virologie de l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), localisée dans les locaux de la

O. FERRARIS, docteur es sciences, O. REYNARD, docteur es sciences, A. FERRIER, docteur es sciences. S. EMONET, docteur es sciences. I. DROUET, technicienne de laboratoire. F. JARJAVAL, technicienne de laboratoire. F. ISENI, docteur es sciences. C.N. PEYREFITTE, pharmacien en chef, professeur agrégé du Val-de-Grâce.
Correspondance : Monsieur le pharmacien en chef C.N. PEYREFITTE, Institut de recherche biomédicale des armées, BP 73 – 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex.

Fondation Mérieux à Lyon, seul laboratoire de niveau de sécurité biologique de classe 4 opérationnel au début de l'épidémie, a pris part à la gestion de cette crise sanitaire au profit du Service de santé des armées (SSA) et en collaboration avec les institutions civiles françaises et guinéennes. Cet article présente les données scientifiques essentielles à la compréhension de la biologie du virus Ebola et l'action de l'unité de virologie de l'IRBA.

Le virus

Phylogénie

Les filovirus sont connus pour être parmi les pathogènes les plus létaux pour l'homme. Ils appartiennent à l'ordre des *Mononegavirales* qui regroupent les familles *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* et *Bornaviridae*, virus à génome ARN simple brin non segmenté, de polarité négative. La famille des *Filoviridae* compte trois genres : *Ebolavirus*, *Marburgvirus* et *Cuevavirus*.

Les cinq espèces du genre *Ebolavirus* sont :
– *Ebola virus* (EBOV, anciennement Ebola Zaïre) ;
– *Sudan virus* (SUDV) ;
– *Taï Forest virus* (TAFV, anciennement Ebola Côte d'Ivoire) ;
– *Reston virus* (RESTV) ;
– *Bundibugyio virus* (BDBV).

Les maladies dues aux virus BDBV, EBOV, SUDV et TAFV sont nommées maladie à virus Ebola (MVE).

Les deux espèces du genre *Marburgvirus* sont :
– *Marburg virus* (MARV) ;
– *Ravn virus* (RAVNV).

La maladie due aux virus MARV et RAVV est nommée maladie à virus Marburg (MVD pour *Marburg virus disease*).

Le genre *Cuevavirus* ne compte qu'un seul représentant, le virus Lloviu (1, 2).

Ils se distinguent tous par des propriétés antigéniques spécifiques (3). De plus, ils présentent une divergence du gène de la glycoprotéine de 37 à 41 % au niveau de la séquence nucléotidique et de 34 à 43 % en termes d'acides aminés (4).

Il n'existe pas de réaction antigénique croisée entre les virus EBOV et MARV en raison de la divergence de 72 % au niveau de leurs séquences nucléotidiques respectives dans la protéine GP.

Organisation du génome et rôle des protéines

Les filovirus, d'un diamètre d'environ 80 nanomètres et d'une longueur pouvant atteindre 1 à 1,5 microns sont pléomorphiques. Si le virus MARV est souvent observé sous une forme circulaire, le virus EBOV est plus fréquemment caractérisé par de longs filaments en forme de U ou de 6 (5) (fig. 1). Le virus EBOV est enveloppé d'une bicouche lipidique dans laquelle est enchâssée la glycoprotéine de surface. À l'intérieur, les protéines de matrice tapissent la face interne de l'enveloppe et entourent la ribonucléoparticule.

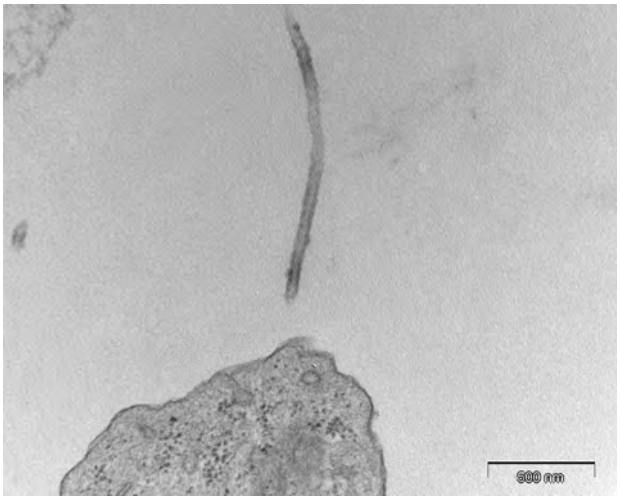


Figure 1. Virus Ebola venant de bourgeonner dans le milieu extra-cellulaire, Photos Microscopie Électronique à transmission : crédit O. Reynard/M. Matéo.

Composés d'environ 19 000 bases, les génomes des filovirus sont les plus gros virus de l'ordre des *Mononegavirales*. Leur génome est constitué en 3', d'une région « Leader » non codante, suivie d'une succession linéaire de gènes codant la nucléoprotéine NP, la VP35, la VP40, la glycoprotéine GP, la VP30, la VP24 et la polymérase L puis de la séquence non codante « Trailer » en 5' (fig. 2). La région *Leader*, constituée de 55 nucléotides chez le virus EBOV et de 48 nucléotides chez le virus MARV, contient la première partie du promoteur d'initiation de la transcription d'ARNm (6).

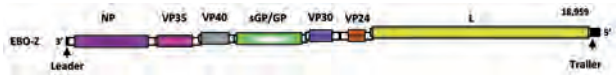


Figure 2. Représentation du génome viral codant les 7 protéines de structure et une protéine non structurale. Les rectangles blancs indiquent les gènes et les rectangles colorés, les cadres de lecture ouverts. Crédit O. Reynard.

