



HAL
open science

Le virus Ebola, de sa découverte au développement d'une vaccination efficace

Alexandra Houot

► **To cite this version:**

Alexandra Houot. Le virus Ebola, de sa découverte au développement d'une vaccination efficace. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01344215

HAL Id: dumas-01344215

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01344215>

Submitted on 11 Jul 2016

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

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

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2016

N°

**Le virus Ebola, de sa découverte au développement d'une
vaccination efficace**

THÈSE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Alexandra HOUOT

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 27/06/2016

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Docteur Emmanuel DROUET

Membres :

Docteur Christian DROUET (Directeur de thèse)

Docteur Walid RACHIDI

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen : SEVE Michel
Vice-doyenne : DEMEILLIERS Christine

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
MOINARD	Christophe	LABFA (U Inserm 1055)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES

CALOP	Jean
GRILLOT	Renée
ROUSSEL	Anne-Marie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I)

PROFESSEURS CERTIFIES

FITE	Andrée
GOUBIER	Laurence

PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES (PAST/MAST)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEURS AGREGES (PRAG)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Je remercie monsieur le Docteur Christian DROUET, pour avoir accepté de diriger ma thèse, pour m'avoir toujours épaulée, conseillée tout au long de ce travail, sur les différents choix de bibliographie, l'orientation de ce travail et sa mise en forme. Merci pour votre écoute et votre disponibilité.

Je remercie monsieur le Docteur Emmanuel DROUET, pour son encouragement. Merci pour vos conseils, merci de m'avoir fait confiance pour le travail de cette thèse. Je voudrais vous remercier également pour m'avoir transmis votre intérêt pour la virologie, raison du choix de ce sujet de thèse. Merci pour nos discussions très enrichissantes.

Je remercie monsieur le Docteur Walid RACHIDI de m'honorer de sa présence parmi les membres du jury. Merci pour votre disponibilité.

Merci à tous les pharmaciens d'officine que j'ai pu rencontrer au cours de mes stages ou avec qui j'ai pu travailler, pour avoir contribué à ma formation professionnelle. Merci pour votre disponibilité, votre écoute et pour les conseils apportés.

Merci à mes parents, et ma famille qui m'ont toujours soutenue dans les choix que j'ai pu faire, et qui par leur présence m'ont apportée une aide précieuse.

Je tiens également à remercier mes amis de la faculté, sans qui je ne serais pas devenue ce que je suis. Tous ces moments vont me manquer. J'espère sincèrement vous revoir régulièrement.

Merci à Renaud, d'avoir toujours été là pour moi, et pour m'avoir encouragée tout au long de ces études.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION.....	12
PARTIE 1 : HISTORIQUE.....	14
1. La découverte des <i>Filovirus</i> avec le virus Marburg	14
2. L’Afrique comme lieu d’émergence d’un second <i>Filovirus</i> : le virus Ebola	14
3. Apparition d’une nouvelle souche du virus Ebola d’origine asiatique.....	16
4. La réémergence d’Ebola en Afrique 15 ans plus tard	17
5. La Guinée : point de départ de la plus importante épidémie à virus Ebola.....	20
6. Situation au Libéria	21
7. Situation en Sierra Leone	21
8. Les facteurs ayant contribué à l’expansion du virus en Afrique de l’Ouest.....	23
PARTIE 2 : LE VIRUS EBOLA.....	25
1. Classification.....	25
2. Structure du virus Ebola	27
3. Structure de la glycoprotéine virale trimérique	28
4. Polymorphisme de la glycoprotéine	29
4.1. La glycoprotéine sécrétée sGP	31
4.2. La glycoprotéine transmembranaire virale GP1,2.....	31
4.3. La petite glycoprotéine sécrétée ssGP.....	31
5. Les différentes fonctions de la GP1,2 virale.....	32
5.1. Entrée cellulaire.....	32
5.2. Cytotoxicité de la GP1,2 transmembranaire.....	32
5.3. Immunogénicité.....	33
5.4. Inhibition du système immunitaire	33

6.	Implication de la sGP dans la pathogénèse du virus Ebola.....	33
6.1.	Modulation de la réponse immunitaire spécifique	33
6.2.	Contrôle de la cytotoxicité induite par GP1,2	34
6.3.	Autres rôles présumés non établis	34
7.	Pathogénicité des différentes espèces du virus Ebola	35
7.1.	Taux de mortalité.....	35
7.2.	Contagiosité du virus Ebola.....	36
PARTIE 3 : CYCLE DE REPLICATION VIRALE		37
1.	Entrée dans la cellule hôte	38
1.1.	Adhésion cellulaire.....	38
1.2.	Endocytose	39
1.3.	Trafic intracellulaire	40
1.4.	Activation de la glycoprotéine virale.....	40
1.5.	Fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire	41
2.	Transcription et réplication.....	42
3.	Assemblage et libération du virion infectieux	42
PARTIE 4 : EPIDEMIOLOGIE ET CYCLE DE TRANSMISSION VIRALE.....		44
1.	Aire de répartition géographique de la maladie à virus Ebola.....	44
2.	Espèce réservoir du virus Ebola	45
3.	Hôtes intermédiaires.....	45
4.	Transmission virale de l'espèce réservoir aux animaux de brousse	46
5.	Transmission de l'animal à l'Homme	46
6.	Eco-épidémiologie.....	47
7.	Transmission interhumaine	47
PARTIE 5 : EVOLUTION VIRALE.....		50
1.	Origine des Filovirus	50
2.	Taux de mutations	50
3.	Diversité génétique.....	51
4.	Pression de sélection	52

5.	Origine et évolution du virus Ebola au cours de l'épidémie de 2014-2015	52
PARTIE 6 : LA MALADIE A VIRUS EBOLA		53
1.	Aspects cliniques de la maladie à virus Ebola.....	53
2.	Physiopathologie	55
2.1.	Entrée virale	56
2.2.	Réponse inflammatoire dérégulée	56
2.3.	Immunosuppression.....	56
2.4.	Diffusion virale.....	57
2.5.	Cibles cellulaires	57
2.6.	Dysfonctionnement gastro-intestinal.....	58
2.7.	Anomalies de la coagulation	58
2.8.	Atteinte de l'intégrité vasculaire	58
2.9.	Hypotension et défaillance multiviscérale.....	59
3.	Diagnostic de la maladie à virus Ebola	59
3.1.	Quelle méthode de diagnostic utiliser ?.....	59
3.2.	Quel patient diagnostiquer ?.....	63
3.3.	Anomalies biologiques d'un patient infecté par Ebola.....	65
PARTIE 7 : MESURES DE PREVENTION		66
1.	Stratégies établies par l'OMS pour prévenir la transmission du virus Ebola à l'homme	66
1.1.	Phase pré-épidémique.....	66
1.2.	Alerte sanitaire.....	67
1.3.	Phase épidémique	67
PARTIE 8 : LES TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX.....		70
1.	Transfusion de sang et de plasma de convalescent.....	70
2.	Traitement par anticorps.....	71
2.1.	Immunoglobulines polyclonales.....	71
2.2.	Anticorps monoclonaux.....	72
3.	Les médicaments antiviraux	75
3.1.	Inhibiteurs de polymérase.....	75

3.2.	Nanoparticules lipidiques contenant des petits ARN interférents	76
3.3.	Oligonucléotides anti-sens.....	77
4.	Autres traitements.....	77
4.1.	Modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstrogène (SERMs)	77
4.2.	Traitement par anticoagulant.....	78
4.3.	Thérapie liée au sepsis.....	78
PARTIE 9 : REPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION A VIRUS EBOLA.....		79
1.	Mécanismes viraux de dérèglement ou d'échappement immunitaire.....	79
1.1.	Stratégie d'échappement au système immunitaire par mimétisme apoptotique.....	79
1.2.	Inhibition de l'immunité innée	80
1.3.	Inhibition de l'immunité adaptative	82
2.	Réponse immunitaire précoce et survie.....	83
3.	Les différents profils immunologiques de réponse à l'infection à virus Ebola	85
4.	Existe-t-il une immunité naturelle contre le virus Ebola ?	88
PARTIE 10 : LA VACCINATION CONTRE LE VIRUS EBOLA		89
1.	Définition du vaccin idéal	89
2.	Les différentes étapes de la commercialisation d'un vaccin	89
3.	Les modèles animaux pour l'évaluation de l'efficacité vaccinale.....	90
3.1.	Le primate non humain (PNH)	90
3.2.	Le cobaye	90
3.3.	La souris	91
4.	Quelle cible antigénique choisir pour neutraliser le virus Ebola ?	91
5.	Les différents essais vaccinaux contre le virus Ebola	92
6.	Vaccins composés de virus entier.....	93
6.1.	Vaccin vivant atténué	93
6.2.	Vaccin inactivé	93
7.	Les vaccins recombinants.....	94
7.1.	Vaccins sous unitaires	95
7.2.	Les particules pseudo-virales	96

7.3.	La vaccination génétique ou vaccins à ADN.....	99
7.4.	Développement des vecteurs viraux.....	102
7.4.1.	Particules de réplicon du virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV)	103
7.4.2.	Particules de réplicon du virus Kunjin exprimant la GP virale	104
7.4.3.	Virus Parainfluenza humain de type 3 (HPIV3).....	105
7.4.4.	Virus recombinant de la Rage	105
7.4.5.	Virus recombinant de la Vaccine.....	106
7.4.6.	Cytomégalovirus recombinant.....	106
7.4.7.	Adénovirus de type 5 défectif pour la réplication (rAd5).....	107
7.4.8.	Le vaccin ChAd3-MVA ZEBOV	111
7.4.9.	Le vaccin rVSV-ZEBOV	115
8.	Mécanismes immunitaires impliqués dans la protection vaccinale.....	126
	CONCLUSION.....	128
	BIBLIOGRAPHIE.....	130
	RESUME.....	154

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1. Répartition géographique des principales épidémies à virus Ebola humaines et animales survenant entre 1976 et 2008.	15
Figure 2. Répartition géographique des nouveaux cas et de l'ensemble des cas confirmés en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone au 7 janvier 2015.	23
Figure 3. Répartition géographique des nouveaux cas et de l'ensemble des cas confirmés en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone au 30 mars 2016.	23
Figure 4. Le virus Ebola Zaïre visible au microscope électronique à balayage.	26
Figure 5. Le génome du virus Ebola.	27
Figure 6. La structure du virus Ebola.	28
Figure 7. Structure de la glycoprotéine virale trimérique aux sous unités constituées d'hétérodimères GP1 et GP2.	29
Figure 8. Les stratégies d'expression du gène de la glycoprotéine (GP) des virus Ebola et Marburg.	30
Figure 9. Les multiples rôles de la glycoprotéine soluble.	35
Figure 10. Etapes de l'infection de la cellule hôte par le virus Ebola.	37

Figure 11. Adhésion du virus Ebola à la cellule cible.....	39
Figure 12. Le mécanisme de fusion membranaire.	41
Figure 14. Le cycle naturel du virus Ebola.	49
Figure 15. Arbre phylogénétique comparant les séquences des différents Filovirus.....	51
Figure 16. Les différentes phases cliniques de la maladie à virus Ebola.	53
Figure 17. Rôle des macrophages et des cellules dendritiques dans la pathogénèse du virus Ebola.....	55
Figure 18. La méthode de capture d'antigène ou ELISA « sandwich ».....	61
Figure 19. Le test de diagnostic rapide eZYSCREEN®.....	62
Figure 20. Courbes des épidémies à virus Ebola chez l'homme et l'animal.....	66
Figure 21. Equipement de protection individuelle porté par le personnel soignant lors de l'épidémie à virus Ebola.....	69
Figure 22. Schéma représentant le médicament Zmapp se fixant à la GP virale.....	74
Figure 23. Structure chimique du favipiravir.	75
Figure 24. Mécanismes développés par le virus Ebola pour échapper au système immunitaire.	79

Figure 25. La téthérine est une protéine cellulaire qui empêche le bourgeonnement et la libération des virus enveloppés.	81
Figure 26. Les différents modèles envisagés pour expliquer la défaillance de la réponse immunitaire face à l'infection à virus Ebola.	84
Figure 27. Courbes représentant les différents profils immunitaires.	85
Figure 28. Représentation schématique du processus de développement vaccinal, de l'évaluation du risque au programme d'implantation vaccinal.	89
Figure 29. Principales avancées scientifiques dans la découverte et la commercialisation d'un vaccin sûr et efficace contre le virus Ebola.	92
Figure 30. Photographies de particules pseudo-virales morphologiquement identiques au virus Ebola infectieux visibles au microscope électronique.	97
Figure 31. Comparaison des titres d'anticorps entre le vaccin constitué de virus Ebola inactivés et le vaccin constitué de PPVs.	98
Figure 32. Réponse immunitaire déclenchée par l'injection de vaccins à ADN.	100
Figure 33. Mécanismes immunitaires déclenchés par l'inoculation de rAd5-GP non répliatif.	108
Figure 34. Réponse immunitaire suite à l'administration du vaccin ChAd3 ZEBOV dans l'étude EBL01.	114

Figure 35. Le virus recombinant de la Stomatite Vésiculaire exprimant la glycoprotéine (GP) du virus Ebola (VSVΔG/ZEBOVGP)..... 116

Figure 36. Accélération des essais cliniques du rVSV-ZEBOV en vue de l'obtention de l'AMM. 117

Liste des tableaux

Tableau 1. Chronologie des flambées d'épidémies à virus Ebola de 1976 à 2012 19

Tableau 2. Classification de l'OMS des fièvres hémorragiques virales..... 25

Tableau 3. Comparaison des taux de mortalité entre les différentes espèces du virus Ebola. 36

Tableau 4. Tests diagnostiques effectués en fonction de la période de l'infection virale..... 59

Tableau 5. Résumé des recommandations pour la gestion des patients en attente de diagnostic, en fonction de l'évaluation du risque potentiel d'exposition au virus Ebola 63

Tableau 6. Différentes plateformes vaccinales prometteuses chez le PNH. 95

Tableau 7. Propriétés des principaux vecteurs viraux utilisables pour la vaccination contre le virus Ebola..... 103

Tableau 8. Réponses immunitaires induites par différents sérotypes de vecteurs *Adénovirus* humains (rAd) et simiens (ChAd).. 110

Tableau 9. Les différents essais cliniques de phase I pour le vecteur ChAd3 112

LISTE DES ABREVIATIONS

Ad5	Adénovirus de type 5
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BDBV	Ebolavirus Bundibugyo
BSL-4	Biosafety of Level 4
CEA	Commissariat aux Energies Atomiques
CD	Cellule dendritique
CDC	Center for Disease Control
CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DC-SIGN integrin	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-
EBOV	Ebolavirus Zaïre
EPI	Equipement de protection individuelle
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
FH	Fièvre hémorragique
GAP	GTPases Activating Proteins
GEF	Guanine Echang factor (GEG)
GP	Glycoprotéine
GTP	Guanosine Triphosphate
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting
HPIV3	Human Parainfluenza virus de type 3
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LDL	Low-density lipoprotein
L-SIGN	Liver-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

MARV	Virus Marburg
NK	Cellules Natural Killer
NPC1	Récepteur Niemann Pick 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
PFU	Plaque forming-units
PI3-K	Phosphoinositide 3-kinase
PMOs	Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers
PNH	Primate Non Humain
PPV	Particules pseudo-virales
RAVV	Virus Ravn
RDC	République du Congo
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SUDV	Ebolavirus Soudan
TACE	Tumor necrosis factor α -converting enzyme
TAFV	Ebolavirus Forêt de Tai
TAM	Tyro3, Axl, and Mer
TIM	T-cell Immunoglobulin and mucin domain
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Facteur de Nécrose Tumorale α
Tsg 101	Tumor susceptibility gene 101
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulator
sGP	Glycoprotéine sécrétée
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
ssGP	Petite glycoprotéine sécrétée
RESTV	Ebolavirus Reston
VEEV	Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSV	Virus de la Stomatite vésiculeuse (VSV)

INTRODUCTION

En 1967, la communauté scientifique découvre un virus d'un genre nouveau, le virus Marburg, qui du fait de sa forme caractéristique filamenteuse au microscope électronique sera nommé *Filovirus* [1]. Quelques années plus tard, un virus plus virulent vient s'ajouter à cette famille des *Filovirus*, le virus Ebola, qui est à l'origine d'épidémies meurtrières en Afrique Centrale, avec un taux de létalité atteignant 90% pour certaines épidémies. En effet, ces deux genres viraux entraînent des fièvres hémorragiques chez l'homme et le primate, avec comme principaux signes de gravité, des hémorragies sévères puis une défaillance multiviscérale conduisant dans de nombreux cas au décès [2,3].

Mis à part l'épidémie chez des macaques crabiers à Reston aux Etats Unis, causée par une souche d'Ebola d'origine asiatique non virulente chez l'homme [4], les épidémies humaines concernent l'Afrique. Jusqu'à l'épidémie de 2014-2015 en Afrique de l'Ouest, les *Filovirus* étaient une des rares familles de virus pour laquelle nous avons une profonde ignorance. De nombreuses études récentes ont permis d'approfondir nos connaissances en matière d'immunologie et de virologie afin de comprendre la pathogénèse du virus Ebola. Récemment, le réservoir du virus a été identifié comme étant les chauves-souris frugivores vivant dans les forêts africaines [5]. Ces dernières contaminent ensuite des petits animaux de brousse ou des singes, hôtes intermédiaires ou accidentels, qui auront un rôle de vecteur de la maladie à l'homme, mais la transmission directe de la chauve-souris à l'homme est possible [6]. L'épidémie s'étendra ensuite par transmission interhumaine.

La gravité de l'infection s'explique par la capacité du virus à paralyser de manière précoce le système immunitaire de l'homme, hôte accidentel peu adapté à ce type d'infection virale, favorisant ainsi la dissémination du virus Ebola et déclenchant par la suite une réaction immunitaire incontrôlée délétère pour l'hôte [7,8]. Avec le nombre croissant d'épidémies centre-africaines et la découverte de l'existence d'une immunité naturelle protectrice chez certains africains, la communauté scientifique internationale a travaillé sur la possibilité d'un vaccin immunisant contre le virus Ebola. La glycoprotéine, protéine de l'enveloppe virale, a été identifiée comme la protéine-clé immunogène [9]. Néanmoins, il a fallu attendre la découverte des vecteurs viraux comme outil de vaccination afin d'obtenir une réelle efficacité vaccinale chez le primate, dès la première injection [10,11]. L'épidémie de 2014-2015, qui fut la plus importante à ce jour, faisant plus de 11 000 morts, a permis l'accélération des études

cliniques afin de commercialiser le plus tôt possible un vaccin efficace et sécuritaire. Plusieurs vaccins recombinants ont entamé leurs essais cliniques de phase III, dans un contexte épidémique en Afrique, contribuant ainsi à contenir cette épidémie, parallèlement aux méthodes barrières engagées par le personnel soignant [12].

L'objectif de cette thèse est de partir à la découverte du virus Ebola, comprendre les particularités de ce virus si meurtrier, et sa capacité à déréguler le système immunitaire, mais aussi les stratégies mises en place par l'homme pour développer une vaccination efficace. Nous aborderons successivement l'historique des épidémies, la description virale et la physiopathologie de la maladie à virus Ebola. Puis, on traitera l'immunologie en détaillant les stratégies virales d'échappement au système immunitaire, les différents profils de réponses immunitaires et l'avancée des études cliniques pour la commercialisation d'un vaccin sûr et immunogène contre ce virus.

PARTIE 1 : HISTORIQUE

1. La découverte des *Filovirus* avec le virus Marburg

En 1967, les scientifiques font la découverte de la famille des *Filovirus* lorsqu'ils isolent pour la première fois le virus Marburg. Plusieurs travailleurs d'un laboratoire pharmaceutique allemand souffraient d'une maladie à la même symptomatologie grave et inhabituelle, et furent transférés à l'hôpital Marburg. Cette maladie fut décrite comme la fièvre hémorragique de Marburg. La source de la contamination virale fut rapidement identifiée comme étant des singes verts rapportés d'Ouganda, qui servaient de cobayes pour l'industrie pharmaceutique productrice de vaccins, ce virus zoonotique se révélant également très pathogène chez ces animaux. Des cas semblables sont apparus à Francfort et en Yougoslavie, du fait de la présence de ces singes originaires d'Ouganda dans les laboratoires pharmaceutiques. Les singes furent euthanasiés, et une procédure de quarantaine a permis de contenir l'épidémie avec seulement 31 cas et une mortalité de 23% [1].

Depuis son apparition en 1967, seulement cinq autres épidémies ou contaminations sporadiques se sont succédées. La première a eu lieu en Afrique du Sud en 1975, où le cas index, qui est décédé, a contaminé deux autres personnes ayant survécu [13]. Puis en 1980, un français séjournant au Kenya ayant visité une grotte africaine hébergeant des chauves-souris, meurt à l'hôpital de Nairobi où il contamine un médecin qui a survécu [14]. Un petit garçon suédois nommé Ravn ayant visité cette grotte meurt également de la maladie en 1987, donnant son nom à une nouvelle souche du virus Marburg [15]. Une autre épidémie eut lieu de 1998 à 2000 en République du Congo (RDC) où elle fit 73 cas [16]. La dernière épidémie qui se déroula de 2004 à 2005 en Angola, est la plus meurtrière avec 227 décès sur 252 cas (mortalité de 90%) [17]. La découverte de ce virus effrayant à la morphologie inhabituelle, dont on ignorait tout de l'histoire naturelle et de son évolution, laissait présager le cours des événements similaires avec Ebola.

2. L'Afrique comme lieu d'émergence d'un second *Filovirus* : le virus Ebola

En 1976, la communauté internationale a été surprise par la découverte d'un second *Filovirus* plus meurtrier, le virus Ebola, morphologiquement similaire au virus Marburg, mais sérologiquement et génétiquement différent. Deux espèces différentes du virus Ebola circulaient simultanément en Afrique centrale, et furent responsables d'épidémies meurtrières de fièvre hémorragique. La souche Ebolavirus Zaïre circulait au Nord-ouest de la RDC, avec comme épïcentre le village de Yambuku, situé à côté de la rivière Ebola qui a donné son nom

au virus, tandis que la souche Ebolavirus Soudan fut à l'origine d'une épidémie au Sud du Soudan, proche de la frontière avec la RDC qui affecta principalement les villes de Nzara et Maridi. Ebolavirus Zaïre est plus meurtrier avec un taux de mortalité de 88% (280 décès) pour 53% pour Ebolavirus Soudan (151 décès). En RDC, la réutilisation de seringues contaminées par le virus Ebola, pour des injections de chloroquine contre le paludisme, au sein de l'hôpital local de la Mission Catholique de Yambuku fut la source de dissémination de l'infection. De même, les premiers cas de l'épidémie au Soudan étaient des employés de l'usine de coton de Nzara, et l'épidémie s'est amplifiée par transmission nosocomiale, lors du transport d'un patient à l'hôpital de Maridi, avec une forte mortalité parmi le personnel soignant du fait de l'absence de moyens de protection individuelle. Les épidémies, qui ont duré de juin à novembre 1976, ont néanmoins été contrôlées par la mise en place des traditionnelles méthodes de quarantaine [18,19].