La région *Trailer* (5') a une longueur variable chez les Filovirus et comprend les signaux nécessaires à la synthèse de nouveaux génomes lors de la réplication virale (6). La polymérase L, la nucléoprotéine NP et les protéines VP30 et VP35 sont impliquées dans la formation du complexe ribonucléoprotéique. VP40 et VP24 sont des protéines associées à la membrane.

Il est à noter que le génome du virus EBOV ne code pas directement la glycoprotéine d'enveloppe mais pour une forme soluble de celle-ci, la sGP. C'est par un mécanisme d'édition du gène (7) qu'un saut de cadre de lecture s'effectue au 2/3 de la longueur du gène permettant ainsi la génération d'un ARN messager plus long codant pour la glycoprotéine de surface. La présence et la position de zones chevauchantes entre

les gènes correspondants aux protéines VP35-VP40, GP-VP30 et VP24-L a été utilisée comme critère de classification pour les différentes espèces de la famille des filovirus (3). Les gènes des virus EBOV et MARV possèdent à leurs extrémités des séquences consensus (3'-5') – CUNCNUNUAAUU et (3'-5') – UAAUUCUUUUUN qui, par analogie avec le génome des autres *Mononegavirales*, sont considérées comme des signaux d'initiation et d'arrêt de la transcription (8). Le pentamère très conservé – UAAUU – à chaque extrémité des régions transcrites caractérise le génome filoviral (6).

La GP transmembranaire est responsable du tropisme du virus et de la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'entrée des virus EBOV et MARV dans les cellules. L'utilisation de vecteurs rétroviraux exprimant la GP a démontré que la sous-unité GP1 est responsable de l'attachement du virus sur les cellules (9, 10). La GP est responsable de l'attachement et de l'entrée des virions de la cellule hôte. L'attachement du virus EBOV à la cellule se ferait grâce à la médiation de plusieurs protéines de surface dont les lectines de type C, les β1 intégrines, les récepteurs TAM, et les protéines TIM-1. À l'heure actuelle aucun récepteur de surface n'a clairement été identifié de façon indubitable. En revanche, l'entrée des particules virales des virus EBOV, SUDV, BDBV, TAFV, MARV, et LLOV dans le cytoplasme à partir de l'endosome est dépendante de la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1) (5) (11, 12). Plusieurs études ont proposé que la glycoprotéine GP transmembranaire était responsable de l'effet cytopathogène observé dans les cellules infectées par les virus EBOV et MARV (13). L'expression de la GP transmembranaire provoque un arrondissement et un détachement des lignées de cellules embryonnaires de rein humain (293T), de rein de singes (VeroE6), de macrophages ou encore de cellules endothéliales (14). Ce changement de phénotype a été décrit comme provenant du masquage des protéines cellulaires de surface (15). La protéine soluble sGP permettrait de réguler la production de GP et donc de limiter sa cytotoxité pour les cellules. Elle permettrait ainsi une meilleure réplication et propagation du virus EBOV (16). De plus, la sécrétion de sGP par les cellules infectées pourrait constituer un leurre moléculaire permettant au virus d'échapper à la surveillance immunitaire et jouerait un rôle protecteur pour l'intégrité de l'endothélium vasculaire (14) en inhibant les effets du TNF-α sur la perméabilité de la barrière endothéliale. La glycoprotéine soluble serait ainsi un facteur de régulation de la réponse inflammatoire des cellules endothéliales qui pourrait retarder l'apparition des événements hémorragiques et ainsi, favoriser la réplication du virus EBOV dans l'organisme (16). Une autre forme soluble de la glycoprotéine du virus EBOV a été identifiée GP1,2Δ, cette protéine activerait des cellules immunitaires (cellules dendritiques et macrophages) probablement via une fixation au récepteur TLR4 (17) et aurait une action directe et indirecte sur les cellules endothéliales *in vitro* (17).

Variabilité génétique

L'étude de la variabilité génétique est déterminante pour caractériser un virus, en particulier les virus à ARN décrits pour avoir une variabilité plus importante que celle des virus à ADN. L'étude de celle-ci sur l'intégralité du génome est la plus précise. Une première approche consiste à séquencer le génome correspondant à une protéine ou une partie de protéine. Il est important de connaître la fonction de la protéine et la pression de sélection à laquelle elle est soumise : une protéine de surface (comme la protéine GP) très exposée à cette pression présente un taux de mutations supérieur qu'il est important de connaître à des fins de développement de contre-mesures médicales (vaccins, immunothérapie passive, molécules antivirales) et d'évaluation du risque d'échappement ou d'échec. En revanche une protéine moins exposée à cette pression, présente une séquence souvent plus conservée donc d'intérêt pour le diagnostic moléculaire. Il semblerait logique de penser que la polymérase L est le gène de choix pour le virus EBOV comme cela est le cas pour de nombreux autres virus. Cependant une étude de 2005 suggère que les gènes des protéines VP24 et VP40 seraient plus conservés que celui de la polymérase (18). Concernant le virus EBOV, il a été démontré qu'il n'existe pas de différence significative des taux de mutations des gènes des protéines GP et L (8×10^{-4} et $6{,}2\times10^{-4}$ mutation/site/an) (19, (20). Au cours de l'épidémie, les études retrouvent des taux de mutations de $1{,}23\times10^{-3}$ (génome complet) et $1{,}075\times10^{-3}$ (séquence GP) (21). Une autre étude retrouve un taux de $9{,}6\times10^{-4}$ (génome complet) (22). Ces résultats sont comparables à ceux observés au cours des épidémies précédentes.