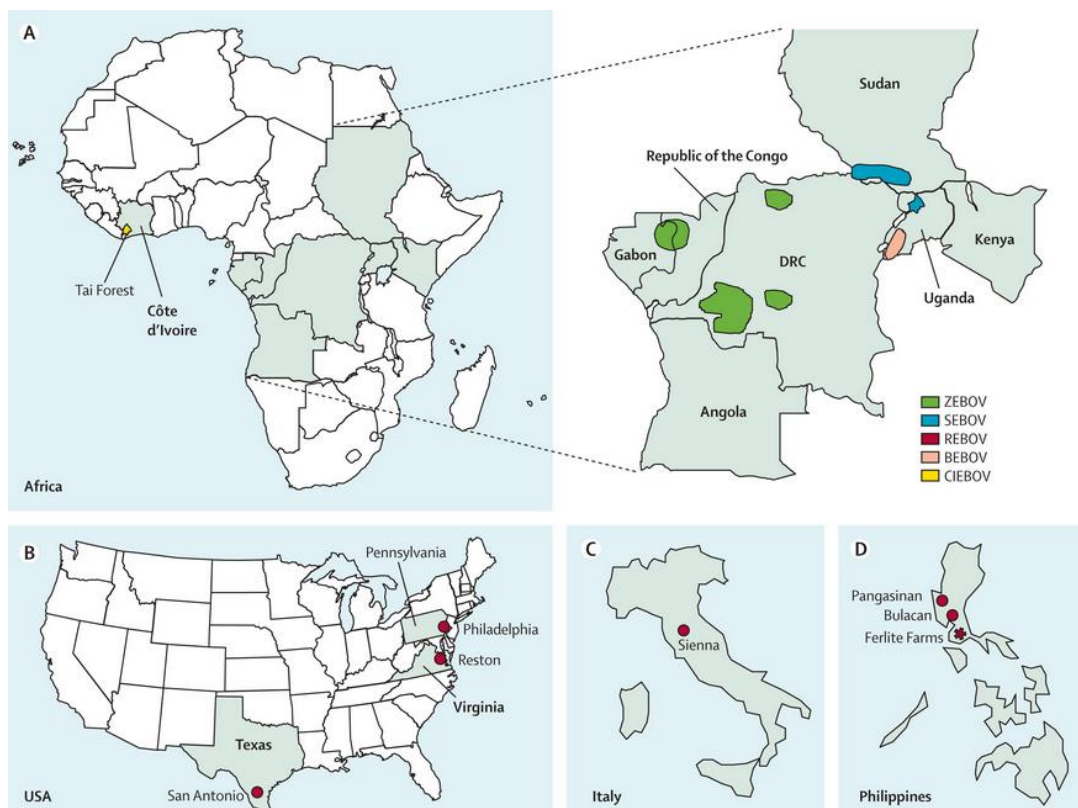


Figure 1. Répartition géographique des principales épidémies à virus Ebola humaines et animales survenant entre 1976 et 2008. A) En Afrique, on peut voir la répartition géographique distincte des différentes espèces virales : Ebolavirus Zaïre (ZEBOV), Soudan (SEBOV), Bundibugyo (BEBOV) en Afrique centrale et Ebolavirus Côte d'Ivoire (CIEBOV, renommé récemment par les taxonomistes Ebolavirus Forêt de Tai) avec 1 seul cas recensé en Afrique de l'Ouest. B) Epidémies à Ebolavirus Reston (REBOV) chez le macaque crabier aux Etats Unis et en Italie par importation de singes infectés provenant d'un centre exportateur de primates localisé aux Philippines. (D'après Feldmann, H. et Geisbert, T.W.) [20].

En 1977, une petite fille de 9 ans est décédée d'une infection à Ebolavirus Zaïre (EBOV) dans le village de Tandala en RDC, proche de la République Centrafricaine, sans autre contamination mentionnée. Des études rétrospectives dans cette région ont révélé deux cas d'infections antérieures à Ebola en 1972. Une analyse sérologique a montré que 7% des résidents possédaient des anticorps contre le virus [21].

De juillet à octobre 1979, une 2^{ème} épidémie due à Ebolavirus Soudan (SUDV) a lieu dans la même région que la précédente flambée de 1976, à Nzara au Soudan, mais sera beaucoup moins étendue, faisant 22 morts. Le patient zéro était un travailleur de l'usine de coton de Nzara, comme pour l'épidémie de 1976, dont le plafond était colonisé par des chauves-souris [22].

3. Apparition d'une nouvelle souche du virus Ebola d'origine asiatique

En 1989, des cas de fièvre hémorragique apparaissent chez des macaques crabiers importés des Philippines, dans un centre de quarantaine animale à Reston en Virginie puis en Pennsylvanie, aux Etats Unis. Rapidement une nouvelle espèce du virus Ebola est isolée, que l'on nomme Ebolavirus Reston (RESTV). Ce virus entraîne un syndrome hémorragique chez le singe avec un taux de mortalité de 82%. Il est transmissible à l'homme, puisque des analyses biologiques ont révélé la présence d'anticorps IgG anti-RESTV chez 4 employés en contact avec les singes dans le centre de Virginie, 3 employés du centre des Philippines, et le virus a été détecté dans le sang d'un employé après une exposition percutanée. Néanmoins, ce virus est non pathogène chez l'homme, puisque chez toutes les personnes infectées, l'infection est asymptomatique, et aucune donnée épidémiologique n'a montré une possible transmission interhumaine. D'autres cas d'importations simiennes du même centre philippin ont été à l'origine de la circulation du virus à Alice au Texas, à Reston en 1990, puis à Sienne en Italie en 1992, et de nouveau au Texas en 1996. Les singes survivants en contact avec les singes malades furent euthanasiés et le centre philippin, dont les conditions d'hygiène étaient déplorables, fut définitivement fermé en 1997 [4,23].

En 2008, aux Philippines, une souche de RESTV assez similaire à la souche simienne est isolée chez des porcs malades, co-infectés par le virus du Syndrome Reproductif et Respiratoire porcin ainsi que par le Circovirus porcin de type 2. Il s'avère finalement que l'infection à RESTV est asymptomatique chez le porc. De même, des cas de contaminations humaines asymptomatiques secondaires à la transmission du virus du porc à l'homme ont également été identifiés [24,25].

4. La réémergence d'Ebola en Afrique 15 ans plus tard

Depuis l'apparition de la maladie à virus Ebola en Afrique entre 1976 et 1979, il n'y a pas eu de nouvelles épidémies jusqu'en 1994. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il y ait eu quelques contaminations sporadiques qui sont passées inaperçues au sein des villages, par absence de structures d'accueil hospitalières, lieu de dissémination virale par transmission nosocomiale. Pendant 15 ans, le virus a continué de circuler dans son réservoir naturel.

En 1994, une nouvelle souche du virus Ebola fait son apparition, Ebola Forêt de Tai (TAFV) nommée initialement Ebola Côte d'Ivoire, qui a été découverte par des ethnologues chez des chimpanzés dont le taux de mortalité était anormalement élevé dans la forêt de Tai en Côte d'Ivoire [26]. L'une des scientifiques a été contaminée par cette souche virale lors de l'autopsie d'un cadavre de chimpanzé et a été transférée en Suisse pour recevoir les soins nécessaires, où l'analyse du virus a été documentée. C'est le premier cas connu de contamination humaine par le virus Ebola en Afrique de l'Ouest et le seul cas de contamination par TAFV [27].

Rapidement, il y a une escalade des épidémies dues à EBOV. En RDC, de janvier à juillet 1995, il y a une épidémie dans la ville de Kikwit. Le patient zéro travaillait dans la forêt aux alentours de la ville. Malgré des ressources médicales plus perfectionnées, l'épidémie reste aussi étendue qu'en 1976 avec 254 morts, car elle a lieu dans une grande ville de plusieurs milliers d'habitants, et l'infection va disséminer à partir des 2 grands hôpitaux de la ville [28].

Trois épidémies d'EBOV vont se succéder dans le Nord Est du Gabon. La première qui a lieu à Mekouka, de décembre 1994 à janvier 1995, a commencé dans 3 camps de mines d'or dans la forêt tropical. Quelques victimes ont rejoint l'hôpital le plus proche localisé à Makokou où une deuxième vague épidémique a eu lieu. En 1996, une épidémie touche le village de Mayibout suite au transport et dépeçage par 18 enfants du village d'une carcasse de chimpanzé retrouvé mort, infectant par la suite leurs proches. La troisième épidémie qui a lieu d'octobre 1996 à mars 1997, dans la région de Booué, a également pour origine la contamination d'un chasseur par une carcasse de chimpanzé contaminé. Par la suite, le transport de plusieurs patients infectés dans la ville de Libreville a permis la dissémination de l'infection. Un professionnel de santé infecté à Libreville s'est rendu en Afrique du Sud, où il a transmis la maladie à l'infirmière qui le soignait et qui est décédée [29].

Durant les années 2001 à 2003, les épidémies à EBOV vont se multiplier dans un territoire géographique relativement limité, au niveau de la frontière entre le Gabon et la RDC. L'épidémie de Mekambo consiste en fait en l'apparition de plusieurs épidémies indépendantes les unes des autres. Le point de départ a été le village de Medemba, qui a fait plusieurs foyers secondaires aux alentours, notamment à Mekambo. D'autres épidémies eurent lieu successivement dans les villes d'Ekata, Olloba, Etakangaye et Grand Etoumbi. Les épidémies avaient pour la plupart, comme origine, la contamination d'un chasseur par une carcasse d'antilope ou de chimpanzé infectés, EBOV étant source d'épidémies importantes dans la région chez de nombreuses espèces animales (chimpanzé, gorille, antilope) expliquant le déclin de ces animaux dans ces régions. Les épidémies humaines sont généralement précédées d'épidémies chez les singes, d'où l'intérêt d'une surveillance démographique de la population locale simienne. Les épidémies vont ensuite s'étendre de l'autre côté de la frontière, en RDC. Simultanément à l'épidémie de Mekambo, une autre a lieu dans le village d'Entsiami et aux alentours. Les séquençages viraux montrent l'existence de plusieurs souches virales circulant simultanément. Puis une flambée va affecter les villes de Mbomo et Kelle, entre décembre 2002 et mai 2003. La suivante aura lieu de novembre à décembre 2003 et aura pour point de départ Mbanza, affectant par la suite Mbomo [30,31].

SUDV va ensuite être à l'origine de 2 épidémies, une très étendue dont le point de départ est le district de Gulu qui s'est propagée ensuite aux districts de Mbarara et Masindi en Ouganda en 2000-2001 qui fit 224 morts, les chaînes de transmission se multipliant lors des funérailles de patients infectés. La deuxième en 2004 dans le comté de Yambio au Sud du Soudan fut relativement limitée, avec 7 morts [32].

En 2007, le virus Ebola n'a pas fini de surprendre, avec l'apparition d'une nouvelle espèce virale, Ebola Bundibugyo (BDBV), moins virulente qu'EBOV et SUDV, avec un taux de mortalité de 25% faisant 37 morts pour l'épidémie du district de Bundibugyo en Ouganda [33]. Cette même année, une épidémie à EBOV de grande ampleur a lieu en RDC. Une étude a montré que cette épidémie était due à une transmission directe du virus de la chauve-souris à l'homme [6]. Une seconde épidémie plus limitée a eu lieu entre 2008 et 2009.

En 2011, SUDV cause le décès d'une fillette de 12 ans dans le district de Luwero en Ouganda. La suspicion précoce d'une infection à virus Ebola a permis la mise en place rapide des mesures de prévention nécessaires dès son admission à l'hôpital, évitant ainsi l'éclosion d'une nouvelle épidémie. [34]

En 2012, après analyse virologique, il s'est avéré que quatre épidémies distinctes de fièvre hémorragique à *Filovirus* se chevauchant partiellement circulaient en Afrique équatoriale. SUDV fut à l'origine d'une flambée épidémique de juin à octobre 2012 dans le district de Kibaale en Ouganda, puis de novembre 2012 à janvier 2013 dans le district de Luwero. De même, le virus Marburg fit une dizaine de morts en Ouganda. Le virus Bundibugyo réemergea de juin à novembre 2012 en RDC. [35]

Année	Pays	Sous-type du virus	Nombre de cas	Nombre de décès	Taux de létalité
2012	RDC	Ebola Bundibugyo	57	29	51%
2012	Ouganda	Ebola Soudan	7	4	57%
2012	Ouganda	Ebola Soudan	24	17	71%
2011	Ouganda	Ebola Soudan	1	1	100%
2008	RDC	Ebola Zaïre	32	14	44%
2007	Ouganda	Ebola Bundibugyo	149	37	25%
2007	RDC	Ebola Zaïre	264	187	71%
2005	Congo	Ebola Zaïre	12	10	83%
2004	Soudan	Ebola Soudan	17	7	41%
2003 (Nov-déc.)	Congo	Ebola Zaïre	35	29	83%
2003 (Janv-avril)	Congo	Ebola Zaïre	143	128	90%
2001-2002	Congo	Ebola Zaïre	59	44	75%
2001-2002	Gabon	Ebola Zaïre	65	53	82%
2000	Ouganda	Ebola Soudan	425	224	53%
1996	Afrique du Sud	Ebola Zaïre	1	1	100%
1996 (Juil.-déc.)	Gabon	Ebola Zaïre	60	45	75%
1996 (Janv- avril)	Gabon	Ebola Zaïre	31	21	68%
1995	RDC	Ebola Zaïre	315	254	81%
1994	Côte d'Ivoire	Ebola Forêt de Taï	1	0	0%
1994	Gabon	Ebola Zaïre	52	31	60%
1979	Soudan	Ebola Soudan	34	22	65%
1977	RDC	Ebola Zaïre	1	1	100%
1976	Soudan	Ebola Soudan	284	151	53%
1976	RDC	Ebola Zaïre	318	280	88%

Tableau 1. Chronologie des flambées d'épidémies à virus Ebola de 1976 à 2012. (D'après *The Center for Disease Control*), RDC : République du Congo [36].

5. La Guinée : point de départ de la plus importante épidémie à virus Ebola

L'épidémie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest a commencé le 26 décembre 2013, dans le village de Meliandou dans une zone forestière du Sud Est de la Guinée située au carrefour des frontières avec le Libéria et la Sierra Leone, lorsqu'un petit garçon de 2 ans développe les symptômes de la maladie à virus Ebola et en meurt 2 jours plus tard. C'est le premier cas d'infection à EBOV en Afrique de l'Ouest, et le début de la plus longue et importante épidémie à virus Ebola connue à ce jour. L'enfant se serait contaminé en jouant dans un arbre creux du village où séjournait une colonie de chauves-souris insectivores. Il contaminera sa sœur, sa mère et sa grand-mère, qui sera conduite à l'hôpital de Gueckédou pour être soignée, et décède dans les semaines qui suivent, en janvier 2014. Fin janvier, le chef du poste de santé de Méliandou lance une alerte suite au décès de 5 personnes souffrant de diarrhée sévère. Une équipe se rend sur place à Méliandou pour enquêter, suspectant le choléra, qui sévissait dans la région. Le résultat positif aux bactéries du choléra va ainsi permettre la conclusion de l'enquête et empêcher l'identification précoce d'EBOV. Le virus va se propager au sein du village de Méliandou et à Gueckédou, où un soignant en contact avec de nombreux patients va favoriser la dissémination de l'infection aux villages de Macenta, Nzérékoré et Kissidougou. Pendant 3 mois, la maladie va se répandre silencieusement dans la région située à la frontière avec le Libéria et la Sierra Leone. En mars 2014, les hôpitaux vont alerter le ministère de la santé et les humanitaires présents sur place à Gueckédou depuis 2010 pour une épidémie de paludisme, de la situation. Une enquête est menée, des échantillons sont prélevés et envoyés au laboratoire PS4 de Lyon. Il s'agit d'une sous espèce du virus Ebola Zaïre, génétiquement différente des sous espèces circulant en RDC et au Gabon depuis 1976. Alors que des cas sont signalés dans la capitale guinéenne Conakry, le 23 mars 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) annonce officiellement l'épidémie à virus Ebola en Guinée. On comptabilise 49 cas dont 29 décès due à EBOV. La première diminution du nombre de cas, la semaine du 28 avril 2014 a donné lieu à un élan d'optimisme prématuré de la part du Ministère de la Santé Guinéenne qui affirmait que l'épidémie était « pratiquement sous contrôle ». L'OMS appela à la prudence, la flambée couvrait probablement dans des zones échappant aux statistiques. L'équipe de riposte devait faire face à une résistance communautaire importante face aux enquêtes épidémiologiques de l'OMS, qui devaient avoir recours à des indicateurs indirects, sous-estimant l'épidémie. La population tenait les humanitaires pour responsables de l'implantation de la maladie dans la communauté et de nombreuses émeutes éclatèrent, vandalisant l'équipement des humanitaires, blessant de

nombreux volontaires, et tuant un membre de l'équipe. Lorsque le nombre de nouveaux cas diminuait, il ré-augmentait rapidement car lorsque l'épidémie était sous contrôle dans une région, cela attirait un mouvement de population créant de nouveaux foyers infectieux. A la fin de l'année 2014, la plupart des régions de la Guinée étaient touchées par la maladie. [37]

6. Situation au Libéria

Le 30 mars 2014, deux premiers cas libériens d'Ebola sont notifiés dans le comté de Lofa, à proximité de la frontière Guinéenne. La capitale libérienne Monrovia sera très vite touchée. Après une période de stabilisation d'avril à mai 2014, avec quelques cas sporadiques dans le comté de Lofa, il y a apparition en juin de nouveaux cas à Monrovia. Les épidémiologistes apprendront plus tard que l'épidémie a couvé plusieurs mois dans la capitale, avant d'éclater au grand jour en chaînes de transmission démultipliées. Le seul hôpital de la ville était vétuste, ne comportait pas de service d'isolement de patients et le personnel non formé ne disposait pas d'équipement de protection individuelle adapté. L'hôpital était devenu le lieu de transmission privilégiée de la maladie aux soignants, puisque fin septembre on dénombrait 200 professionnels de santé infectés par le virus. L'implication de la présidente du Libéria devant l'augmentation considérable du nombre de cas, a permis la mise en place précoce de mesures concrètes pour contrôler l'épidémie comme la réduction de la mobilité des personnes malades et des sujets contact, l'obligation de la crémation des dépouilles infectieuses et la mise en quarantaine du bidonville de West Point où la transmission était intense. En septembre 2014, l'épidémie s'était étendue à l'ensemble du pays, avec 14 nouveaux cas confirmés dans les 15 comtés du pays, 2000 cas cumulés et 1000 décès. La collaboration internationale a permis la création à Monrovia de plusieurs centres de traitement et la mise en place de laboratoires mobiles. L'OMS a envoyé des épidémiologistes qui recherchaient activement les cas contact afin de les surveiller. Ces mesures ont permis la première diminution du nombre de cas. En novembre, 6 comtés sur 15 comptaient des nouveaux cas, mais l'épidémie s'était déplacée de la ville aux régions rurales. Fin décembre, grâce à la participation communautaire, la ville de Monrovia avait pris le dessus sur le virus, restaient aux humanitaires à déplacer leurs capacités de soins aux régions rurales. [38]

7. Situation en Sierra Leone

L'origine de l'épidémie a été établie dans un village du district de Kailahun, situé à la frontière avec la Guinée, lors des funérailles d'une guérisseuse spirituelle ayant contracté Ebola suite aux soins apportés à des malades en provenance de la Guinée, en mai 2014. Elle

sera à l'origine de deux foyers de transmission dans la région de Kailahun et Kenema, épicentres de l'épidémie en Sierra Leone. Les patients furent transportés dans l'hôpital de Kenema, vétuste et mal équipée, où de nombreux décès eurent lieu parmi le personnel soignant, par défaut de matériel de protection. Médecins sans frontière ouvre des centres de traitement à Kailahun mais ces derniers sont très vite submergés par le nombre croissant de patients. Par manque d'épidémiologistes, de nombreuses failles dans le système de détection des cas contacts, a permis aux chaînes de transmission de se multiplier. De plus, la communauté doutait de la réelle sécurité des centres de soins, suite aux décès de plusieurs soignants et patients. En septembre 2014, le virus s'est implanté dans la capitale Freetown, tandis que la situation se stabilisait à Kailahun et Kenema. Mi-octobre, plus de 400 nouveaux cas suspects étaient notifiés chaque semaine à Freetown et dans les districts occidentaux environnants, tandis que chaque district du pays notifiait au moins 1 cas. Suite au problème majeur de manque de lits pour accueillir les patients, des centres de soins communautaires sont créés par l'OMS, contenant une dizaine de lits, permettant l'accès aux médicaments de base, et isolant ainsi les malades de la communauté. L'opération Western Area Surge a permis de regagner la confiance de la population, qui va ainsi participer à la notification des cas et contacts. [39]

Fin juillet, le premier cas nigérien est confirmé. Il y a un petit nombre de cas rapportés au Mali ainsi qu'au Nigéria et un seul cas au Sénégal.

Le 7 janvier 2015, on recensait plus de 20 000 cas confirmés, probables ou suspects de maladie à virus Ebola et plus de 8000 décès en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone. L'épidémie semblait être hors de contrôle, avec la quasi-totalité des districts qui déclarait des cas d'Ebola. Grâce aux mesures drastiques prises par l'OMS pour contrôler l'épidémie et l'aide internationale apportant les moyens matériels nécessaires pour le diagnostic, la prise en charge et l'isolement des malades, ainsi que la traçabilité des cas contacts par les épidémiologistes ont permis de faire reculer l'épidémie. Le dernier rapport de l'OMS datant du 30 mars 2016 montre que l'épidémie à virus Ebola est terminée, malgré que 2 nouveaux cas soient encore enregistrés, le suivi rigoureux des chaînes de transmission nous permet de dire que la situation est sous contrôle. L'apparition sporadique de nouveaux cas est due à la persistance du virus Ebola chez des survivants, au niveau testiculaire, le virus pouvant ainsi être transmis lors des rapports sexuels.