Enfin l'analyse phylogénétique permet d'appréhender les circuits de transmission au sein d'une population. Ainsi il a été établi qu'au cours de l'épidémie récente trois lignées ont co-circulé en Guinée : une première lignée dont le génome est identique à la souche du cas index, une seconde lignée réintroduite depuis la Sierra Leone après plusieurs mois d'épidémie et une troisième lignée exportée au Mali (23). Cet outil constitue une aide précieuse au travail de description des circuits de transmission au sein de populations.

Réservoir(s)

Historiquement, les premières épidémies de Maladie à virus Ebola (MVE) ont été décrites en Afrique équatoriale : en RDC, au Congo, et au Gabon (24). L'épidémie de 2013-2015 en Afrique de l'Ouest – Guinée, Sierra Leone, et Liberia (25) – a officiellement été déclarée le 23 mars 2014 en Guinée Forestière dans les villes de Guéckédou et Macenta par les autorités guinéennes en raison de plusieurs cas groupés d'une infection dont l'issue était fatale chez les patients ayant un tableau clinique de forte fièvre et de vomissements associés à une diarrhée sévère (25). Il est intéressant de noter qu'en Guinée les cas se distribuaient sur le tracé de la route nationale 1 (Guéckédou-Kissidougou-Dabola-Conakry), suggérant fortement une transmission interhumaine par les fluides biologiques de patients

infectés (26). Ce mode de transmission explique le nombre de cas important dans les villes peuplées comme Freetown.

Les épidémies de MVE se déclarent généralement dans des zones à proximité des forêts tropicales, alors que celles liées au virus Marburg se manifestent plutôt en savane et dans les zones de forêts arides. Les raisons de la circulation des virus EBOV dans une géographie bien circonscrite restent actuellement inconnues. Une hypothèse serait que l'animal vecteur/réservoir vive dans un habitat spécifique et se retrouverait sporadiquement et accidentellement en contact direct ou indirect (espèce mammifère tierce) avec l'homme. La question du réservoir reste donc un élément essentiel de compréhension de l'épidémiologie de la maladie afin de mieux la combattre. Les chauves-souris ou même les cochons constituent les hypothèses actuelles les plus vraisemblables (27, 28). L'une des pistes majeures est la chauve-souris frugivore. Cependant, la présence de cet animal recoupe toute l'Afrique et l'Asie, ce qui laisse entrevoir un potentiel épidémique pour le virus EBOV. Toutefois, l'association entre le virus et son réservoir restreindrait le couple à certaines espèces particulières de chauves-souris frugivores (26). Il est donc vraisemblable que les zones endémiques puissent évoluer au gré du déplacement des vecteurs/réservoirs. Le rôle joué par l'activité humaine comme l'urbanisation non maîtrisée, le déplacement de populations, le manque d'hygiène, les pratiques culturelles doit aussi être pris en considération.

Le pouvoir pathogène et les interactions avec le système immunitaire

Létalité

La létalité des infections à filovirus varie considérablement chez l'homme (tab. I). Actuellement, la plupart des infections ont été causées par le virus EBOV, dont la létalité moyenne était de l'ordre de 79 % à l'occasion des premières épidémies. Cependant, au cours de l'épidémie de MVE 2013-2015 la mortalité moyenne a été d'environ 40 %, avec une variabilité importante entre les pays (tab. II). Les questions se posent de savoir pourquoi cette épidémie a été moins létale que les autres et pourquoi elle a été d'une telle ampleur comparativement aux autres épidémies de MVE. Il n'est pas simple de répondre à ces questions.

Tableau I. Localisation et létalité des filovirus.

Virus	Genres	Localisation	% Létalité (nombre de cas)
EBOV	*Ebolavirus*	RDC, Congo, Gabon, Guinée, Sierra Leone (25), Liberia (27)	42 % [29637]
SUDV	*Ebolavirus*	Soudan, Ouganda (24)	54 % [792]
BDBV	*Ebolavirus*	RDC (64), Ouganda (65)	32 % [206]
TAFV	*Ebolavirus*	Côte d'Ivoire (66) (67)	0 % [1]
RESTV	*Ebolavirus*	Philippines (68), Chine (56)	0 % [11]
MARV	*Marburgvirus*	Ouganda, Rhodésie, Kenya, RDC, Angola (69)	80 % [465]
RAVV	*Marburgvirus*	Kenya, RDC, Ouganda (70)	inconnu
LLOV	*Cuevavirus*	Espagne (2)	N/A

Tableau II. L'épidémie de fièvre hémorragique à virus Ebola en chiffres, à partir des données OMS, 1er octobre 2015.

	Nbre de Cas	Nbre de Décès	%
Guinée	3805	2533	66,57
Sierra Léone	13911	3955	28,43
Liberia	10666	4806	45,06
Nigeria	20	8	40
Mali	8	6	75
Sénégal	1	0	0
Espagne	1	0	0
Grande Bretagne	1	0	0
États-Unis	4	1	25
Total	28417	11309	39,8

Il est possible que l'accès facilité aux soins, même retardé après le déclenchement de l'épidémie, ait limité la létalité de la maladie. Il se peut aussi que le très grand nombre de cas de cette épidémie soit plus représentatif de la létalité réelle. Par ailleurs, la variabilité génétique des filovirus joue aussi un rôle dans la létalité des différentes épidémies de MVE bien qu'une certaine similarité génétique entre les souches ayant circulé en Afrique de l'Ouest lors de cette épidémie et celles des épidémies précédentes ait été observée (23-31).