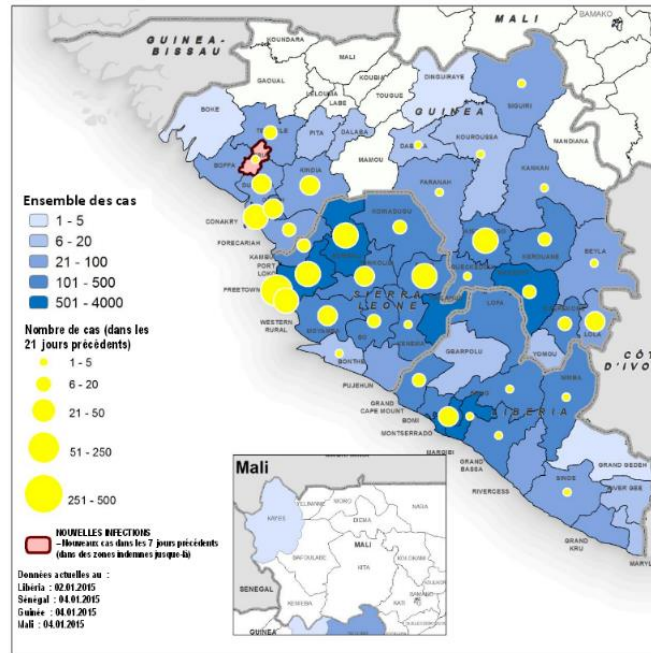


Figure 2. Répartition géographique des nouveaux cas et de l'ensemble des cas confirmés en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone au 7 janvier 2015. (D'après l'OMS) [40]

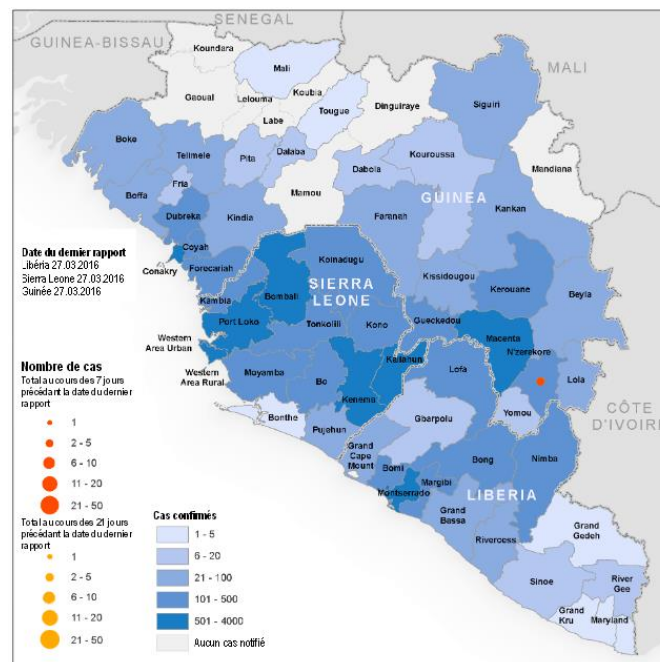


Figure 3. Répartition géographique des nouveaux cas et de l'ensemble des cas confirmés en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone au 30 mars 2016. (Dernier rapport en date de l'OMS) [41]

8. Les facteurs ayant contribué à l'expansion du virus en Afrique de l'Ouest

L'identification tardive du virus Ebola, après 3 mois de circulation virale en Guinée a permis la propagation silencieuse de l'épidémie jusqu'en Sierra Leone et au Libéria.

Lorsque les premiers cas apparurent dans plusieurs grandes villes africaines, l'épidémie était devenue hors de contrôle. L'Afrique équatoriale connaît bien les épidémies à virus Ebola et y est préparée, avec une bonne connaissance clinique de la maladie, la présence de laboratoires d'analyse permettant une détection précoce du virus, des hôpitaux contenant des services d'isolement et un personnel formé aux dispositifs de protection individuelle. L'Afrique de l'Ouest, qui n'avait subi aucune épidémie à Ebola, ignorait tout de cette maladie, et ne possédait pas les moyens nécessaires afin de contenir l'épidémie. En Afrique équatoriale, les épidémies survenaient généralement dans des zones rurales isolées, et les traditionnelles mesures de quarantaine au sein des villages permettaient de les contenir rapidement, contrairement à l'épidémie d'Afrique de l'Ouest où plusieurs capitales africaines ont été les épicyentres et où la maladie s'est propagée à quasiment la totalité des districts des 3 pays, submergeant les capacités de riposte. De plus, l'Afrique de l'Ouest est une région fortement touchée par les maladies infectieuses endémiques, comme le paludisme, le choléra ou la fièvre de Lassa, dont les symptômes précoces similaires à ceux de la maladie à virus Ebola, sont sources de confusion. Ainsi, les premiers cas ont été assimilés à tort à des cas de choléra. Cette région est fortement touchée par la pauvreté, la guerre civile récente ayant endommagé les infrastructures sanitaires, les réseaux routiers et de télécommunications. Le manque de ressources pour accueillir les patients, ainsi que pour leur transport, les difficultés d'émission d'alerte sanitaire et d'information des populations ont considérablement ralenti la prise en charge de l'épidémie. Du fait de la pauvreté, la population est très mobile, constamment à la recherche d'un travail ou de nourriture, ce qui rend difficile la traçabilité des sujets contacts à un malade. De plus, les patients malades retournaient dans leur village natal pour y mourir, favorisant la création de foyers secondaires épidémiques. Le nombre de professionnels de santé, déjà peu nombreux avant l'épidémie, a rapidement diminué, du fait de l'absence de protection face à un patient malade. Les croyances traditionnelles de la population, notamment les rites funéraires, ont favorisé la dissémination virale dans la communauté, puisque 60% des cas seraient dus à de telles pratiques. La population faisait confiance aux guérisseurs traditionnels, refusant de se rendre à l'hôpital, perçu comme un lieu de contagion et de mort, favorisant ainsi la propagation au sein des familles. Les communautés ont résisté, cachant leur malade chez eux au lieu de les emmener à l'hôpital, où ils ne revenaient jamais et pensaient même que les humanitaires avaient apporté cette épidémie. [42]

PARTIE 2 : LE VIRUS EBOLA

1. Classification

Quinze virus enveloppés à ARN monocaténaire classés en 4 familles virales sont responsables de fièvres hémorragiques humaines à la symptomatologie commune comprenant de la fièvre, des troubles digestifs et des signes hémorragiques. Ces virus sont généralement retrouvés dans les régions tropicales d’Afrique, d’Amérique du Sud et d’Asie. La transmission du virus peut s’effectuer par contact direct avec l’animal réservoir ou par l’intermédiaire d’un vecteur arthropode comme les arboviroses de la Fièvre de la vallée du Rift, la Fièvre jaune et la Dengue. [43]

Famille	Genre	Génome	Virus	Pathologie
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	ARN positif monocaténaire	Amaril Dengue	Fièvre jaune Dengue
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Phlebovirus</i> <i>Nairovirus</i> <i>Hantavirus</i>	ARN négatif monocaténaire	Rift Congo-Crimée Hantaan Séoul Puumala Sin Nombre	Fièvre de la vallée du Rift FH Congo-Crimée FH à syndrome rénal FH à syndrome rénal FH à syndrome rénal Syndrome pulmonaire à Hantavirus
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i>	ARN négatif monocaténaire	Lassa Junin Machupo Guanarito Sabia	FH de Lassa FH d’Argentine FH de Bolivie FH vénézuélienne FH du Brésil
<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i> <i>Marburgvirus</i>	ARN négatif monocaténaire	Ebola Marburg	Maladie à virus Ebola Maladie à virus Marburg

Tableau 2. Classification de l’OMS des fièvres hémorragiques virales. [44] FH : fièvre hémorragique

Le virus Ebola appartient à la famille des *Filovirus* ou *Filoviridae*, nommée ainsi du fait de la forme filamenteuse caractéristique des virions formant un « U », un crochet ou un bâtonnet, parfois ramifié, visible au microscope électronique, se distinguant ainsi des autres virus responsables de fièvre hémorragique dont la morphologie est sphérique. [45]

Les *Filovirus* appartiennent à l’ordre des *Mononegavirales*, les virus dont l’ARN simple brin non segmenté est de polarité négative, ordre dans lequel on retrouve entre autres, la famille *Paramyxoviridae* comprenant les virus des oreillons et de la rougeole. Les *Filovirus* regroupe 3 genres viraux : le genre *Cuevavirus* qui n’est pas pathogène chez l’homme, et les genres *Marburgvirus* et *Ebolavirus* tous deux responsables de fièvres hémorragiques.

Le genre *Cuevavirus* comprend l'espèce *cuevavirus Lloviu*, dont le génome a été découvert en 2002 chez des chauves-souris insectivores présentes dans une grotte espagnole. Sa pathogénicité chez l'homme est inconnue puisqu'aucun cas humain n'a été rapporté à ce jour. [46]

Le genre *Marburgvirus* comprend une seule espèce *marburgvirus Marburg* qui est subdivisée en deux souches virales génétiquement distinctes : le virus Marburg (MARV) et le virus Ravn (RAVV) qui présentent 20% de divergence génétique. [47]

Le genre *Ebolavirus* regroupe 5 espèces différentes :

- *Ebolavirus Zaïre* (EBOV), la souche virale la plus meurtrière, a été découverte en 1976 en République du Congo et est à l'origine de l'épidémie de 2014-2015 en Afrique de l'Ouest.
- *Ebolavirus Soudan* (SUDV), a été découvert en même temps qu'Ebola Zaïre en 1976 au Soudan, puis a été retrouvé par la suite en Ouganda.
- *Ebolavirus Reston* (RESTV), a été découvert aux Etats Unis en 1989, où il a entraîné une épidémie de fièvre hémorragique chez des singes importés d'Asie, mais l'infection chez l'homme demeure asymptomatique.
- *Ebolavirus forêt de Tai* (TAFV), a été découvert pour la première fois dans la forêt de Tai en Côte d'Ivoire où il fut responsable d'épidémies chez le singe. Cette souche, moins virulente chez l'homme est à l'origine d'un seul cas de contamination humaine.
- *Ebolavirus Bundibugyo* (BDBV) a été découvert en 2008, dans la région de Bundibugyo en Ouganda. [48,49]

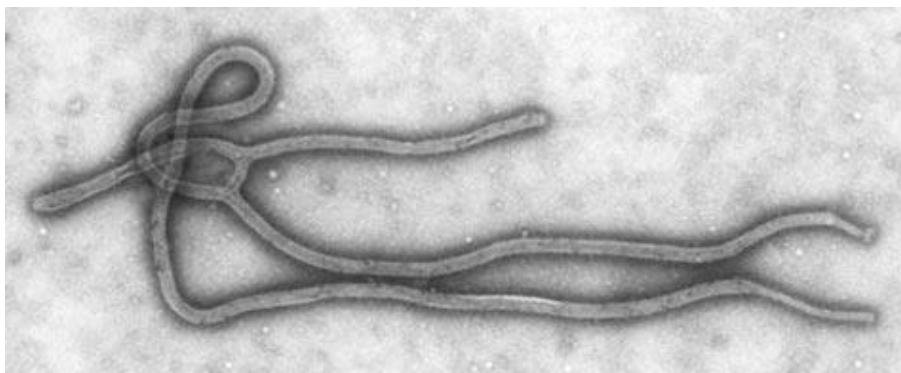


Figure 4. Le virus Ebola Zaïre visible au microscope électronique à balayage. (D'après The Center for Disease Control) [50].

2. Structure du virus Ebola

Le virus Ebola est un virus enveloppé d'apparence filamenteuse, dont le génome est constitué d'ARN monocaténaire de polarité négative, non segmenté. La longueur de la particule virale est d'environ 130 à 14 000 nm, son diamètre est de 80 nm. Le génome fait approximativement 19 kilobases, et contient 7 gènes codant pour les 9 protéines virales. En effet, le gène de la glycoprotéine (GP) va permettre la synthèse de 3 GP différentes grâce à des variations dans la transcription de ce gène par l'ARN polymérase virale.



Figure 5. Le génome du virus Ebola. ARN simple brin linéaire de polarité négative composé de 7 gènes codant pour les 9 protéines virales. (D'après *Viralzone*) [51]

L'enveloppe virale est constituée d'une membrane lipidique acquise lors du bourgeonnement du nouveau virion à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle contient sur son côté externe de la phosphatidylsérine, lipide impliqué dans l'entrée du virus dans la cellule hôte. Elle contient également de nombreux spicules de glycoprotéines glycosylées qui se composent d'un homotrimère contenant chacun 2 sous unités GP1 et GP2. Cette glycoprotéine est la seule protéine présente à la surface du virion, et constitue ainsi la cible privilégiée du système immunitaire car est directement accessible aux anticorps neutralisants.

Sur le côté interne de l'enveloppe virale, il y a les protéines VP40 et VP24 constituant la matrice hélicoïdale protégeant la nucléocapside virale. La protéine VP40 est nécessaire au bourgeonnement viral, activant le processus d'empaquetage de la nucléocapside virale par la membrane de l'hôte formant un nouveau virion infectieux. Le virus possède une nucléocapside hélicoïdale constituée de nucléoprotéines (NP) et de la protéine VP30 qui va interagir avec l'ARN et activer la transcription. Le complexe ribonucléoprotéique est composé de la nucléocapside virale ainsi que du brin d'ARN viral monocaténaire relié à l'ARN polymérase virale ARN dépendante et à son cofacteur, la protéine VP35 qui contrôle ainsi cette enzyme nécessaire à la transcription et la réplication de l'ARN viral [52,53].

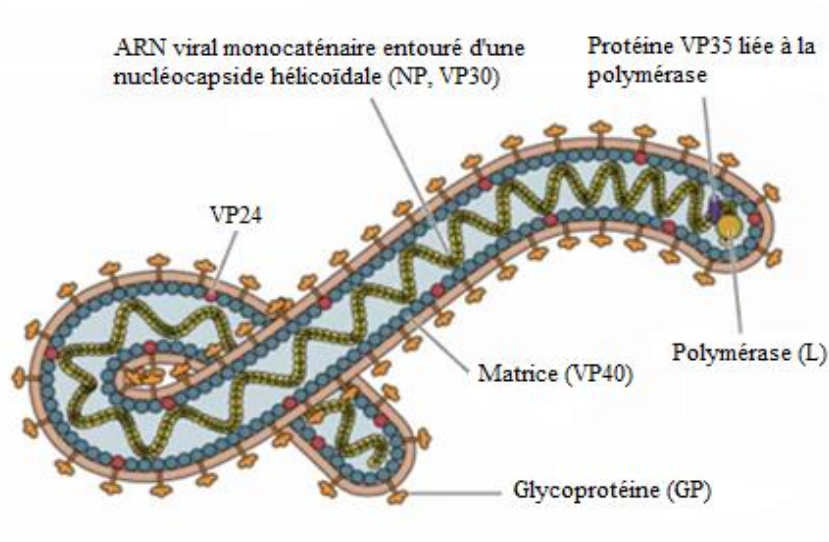


Figure 6. La structure du virus Ebola. Virus filamenteux enveloppé recouvert de spicules formés par les glycoprotéines virales trimériques entourant la matrice (constituée des protéines VP40 et VP24) qui recouvre elle-même la nucléocapside virale hélicoïdale (constituée de la NP et de la protéine VP30) protégeant l'ARN viral monocaténaire relié à la polymérase virale (L) et à la protéine VP35. (D'après *The National Institut of Health*).

3. Structure de la glycoprotéine virale trimérique

Lors de la synthèse de la glycoprotéine virale (GP) par la cellule hôte, plusieurs monomères de la GP s'assemblent au niveau du réticulum endoplasmique pour former une structure trimérique ayant la forme d'un calice. Ce précurseur trimérique va être clivé par une protéase furine au niveau de l'appareil de Golgi et chaque monomère va former 2 sous unités GP1 extracellulaire et GP2 transmembranaire reliées par un pont disulfure.

La sous-unité GP1 contient un domaine de liaison à un récepteur intracellulaire spécifique qui est protégé à son apex par une coiffe de glycanes et un domaine de type mucine, empêchant l'accès aux épitopes cruciaux par les anticorps neutralisants. Après protéolyse au niveau du lysosome, qui va ôter la coiffe de glycane et le domaine de type mucine, il y a découverte du domaine de liaison permettant l'attachement du virion au récepteur de la membrane de l'hôte.

La sous-unité GP2 contient la boucle hydrophobe de fusion qui va se relâcher lors de la liaison de GP1 à son récepteur, permettant ainsi la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte. Avant l'interaction avec son récepteur intracellulaire, la base de GP1 forme une pince qui stabilise la boucle de fusion de GP2 en conformation pré-fusion, l'empêchant de jaillir prématurément.

Bien que la GP du virus Ebola appartienne à la classe I, elle se différencie des autres boucles de fusion de cette classe, comme celles des virus Parainfluenza ou Influenza qui forment des hélices, mais forme une structure en feuillet bêta, comme les virus de classes II et III [54-56].

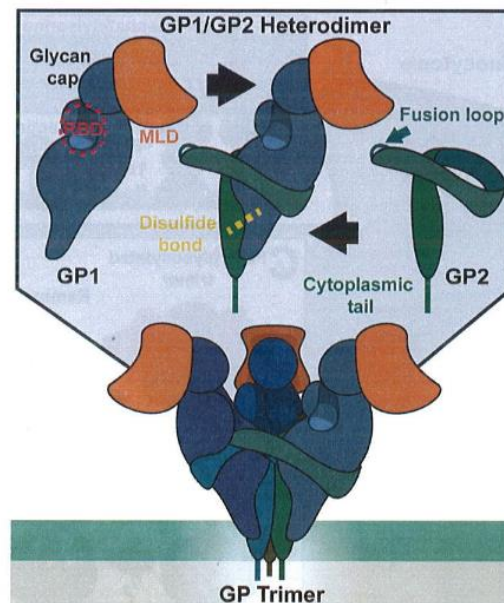


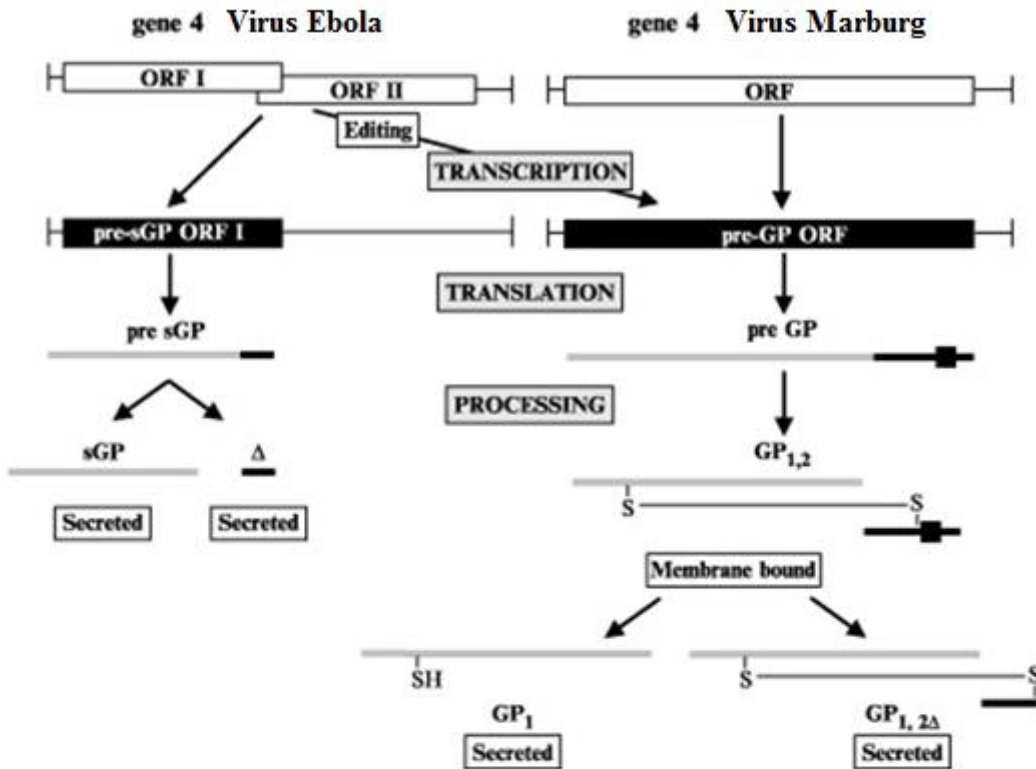
Figure 7. Structure de la glycoprotéine virale trimérique aux sous unités constituées d'hétérodimères GP1 et GP2. GP1 contient le domaine de liaison au récepteur de la cellule hôte (RBD) protégé par la coiffe de glycane et le domaine de type mucine. GP2 contient la boucle de fusion permettant le rapprochement et la fusion des membranes. (D'après Moller-Tank, S. et Maury, W.) [57].

4. Polymorphisme de la glycoprotéine

La GP est codée par le 4^{ème} gène du virus Ebola. Contrairement au virus Marburg, dont le gène de la GP va coder pour un unique cadre de lecture de 2043 nucléotides qui sera traduit en la GP virale transmembranaire, celui du virus Ebola est composé de deux cadres de lecture se chevauchant partiellement et dont les variations d'expression vont conduire à la synthèse de trois GP différentes. Ce mécanisme de variation d'édition lors de la transcription d'un gène viral a été décrit pour la première fois chez des virus de la famille des *Paramyxoviridae* concernant leur gène P.

Ainsi, on voit comment à partir d'un génome relativement simplifié comportant 7 gènes, en élaborant différentes stratégies d'expression d'un gène viral, le virus Ebola s'est adapté afin de diversifier ses fonctions par synthèse de différentes protéines.

A



B

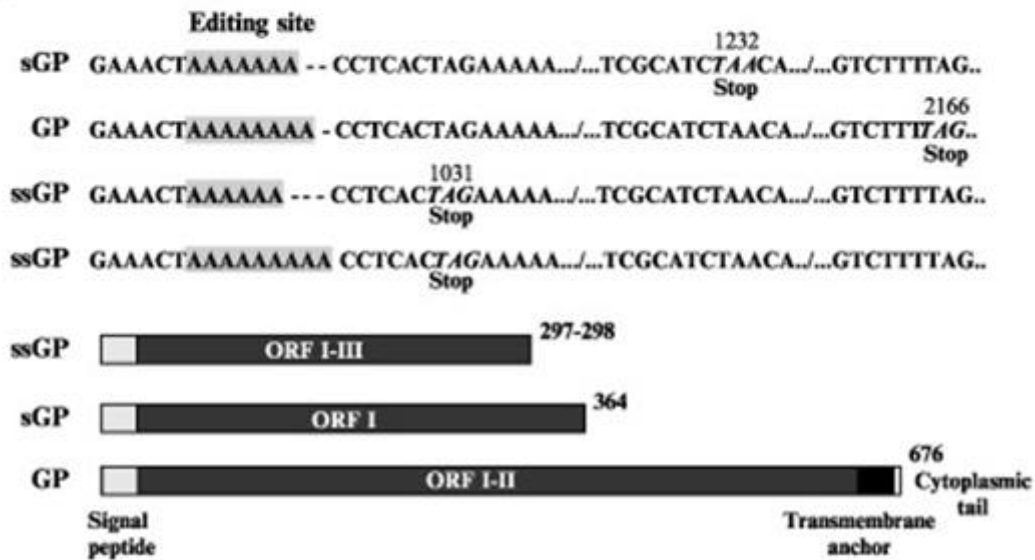


Figure 8. Les stratégies d'expression du gène de la glycoprotéine (GP) des virus Ebola et Marburg. A) Le gène de la GP du virus Marburg comporte 1 seul cadre de lecture (ORF pour Open Reading Frame) dont l'expression conduit à la synthèse de la GP virale transmembranaire contrairement à celui du virus Ebola qui comporte deux cadres de lecture (ORF I et ORF II) dont les variations d'expression permettent la synthèse de différentes GP. B) Variation dans la transcription du gène de la GP. La modification du nombre d'adénosines synthétisées par l'ARN polymérase virale décale le cadre de lecture et permet la synthèse des différentes GP (sGP, GP, ssGP) (*D'après Volchkov et al.*) [58].