Pathogénicité et échappement au système immunitaire

Il a été démontré que le virus EBOV infectait initialement préférentiellement les cellules dendritiques et les macrophages (32). Les propriétés migratoires de ces cellules permettent au virus d'atteindre les ganglions lymphatiques, la rate et le foie. *In vivo*, le virus augmente la production de cytokines et chimiokines pro inflammatoires (Il-1ß, IL-6, IL-8, IL-10, MCP1, MIP1α, MIP1ß et TNFα) probablement par les macrophages infectés (33). La production accrue de TNFα, IL-6 et IL-8 pourrait être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'infection des cellules dendritiques inhibe leur maturation et diminuerait ainsi la présentation antigénique aux lymphocytes T.

La réponse IFN de type I constitue un élément majeur de la réponse antivirale. Le virus EBOV contourne ce système de défense, en inhibant la production d'IFN de type I et la réponse cellulaire à l'apport exogène d'IFN de type 1 (34, 35). La protéine VP35 a été décrite comme facteur antagoniste de la réponse interféron de type I. Elle inhibe la production d'IFN α/β en bloquant

la phosphorylation du facteur de régulation IRF-3 dans les cellules infectées (36, 37).

La protéine VP24 diminue l'action de la voie IFN de type I, en interagissant au sein de la cascade de réactions intracellulaires (liaison avec les protéines KPNA1, KPNA5 et KPNA6 inhibant ainsi leur interaction avec la protéine STAT1 (38)) pour inhiber l'expression des gènes à l'origine de la production de la kinase antivirale protéine kinase R (PKR) et des molécules du CMHI. La protéine VP24 est également un facteur majeur de l'adaptation interespèce du virus Ebola. En effet, chez le cobaye une mutation seule (L26F) suffit à rendre le virus, initialement non pathogène dans ces espèces, létales dans 100 % des cas (39). Chez la souris, c'est la mutation T50I associé à des mutations dans la NP qui permettent l'adaptation à cette espèce (40). L'utilisation de cette souche chez le hamster doré conduit aussi à une mortalité totale des animaux infectés (41).

Modèles animaux (tab. III)

Les modèles murins constituent des outils de première intention pour le développement et la caractérisation des nouvelles approches thérapeutiques et prophylactiques, avant de les valider en modèle primate non-humain (42). Alors que les virus sauvages EBOV, SUDV, MARV, RAVV et RESTV se répliquent en modèle murin, ils ne sont pas létaux sur des souris adultes (43-45). Les virus EBOV, MARV, et RAVV infectent les cobayes et sont à l'origine de fièvres transitoires. Lorsque ces virus sont adaptés après plusieurs passages ils peuvent être létaux sur ces modèles (46, 47). Il n'y a pas de données concernant les virus TAFV et BDBV. L'adaptation du virus EBOV après plusieurs passages en souris (48) à la fois létale pour les souris et un nouveau modèle de cobayes (41) et l'utilisation de différents fonds génétiques sont autant d'outils d'étude de la MVE (49). Alors qu'il n'y a pas de souches des virus SUDV, BDBV, TAFV, RESTV adaptées en modèle murin, très récemment des souches des virus MARV et RAVV ont été adaptées et sont létales pour les souris (50). Par ailleurs, les souris déficientes pour la réponse IFN de type I sont des modèles d'études intéressants pour les souches sauvages des virus EBOV, SUDV, RESTV, MARV, et RAVV (35, 43, 51).

L'infection expérimentale de porcelets par le virus EBOV a induit une pathologie sévère au niveau des poumons ainsi qu'une transmission virale (52-54). Il resterait à tester les autres souches sauvages des filovirus SUDV, BDBV, TAFV, MARV, et RAVV afin de savoir si les cochons sont bien des réservoirs potentiels (55). En revanche, les infections naturelles à virus RESTV n'ont été découvertes chez des cochons que lorsqu'ils étaient co-infectés par un virus respiratoire porcin (56, 57). L'infection de porcelets au laboratoire n'a permis d'observer qu'une réplication virale transitoire sans symptômes (52).

Applications pratiques de la recherche en virologie : du diagnostic au traitement

Diagnostic

Plusieurs méthodes permettent d'établir un diagnostic d'infection par le virus EBOV. Parmi les méthodes de détection directe, la culture cellulaire sur cellules de rein de singe Vero ou VeroE6 est la méthode de référence. La durée de positivité associée à la nécessité de tests de confirmation limite l'usage de cette méthode en routine. La détection de particules virales par microscopie électronique nécessite un équipement qui restreint l'utilisation de cette technique. De même la détection d'antigènes viraux par immunohistochimie est réservée à des laboratoires de recherche. Les méthodes utilisables par les laboratoires de diagnostic sont la détection du génome viral par RT-PCR et la mise en évidence d'antigènes viraux par ELISA. La détection du génome viral par RT-PCR est rapidement apparue comme la méthode de choix sur le terrain. Plusieurs kits diagnostiques de RT-PCR en temps réel ont été

Tableau III. Modèles animaux pour les filovirus, d'après (71).