4.1. La glycoprotéine sécrétée sGP

C'est la GP majeure, correspondant à 70% des GP synthétisées. Il s'agit d'une glycoprotéine soluble de 364 acides aminés, dont le domaine C terminal permettant l'ancrage à la membrane virale a été tronqué, puisque seul le premier cadre de lecture ORF I (open reading frame I) du gène 4 est exprimé (cf figure 8). Cette glycoprotéine sécrétée non structurale, car non liée au virion infectieux, est produite en absence de modifications au niveau du site d'édition. La synthèse de la sGP à partir de la pré-sGP par clivage par une protéase furine, libère le peptide Δ dans la circulation générale. La sGP va ensuite s'assembler en homodimères qui seront sécrétés en grande quantité dans la circulation générale.

4.2. La glycoprotéine transmembranaire virale GP1,2

Elle correspond environ à 25% des GP synthétisées. L'ajout d'une adénosine sur l'ARNm par l'ARN polymérase virale qui va « patiner » au niveau du site d'édition, structure en épingle à cheveux constitué de 7 uridines consécutives, va décaler le cadre de lecture, fusionnant ainsi les deux cadres de lectures ORF I et ORF II dont l'expression conduit à la formation de la glycoprotéine virale transmembranaire de 676 acides aminés qui est ancrée dans l'enveloppe virale. La pré-GP1,2 est ensuite clivée par une protéase furine, permettant la formation des 2 sous unités GP1 et GP2 reliées par un pont disulfure. La métalloprotéase TACE (tumor necrosis factor α -converting enzyme) peut cliver la partie membranaire de la GP synthétisée, lors de sa liaison à la membrane plasmique, conduisant à la libération de l'ectodomaine GP1,2 Δ de la glycoprotéine transmembranaire dans la circulation générale. Le pont disulfure peut ensuite être rompu, permettant le relargage de GP1 soluble.

4.3. La petite glycoprotéine sécrétée ssGP

Dans environ 5% des cas, l'ajout de deux adénosines ou la délétion d'une adénosine au niveau du site d'édition permet la lecture par l'ARN polymérase d'un troisième cadre de lecture ORF III qui sera raccourci par rapport à la lecture entière d'ORF I. Il y a formation d'une petite protéine tronquée ssGP, constituée de 298 acides aminés, dont le rôle physiologique n'est pas encore connu [58-60].

5. Les différentes fonctions de la GP1,2 virale

5.1. Entrée cellulaire

La particularité du virus Ebola est sa capacité à lier différents récepteurs présents sur de nombreux types cellulaires afin d'infecter ces cellules. La GP1,2 est responsable de l'attachement du virus à la cellule cible et de la fusion des membranes. Elle va ainsi se lier entre autres, aux récepteurs DC-SIGN, augmentant l'infectivité des cellules voisines (« *en trans* »). La sous-unité GP2 contient le peptide de fusion permettant l'entrée du virus, qui sera libéré après clivage d'une séquence peptidique précise par des cathepsines. La souche Reston contient des variations suboptimales dans la séquence contenant le domaine de clivage, ce qui peut expliquer en partie sa moindre pathogénicité chez l'homme [61,62].

5.2. Cytotoxicité de la GP1,2 transmembranaire

La cytotoxicité du virus Ebola dépend du niveau d'expression de la GP1,2, et plusieurs études ont relié celle-ci au domaine de type mucine riche en sérine-thréonine et hautement glycosylé présent sur la sous-unité GP1. L'inoculation du gène de la GP1,2 d'EBOV dans des cellules endothéliales humaines, conduit à une perte importante de l'intégrité vasculaire, qui n'est pas obtenue avec l'inoculation du gène de la GP d'Ebola Reston, non pathogène chez l'homme. Bien que l'effet cytotoxique de la GP1,2 ait été démontré *in vitro*, la GP1,2 ne suffit pas à elle seule pour expliquer la pathogénicité du virus Ebola *in vivo* [63,64].

La cytotoxicité de la GP1,2 est également attribuable au domaine extracellulaire de la GP2 qui entraîne une diminution sélective de l'expression des molécules de surface essentielles pour l'adhésion cellulaire, leur viabilité et la signalisation immunitaire, comme les intégrines $\alpha 5\beta 3$, conduisant à l'arrondissement des cellules et à leur détachement. La GP1,2 va lier la dynamine, protéine impliquée dans le trafic cellulaire, perturbant ainsi le transport de ces molécules d'adhérence à la surface des cellules. Elle va se fixer également à des molécules présentes au niveau de la membrane plasmique, déclenchant l'endocytose de certains récepteurs. La sGP et la GP1,2 Δ n'ont pas d'effet cytotoxique, ce qui montre la nécessité de l'intégrité du domaine transmembranaire de la GP.[65,66].

Il existe des mécanismes permettant de contrôler la toxicité cellulaire de la GP1,2 du virus Ebola, afin d'établir un juste équilibre permettant la réplication virale dans des conditions optimales. Au stade précoce de l'infection, la synthèse de GP1,2 est mesurée, du fait de la production majeure, lors de la transcription, de la sGP, empêchant la surexpression de GP1,2.

Un autre mécanisme régulateur fait intervenir la métalloprotéase TACE qui va tronquer GP1,2 présent au niveau membranaire, pour augmenter l'excrétion de GP1,2 Δ , empêchant ainsi GP1,2 d'exercer sa cytotoxicité [67,68].

5.3. Immunogénicité

La GP1,2, seule protéine de l'enveloppe virale, s'est révélée être une protéine fortement immunogène lors des essais d'immunisation sur les petits animaux et les primates dont l'homme, avec production massive d'anticorps neutralisants, constituant ainsi un antigène de choix pour la vaccination. Néanmoins, les épitopes fortement immunogènes sont situés sur le domaine de type mucine, dont la lourde glycosylation empêche l'accès aux anticorps neutralisants [69-71].

5.4. Inhibition du système immunitaire

La GP1,2, par son domaine de type mucine, va perturber le processus de reconnaissance d'antigène et d'activation du système immunitaire, par inhibition du trafic cellulaire permettant l'acheminement de l'antigène à la surface de la cellule, et par inhibition de l'expression cellulaire du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH-1) impliqué dans la présentation de l'antigène au système immunitaire [66,72].

La GP transmembranaire possède une séquence semblable à la séquence immunosuppressive retrouvée chez les rétrovirus oncogènes qui va inhiber *in vitro* la prolifération des lymphocytes et des cellules mononuclées ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires [73].

6. Implication de la sGP dans la pathogénèse du virus Ebola

6.1. Modulation de la réponse immunitaire spécifique

▪ Détournement des anticorps neutralisants

La sGP et la GP1,2 qui partagent la même partie N terminale, possèdent ainsi des épitopes communs, conduisant à une réaction croisée des anticorps circulants neutralisant la GP virale. Du fait de la synthèse en grande quantité de la sGP comparé à la GP1,2, elle sera rapidement sécrétée dans la circulation générale, et va ainsi absorber une grande partie des anticorps neutralisants, empêchant la clairance des virions infectieux. Ainsi, la protéine sGP est capable d'inhiber l'activité de neutralisation spécifique du virus Ebola par un sérum de survivant. La GP1,2 Δ possède également cette fonction de leurre des anticorps [74].

▪ **Subversion de la réponse humorale**

Des études récentes évoquent le rôle de sGP dans la subversion antigénique. En effet, la sGP présente en grande quantité dans le sang va être reconnue préférentiellement par le système immunitaire, biaisant la réponse humorale, par multiplication massive des lymphocytes B producteurs d'anticorps reconnaissant des épitopes spécifiques à sGP ou partagés entre sGP et GP1,2, diminuant ainsi la production d'anticorps neutralisants spécifiquement GP1,2. De même, chez les personnes vaccinées avec GP1,2, le contact ultérieur avec le virus Ebola qui produit la sGP, peut rediriger la réponse immunitaire vers des épitopes partagés entre sGP et GP1,2 d'où la nécessité d'obtenir une forte réponse immunitaire vaccinale permettant d'éliminer le virus rapidement [75,76].

6.2. Contrôle de la cytotoxicité induite par GP1,2

La sGP pourrait également avoir un rôle dans la diminution de la cytotoxicité engendrée par GP1,2. En effet, tandis que la GP1,2 est cytotoxique sur les cellules endothéliales, augmentant ainsi la perméabilité vasculaire, l'administration de la sGP va restaurer la fonction barrière des cellules endothéliales et aurait également un rôle anti-inflammatoire [77].

La sGP aurait également un rôle structural, remplaçant la sous unité GP1 en s'assemblant avec GP2, ce qui pourrait réduire la cytotoxicité du fait de l'absence du domaine de type mucine de GP1 cytotoxique [78].

6.3. Autres rôles présumés non établis

Des études avaient mentionné l'inactivation des neutrophiles par fixation de sGP au récepteur CD16b appartenant à la famille des récepteurs FcγRIII. Or, il s'est avéré que l'étude était biaisée et que la liaison au récepteur FcγRIII du neutrophile était due à la portion Fc de l'anticorps anti-sGP présent dans l'étude, puisque l'utilisation de fragments Fab n'a pas retrouvé cette liaison sGP-neutrophiles [79].

Une hypothèse a été soulevée, sur le rôle possible de sGP dans l'apoptose des lymphocytes B et T, du fait de la présence de sGP en grande quantité dans le sang et de l'absence d'infection des cellules lymphocytaires par le virus Ebola. Il s'est avéré que la sGP n'induisait pas d'apoptose par la voie extrinsèque, et il n'existe pas de preuve à ce jour de son implication dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose [80].