Modèle	PNH	Cobaye	Hamster	Souris	Souris
Virus	Virus sauvage	adapté	adapté	adapté	Virus sauvage
EBOV	Rhésus macaque, cynomolgous macaque, grivets, babouin	Oui	Oui	Oui	IFNAR, STAT1
SUDV	Rhésus macaque, cynomolgous macaque	Non	Non	Non	IFNAR, STAT1
BDBV	cynomolgous macaque	Non	Non	Non	Non
TAFV	cynomolgous macaque	Non	Non	Non	Non
RESTV	Rhésus macaque, cynomolgous macaque, grivets	Non	Non	Non	STAT1
MARV	Rhésus macaque, cynomolgous macaque, grivets, marmosets	Oui	Non	Oui	IFNAR, STAT1
RAVV	Rhésus macaque, cynomolgous macaque	Oui	Non	Oui	Oui IFNAR, STAT1
LLOV	No	Non	Non	Non	Non

développés permettant un diagnostic précoce (dès J3), sensible et spécifique dans les fluides biologiques dont le sang et les écouvillons. La détection d'antigènes viraux par ELISA permet aussi un diagnostic précoce et fiable. Une alternative de détection d'antigènes par des tests de diagnostic rapide par immunochromatographie a été développée par plusieurs laboratoires mais le manque de sensibilité de ces tests associé au délai de développement et production n'ont pas permis une utilisation massive au cours de l'épidémie. Le diagnostic indirect repose sur la mise en évidence d'anticorps IgM et IgG par immunofluorescence indirecte ou ELISA mais cette méthode présente l'inconvénient d'un diagnostic tardif. Elle est donc préférentiellement utilisée pour évaluer la réponse immunitaire en cours d'infection ou lors de la convalescence.

En pratique, l'unité de virologie de l'IRBA a participé à la conception du laboratoire mobile du SSA, en particulier le choix des outils moléculaires virologiques. Un de ses techniciens a été projeté sur le laboratoire du Centre de traitement des soignants (CTS). Des méthodes de diagnostic moléculaire d'étiologies différentielles (fièvres hémorragiques de Lassa et de Crimée Congo) ont également été développées. Par ailleurs, une étude clinique sur le diagnostic biologique a permis à l'unité de démontrer son expertise en participant au pilotage et la mise en œuvre de ce travail conjointement avec la société bioMérieux et la Fondation Mérieux.

Enfin, deux de ses personnels se sont déplacés au laboratoire P4 de DGAMNRBC afin d'isoler en culture une souche à partir de prélèvements sanguins d'un patient soigné à l'HIA Bégin. Le transfert de compétence concernant les techniques de culture cellulaire et la collaboration entre les laboratoires de virologie ont été une réussite.

L'expertise au service de la prévention

Fin août 2014, un spécialiste de l'unité de virologie de l'IRBA a été envoyé en Guinée comme précurseur afin de participer à la gestion de la crise au service du ministère guinéen de la santé. Cette mission décidée par la DCSSA était intégrée au programme d'aide à l'Afrique de l'Ouest Resaolab de la Fondation Mérieux. Une mission d'évaluation s'est alors mise en place portant sur 22 laboratoires appartenant à des structures de santé de niveau préfectoral (fig. 3). Aucun laboratoire ne disposait d'Équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux normes OMS : gants, masques type FPP2, blouses, tabliers, lunettes de protection, charlottes, sur-chaussures. L'absence de pipettes sécurisées conduisait à l'utilisation de pro-pipettes types « poires » et même au pipetage à la bouche. Ces observations contribuent à expliquer la contamination de personnels de laboratoire. La logistique des transports était assurée essentiellement par les motos taxis sur lequel le technicien de laboratoire accompagnait le prélèvement dans des emballages de fortune. Un dénuement complet dans la gestion des déchets tant liquides que solides a été constaté : incinération plus ou moins efficace, dans le meilleur des cas un enfouissement, mais il n'était pas rare d'observer les déchets à ciel ouvert.



Figure 3. Audit des laboratoires dans le cadre de RESAOLAB de la Fondation Mérieux (crédits C. Peyrefitte).

Une mission de formation portant sur les virus de fièvres hémorragiques et le virus Ebola en particulier, la mise en œuvre pratique des EPI, l'utilisation de triples emballages pour le transport des échantillons ainsi que le rappel de la reconstitution de solution chlorée à partir des produits disponibles dans le commerce en Guinée (fig. 4, 5). Il a également été mis en place une





Figure 4 et 5. Formations à travers le pays en Guinée dans le cadre de RESAOLAB de la Fondation Mérieux (crédits C. Peyrefitte).

logistique et des distributions d'EPI complets, de boîte à triple emballage et d'eau de Javel. Deux interventions à la radio nationale et télévision nationale guinéenne ont participé à renforcer le contrôle de l'épidémie en soutenant le ministère de la santé guinéenne (fig. 6). Par



Figure 6. Formation du SSA guinéen et intervention sur les chaînes de télévisions guinéennes (crédits C. Peyrefitte).

ailleurs, les personnels du Service de santé des armées guinéen ont pu bénéficier de ces mêmes formations et distributions de matériel de protection, car il était indispensable d'intégrer ce partenaire essentiel à la réponse guinéenne contre cette épidémie.

Parallèlement à cette mission, l'unité de virologie de l'IRBA a participé au choix de la localisation du Centre de traitement Ebola (CTE) de Macenta et en particulier a pesé pour la création d'un laboratoire de diagnostic adjoint au CTE français. La supervision du CTE de la Croix-Rouge à Guéckédou dans ses phases de conception initiale a été confiée en partie à l'un des personnels de l'unité de virologie (fig. 7, 8).

Stratégies antivirales

Les stratégies antivirales étaient très limitées au début de l'épidémie. Historiquement, l'utilisation de plasma de convalescents avait été pratiquée. Concernant l'épidémie récente la première thérapeutique disponible était le ZMapp, mélange de trois anticorps monoclonaux développé conjointement par l'Agence de santé publique du Canada avec les sociétés Defyrus, Kentucky BioProcessing, Mapp Biopharmaceutical et l'Institut de recherche médicale sur les maladies infectieuses de l'armée américaine (USAMRIID). Un autre mélange d'anticorps MIL-77 a également été utilisé (58). Outre l'immunothérapie passive, l'immunothérapie par vaccination a été développée au cours de cette épidémie, en particulier les vaccins basés sur l'utilisation de vecteurs viraux comme les Rhabdovirus (59), le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) (60-62), les Paramyxovirus (63). Des molécules antivirales ont également été testées parmi lesquelles le favipiravir qui inhibe l'ARN polymérase ARN dépendante qui a été testé au Centre de traitement des soignants à Conakry.





Figure 7 et 8. Mission des précurseurs en Guinée forestière avec l'Ambassade de France, EPRUS, Croix-Rouge Française et Sécurité Civile et sectorisation du CTE de Gueckedou (crédits C. Peyrefitte).

Dans ce domaine, l'unité de virologie de l'IRBA a testé une molécule inhibitrice de la réplication du virus Ebola dont l'application est en cours de brevet avec la société biotechnologique Provepharm.

Conclusion

La survenue brutale d'une épidémie de grande ampleur due au virus Ebola a mis en évidence les défis à relever dans ce type d'événement : diagnostic, prévention, contre-mesures médicales. Ces défis demeurent les mêmes pour toute émergence ou maladie rare et peu étudiée par les grands programmes de recherche et l'industrie pharmaceutique. Or cette épidémie a atteint un pays (le Mali) dans lequel des troupes étaient projetées, de manière heureusement très limitée. Elle avait pour étiologie un virus de classe 4 potentiellement militarisable qui entrait logiquement dans le champ d'investigation des instituts chargés de la résilience de l'État. Ces événements confortent la nécessité d'une solide connaissance amont et d'une recherche finalisée sur ces virus qui passe par le développement de méthodes diagnostiques et de contre-mesures médicales par une équipe du SSA en collaboration avec des partenaires civils et militaires, nationaux et internationaux.

Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt concernant les données présentées dans cet article.

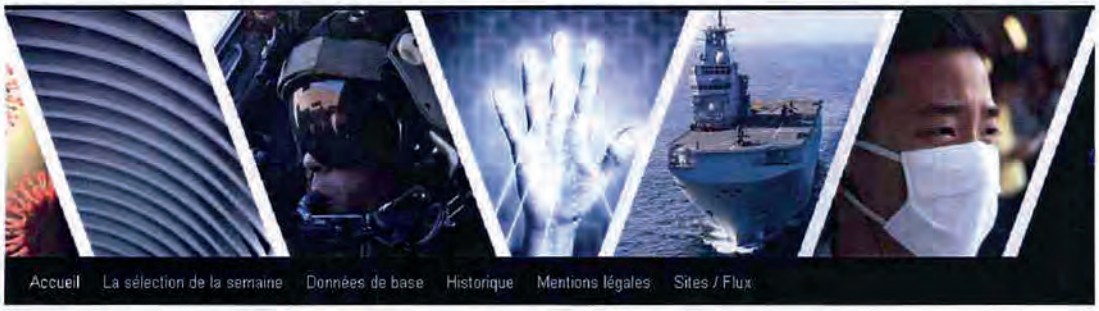
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae : classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. Arch Virol 2010 ; 155 : 2083-103.
2. Negredo A, Palacios G, Vazquez-Moron S, Gonzalez F, Dopazo H, Molero F, et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. PLoS pathogens 2011 ; 7 : e1002304.
3 Feldmann H, Klenk HD, Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. Archives of virology Supplementum 1993 ; 7 : 81-100.
4. Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. 1996 ; 93 : 3602-7.
5. Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. Nature 2011 ; 477 : 340-3.
6. Muhlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. Journal of virology 1999 ; 73 : 2333-42.
7. Volchkov VE, Volchkova VA, Muhlberger E, Kolesnikova LV, Weik M, Dolnik O, et al. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA : RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. 2001 ; 291 : 1965-9.
8. Feldmann H, Muhlberger E, Randolf A, Will C, Kiley MP, Sanchez A, et al. Marburg virus, a filovirus : messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. Virus research 1992 ; 24 : 1-19.
9. Takada A, Robison C, Goto H, Sanchez A, Murti KG, Whitt MA, et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997 ; 94 : 14764-9.
10. Lennemann NJ, Rhein BA, Ndungo E, Chandran K, Qiu X, Maury W. Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1. mBio 2014 ; 5 : e00862-13.
11. Ng M, Ndungo E, Jangra RK, Cai Y, Postnikova E, Radoshitzky SR, et al. Cell entry by a novel European filovirus requires host endosomal cysteine proteases and Niemann-Pick C1. Virology 2014 ; 468-470 : 637-46.
12. Cote M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. Nature 2011 ; 477 : 344-8.
13. Chan SY, Ma MC, Goldsmith MA. Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. The Journal of general virology 2000 ; 81 : 2155-9.
14. Wahl-Jensen VM, Afanasieva TA, Seebach J, Stroher U, Feldmann H, Schnittler HJ. Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. Journal of virology 2005 ; 79 : 10442-50.
15. Reynard O, Borowiak M, Volchkova VA, Delpeut S, Mateo M, Volchkov VE. Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. Journal of virology 2009 ; 83 : 9596-601.
16. Volchkova VA, Dolnik O, Martinez MJ, Reynard O, Volchkov VE. RNA Editing of the GP Gene of Ebola Virus is an Important Pathogenicity Factor. The Journal of infectious diseases 2015 ; 212 Suppl 2 : S226-33.
17. Escudero-Perez B, Volchkova VA, Dolnik O, Lawrence P, Volchkov VE. Shed GP of Ebola virus triggers immune activation and increased vascular permeability. PLoS pathogens 2014 ; 10 : e1004509.
18. Sanchez A, Rollin PE. Complete genome sequence of an Ebola virus (Sudan species) responsible for a 2000 outbreak of human disease in Uganda. Virus research 2005 ; 113 : 16-25.
19. Walsh PD, Biek R, Real LA. Wave-like spread of Ebola Zaire. PLoS biology 2005 ; 3 : e371.
20. Biek R, Walsh PD, Leroy EM, Real LA. Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. PLoS pathogens 2006 ; 2 : e90.
21. Tong YG, Shi WF, Liu D, Qian J, Liang L, Bo XC, et al. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone. Nature 2015 ; 524 : 93-6.
22. Hoenen T, Groseth A, Feldmann F, Marzi A, Ebihara H, Kobinger G, et al. Complete genome sequences of three ebola virus isolates from the 2014 outbreak in west Africa. Genome announcements 2014 ; 2.
23. Simon-Loriere E, Faye O, Koivogui L, Magassouba N, Keita S, Thiberge JM, et al. Distinct lineages of Ebola virus in Guinea during the 2014 West African epidemic. Nature 2015 ; 524 : 102-4.
24. Kuhn JH. Filoviruses. A compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies. Archives of virology Supplementum 2008 ; 20:13-360.
25. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. The New England journal of medicine 2014 ; 371 : 1418-25.
26. Reynard O, Volchkov V, Peyrefitte C. [A first outbreak of Ebola virus in West Africa]. Medecine sciences : M/S 2014 ; 30 : 671-3.
27. Dixon MG, Schafer IJ. Ebola viral disease outbreak--West Africa, 2014. MMWR Morbidity and mortality weekly report 2014 ; 63 : 548-51.
28. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. Nature 2005 ; 438 : 575-6.
29. Kuhn JH, Andersen KG, Baize S, Bao Y, Bavari S, Berthet N, et al. Nomenclature- and database-compatible names for the two Ebola virus variants that emerged in Guinea and the Democratic Republic of the Congo in 2014. Viruses 2014 ; 6 : 4760-99.
30. Mire CE, Matassov D, Geisbert JB, Latham TE, Agans KN, Xu R, et al. Single-dose attenuated Vesiculovax vaccines protect primates

against Ebola Makona virus. Nature 2015 ; 520 : 688-91.
31. Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. Nature 2014 ; 514 : 47-53.
32. Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, et al. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques : evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. The American journal of pathology 2003 ; 163 : 2347-70.
33. Gupta M, Mahanty S, Ahmed R, Rollin PE. Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro. Virology 2001 ; 284 : 20-5.
34. Harcourt BH, Sanchez A, Offermann MK. Ebola virus inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells. Virology 1998 ; 252 : 179-88.
35. Harcourt BH, Sanchez A, Offermann MK. Ebola virus selectively inhibits responses to interferons, but not to interleukin-1beta, in endothelial cells. Journal of virology 1999 ; 73 : 3491-6.
36. Basler CF, Wang X, Muhlberger E, Volchkov V, Paragas J, Klenk HD, et al. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000 ; 97 : 12289-94.
37. Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, Paragas J, Muhlberger E, Bray M, et al. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. Journal of virology 2003 ; 77 : 7945-56.
38. Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. Journal of virology 2006 ; 80 : 5156-67.
39. Mateo M, Carbonnelle C, Reynard O, Kolesnikova L, Nemirov K, Page A, et al. VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs. The Journal of infectious diseases 2011 ; 204 Suppl 3 : S1011-20.
40. Ebihara H, Takada A, Kobasa D, Jones S, Neumann G, Theriault S, et al. Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. PLoS pathogens 2006 ; 2 : e73.
41. Ebihara H, Zivcec M, Gardner D, Falzarano D, LaCasse R, Rosenke R, et al. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic fever. The Journal of infectious diseases 2013 ; 207 : 306-18.
42. Bradfute SB, Warfield KL, Bray M. Mouse models for filovirus infections. Viruses 2012 ; 4 : 1477-508.
43. Bray M. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. The Journal of general virology 2001 ; 82 : 1365-73.
44. O'Brien LM, Stokes MG, Lonsdale SG, Maslowski DR, Smither SJ, Lever MS, et al. Vaccination with recombinant adenoviruses expressing Ebola virus glycoprotein elicits protection in the interferon alpha/beta receptor knock-out mouse. Virology 2014 ; 452-453 : 324-33.
45. Lever MS, Piercy TJ, Steward JA, Eastaugh L, Smither SJ, Taylor C, et al. Lethality and pathogenesis of airborne infection with filoviruses in A129 alpha/beta -/- interferon receptor-deficient mice. Journal of medical microbiology 2012 ; 61 : 8-15.
46. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, Geisbert TW, Kell WM, Jaax NK, et al. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. The Journal of infectious diseases 1999 ; 179 Suppl 1 : S203-17.
47. Hevey M, Negley D, Geisbert J, Jahrling P, Schmaljohn A. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. Virology 1997 ; 239 : 206-16.
48. Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. The Journal of infectious diseases 1998 ; 178 : 651-61.
49. Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT, Green R, Feldmann F, Kelly SM, et al. Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance. 2014 ; 346 : 987-91.
50. Lofts LL, Wells JB, Bavari S, Warfield KL. Key genomic changes necessary for an in vivo lethal mouse marburgvirus variant selection process. Journal of virology 2011 ; 85 : 3905-17.
51. Bausch DG, Nichol ST, Muyembe-Tamfum JJ, Borchert M, Rollin PE, Sleurs H, et al. Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. The New England journal of medicine 2006 ; 355 : 909-19.
52. Marsh GA, Haining J, Robinson R, Foord A, Yamada M, Barr JA, et al. Ebola Reston virus infection of pigs : clinical significance and transmission potential. The Journal of infectious diseases 2011 ; 204 Suppl 3 : S804-9.
53. Kobinger GP, Leung A, Neufeld J, Richardson JS, Falzarano D, Smith G, et al. Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs. The Journal of infectious diseases 2011 ; 204 : 200-8.
54. Nfon CK, Leung A, Smith G, Embury-Hyatt C, Kobinger G, Weingartl HM. Immunopathogenesis of severe acute respiratory disease in Zaire ebolavirus-infected pigs. PloS one 2013 ; 8 : e61904.
55. Atherstone C, Smith E, Ochungo P, Roesel K, Grace D. Assessing the Potential Role of Pigs in the Epidemiology of Ebola Virus in Uganda. Transboundary and emerging diseases 2015.
56. Pan Y, Zhang W, Cui L, Hua X, Wang M, Zeng Q. Reston virus in domestic pigs in China. Arch Virol 2014 ; 159 : 1129-32.
57. Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu L, Zaki SR, Nichol ST, et al. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. 2009 ; 325 : 204-6.
58. Wong G, Kobinger GP. Backs against the wall : novel and existing strategies used during the 2014-2015 Ebola virus outbreak. Clinical microbiology reviews 2015 ; 28 : 593-601.
59. Blaney JE, Marzi A, Willet M, Papaneri AB, Wirblich C, Feldmann F, et al. Antibody quality and protection from lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates immunized with rabies virus based bivalent vaccine. PLoS pathogens 2013 ; 9 : e1003389.
60. Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. Nature medicine 2005 ; 11 : 786-90.
61. Feldmann H, Jones SM, Daddario-DiCaprio KM, Geisbert JB, Stroher U, Grolla A, et al. Effective post-exposure treatment of Ebola infection. PLoS pathogens 2007 ; 3 : e2.
62. Geisbert TW, Daddario-Dicaprio KM, Geisbert JB, Reed DS, Feldmann F, Grolla A, et al. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. Vaccine 2008 ; 26 : 6894-900.
63. Bukreyev A, Marzi A, Feldmann F, Zhang L, Yang L, Ward JM, et al. Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. Virology 2009 ; 383 : 348-61.
64. Organisation WH. Outbreak news. Ebola. Democratic Republic of the Congo. 2012 ; 87 : 421.
65. Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albarino CG, Conlan S, Reeder SA, et al. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. PLoS pathogens 2008 ; 4 : e1000212.
66. Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, Gounon P, Walker F, Boesch C. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. 1995 ; 345 : 1271-4.
67. Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A. Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire : clinical and biologic presentation. The Journal of infectious diseases 1999 ; 179 Suppl 1 : S48-53.
68. Geisbert TW, Jahrling PB. Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. Journal of clinical pathology 1990 ; 43 : 813-6.
69. Cross RW, Fenton KA, Geisbert JB, Ebihara H, Mire CE, Geisbert TW. Comparison of the Pathogenesis of the Angola and Ravn Strains of Marburg Virus in the Outbred Guinea Pig Model. The Journal of infectious diseases 2015 ; 212 Suppl 2 : S258-70.
70. Peterson AT, Holder MT. Phylogenetic assessment of filoviruses : how many lineages of Marburg virus ? Ecology and evolution 2012 ; 2 : 1826-33.
71. Anthony SM, Bradfute SB. Filoviruses : One of These Things is (not) Like the Other. Viruses 2015 ; 7 : 5172-90.

Veille – Santé, Défense et sécurité nationale

Veiller et éveiller



Actualité, analyse, débats ! Rejoignez le blog Santé, Défense et sécurité nationale !

Vous souhaitez suivre et analyser les principales évolutions du monde de la santé, de la défense et de la sécurité nationale de nature à avoir des impacts sur la politique générale du SSA ? Ce BLOG répond à vos attentes !

Ce BLOG n'ayant pas de réel caractère institutionnel, vous pouvez aussi vous sentir libre de contribuer à alimenter cet espace de réflexion environnementale qui verra ainsi naitre des idées nouvelles ! Vous êtes désormais en mesure d'ouvrir le débat sur les éléments de veille prospective et stratégique qui vous intéressent et de correspondre avec tous les acteurs du Service et au-delà !

Le bureau « études et prospective », particulièrement impliqué dans les réflexions sur l'avenir du Service et soutenu par un réseau de veille interne et externe au SSA, édite une note de veille prospective dont les éléments paraissent sur ce blog et sont diffusés de manière hebdomadaire à tous les établissements du Service.
L'examen de ces évolutions fait l'objet d'une note d'analyse stratégique publiée bimensuellement à tous les établissements du SSA et peut faire l'objet d'orientations stratégiques.
A partir de ces éléments de veille des études prospectives et de portée stratégique sont menées afin de préparer les choix stratégiques du Service.

Le BLOG Santé, Défense et sécurité nationale : un outil à votre disposition pour vous informer, débattre et orienter les choix stratégiques du SSA !

N'hésitez pas à vous y rendre et faire vos propositions d'évolutions.
https://veilleprosp.wordpress.com

Service de santé
des armées