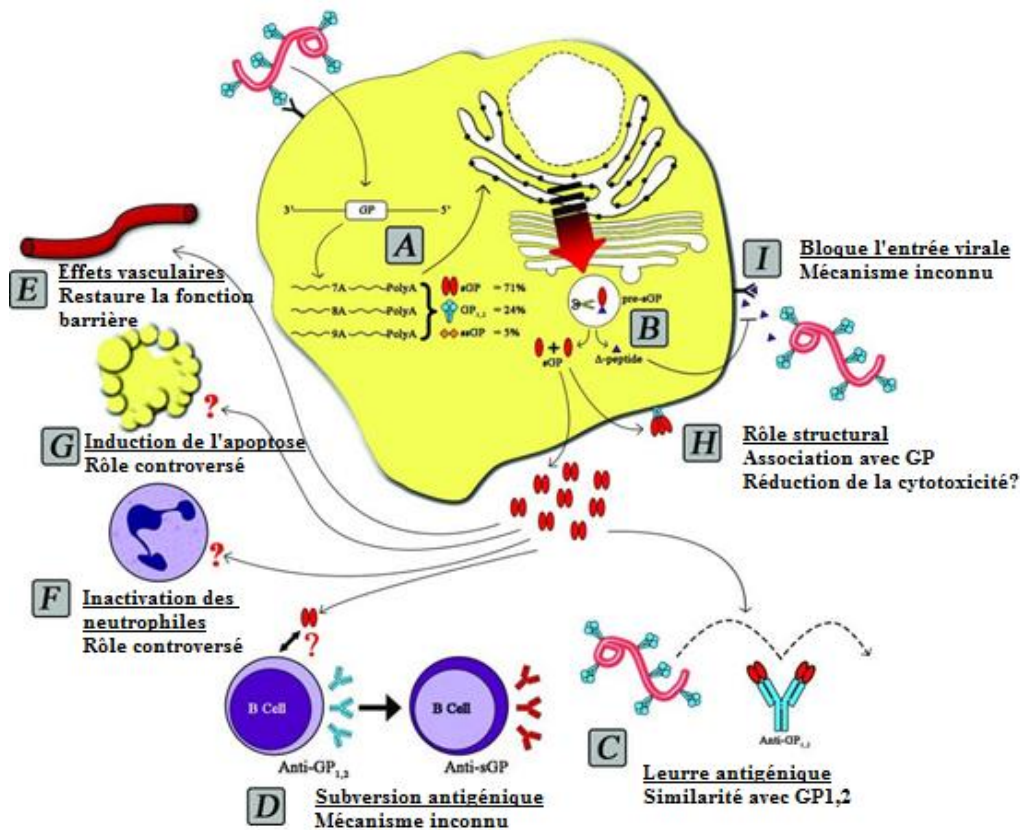


Figure 9. Les multiples rôles de la glycoprotéine soluble. La transcription du gène de la GP conduit majoritairement à la production de sGP (A). Une protéase de type furine va cliver la pré-sGP (B) produisant ainsi la sGP et le peptide Δ qui va bloquer l'entrée du virus Ebola dans la cellule (I). La sGP va s'assembler en homodimères qui sont rapidement sécrétés dans la circulation générale. Le rôle de la sGP comme antigène leurre pour les anticorps neutralisants (C) et son implication dans la subversion antigénique (D) sont bien établis. Son rôle dans l'inactivation des neutrophiles (F) et l'induction de l'apoptose (G) est controversé. L'assemblage de sGP avec la GP2 induit probablement une diminution de la cytotoxicité virale (H) (*D'après de la Vega et al.*) [76].

7. Pathogénicité des différentes espèces du virus Ebola

7.1. Taux de mortalité

Seules trois espèces, EBOV, SUDV et BDBV sont responsables d'épidémies humaines en Afrique. Les souches EBOV et SUDV sont les plus meurtrières, avec des taux de mortalité qui sont respectivement de 79 % et de 63%. La première infection à EBOV en 1976 présentait un taux de mortalité plus élevé, de 88%, du fait de la réutilisation d'aiguilles contaminées, diffusant l'infection qui était plus grave car la contamination se faisait par voie parentérale. La souche BDBV est peu agressive avec un taux de létalité moyen de 38%. RESTV fortement mortel chez le singe, est non pathogène chez l'homme, l'infection étant asymptomatique. La souche TAFV n'a infecté qu'une seule personne, et n'a pas entraîné de décès. Elle fut

responsable d'épidémies de fièvre hémorragique chez le chimpanzé en Côte d'Ivoire, avec un taux de mortalité de 25% [26,81].

Taux de mortalité des différentes espèces du virus Ebola chez l'homme				
Ebola Zaïre	Ebola Soudan	Ebola Bundibugyo	Ebola Foret de Taï	Ebola Reston
79%	63%	38%	0%	0%

Tableau 3. Comparaison des taux de mortalité entre les différentes espèces du virus Ebola [81].

Il est difficile de comparer les variations des taux de mortalité entre les différentes espèces virales, étant donné les régions et contextes différents des épidémies successives. Les différents degrés de pathogénicité constatés entre les différentes souches virales dépendent des mutations présentes sur les sept gènes codant pour les protéines virales. Il est clair que des mutations du gène de la GP, qui est responsable en grande partie de la cytotoxicité et de la virulence du virus Ebola, induisent des différences de pathogénicité, bien que non suffisantes pour expliquer les différences entre EBOV et RESTV. Des mutations des gènes codant pour VP24 et VP35 qui induisent une immunosuppression par inhibition de la réponse à l'interféron, vont également faire varier le taux de mortalité. De même, chez le cobaye, une mutation au niveau du gène de la protéine VP24 de la souche d'Ebola sauvage non pathogène chez le cobaye a montré une virulence accrue, malgré un même niveau d'inhibition de la réponse à l'interféron que la souche adaptée au cobaye, ce qui laisse supposer que VP24 pourrait être impliquée dans le passage de la barrière d'espèce [82-84].

7.2. Contagiosité du virus Ebola

La pathogénicité du virus Ebola est limitée par sa faible contagiosité. Les estimations du taux de reproduction de base (R_0) du virus Ebola au cours de l'épidémie de 2014-2015, qui correspond au « nombre moyen de cas secondaires générés par une personne durant la période où elle est infectieuse » a montré un R_0 moyen de 1,51 pour la Guinée, 2,53 pour la Sierra Leone et 1,59 pour le Libéria. Si on compare au R_0 de la rougeole, qui est de 18, le virus Ebola est considéré comme peu contagieux, du fait de sa transmission uniquement par contact, et non par voie aérienne, et de l'absence de contagiosité en période d'incubation, permettant la mise en quarantaine des cas contacts à une personne malade, avant qu'ils ne soient eux-mêmes contagieux [85].

PARTIE 3 : CYCLE DE REPLICATION VIRALE

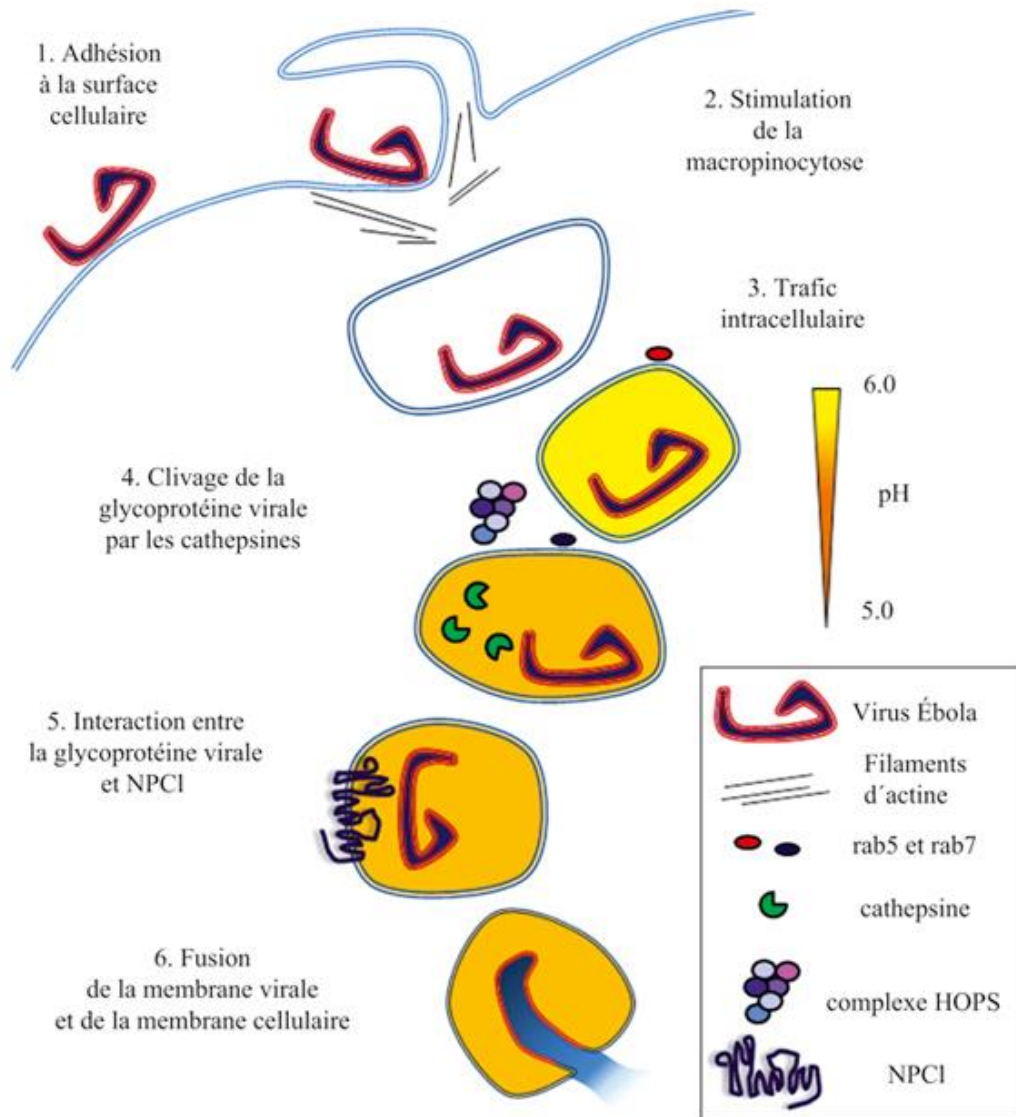


Figure 10. Etapes de l'infection de la cellule hôte par le virus Ebola. La glycoprotéine virale est une protéine-clé intervenant à chaque étape de l'infection cellulaire. Elle va permettre l'adhésion à la cellule, l'internalisation du virus Ebola et sa liaison au récepteur intracellulaire Niemann Pick C1 va catalyser la fusion des membranes cellulaire et virale. (D'après Côté et al.) [86].

Du fait de la dangerosité du virus Ebola pour l'homme, sa manipulation ne peut se faire que dans des laboratoires de niveau de biosécurité 4. La plupart des études de pathogénicité ont été effectuées en utilisant des virus pseudotypés exprimant les protéines d'enveloppe du virus Ebola ou par transfection de gènes viraux d'intérêt dans des cellules *in vitro*, permettant d'étudier les interactions des protéines virales avec la cellule hôte [87].

1. Entrée dans la cellule hôte

1.1. Adhésion cellulaire

L'utilisation de particules pseudo-virales exprimant la GP transmembranaire, seule protéine présente sur l'enveloppe virale ayant vraisemblablement un rôle dans l'entrée du virion, a démontré le large tropisme cellulaire du virus Ebola qui peut ainsi infecter, entre autres, les cellules de la lignée monocyttaire, les cellules endothéliales, épithéliales et les hépatocytes. En revanche, les lymphocytes ne sont pas des cellules permissives pour le virus [74,88].

Contrairement à la plupart des virus enveloppés, les résidus aminoacides de la GP du virus Ebola n'interagissent pas avec un récepteur membranaire spécifique de la cellule hôte [57]. Le virus va se lier à sa cellule cible à travers 2 types de liaison relativement peu spécifiques :

- Les glycanes de la GP virale vont interagir avec des lectines de type C
Exemples de récepteurs lectines de type C : DC-SIGN retrouvés sur les cellules dendritiques, DC-SIGNR sur les cellules endothéliales, L-SIGN dans le foie et les ganglions lymphatiques, hMGL sur les macrophages.

Des modifications de glycosylation de la GP virale modifieraient l'affinité pour certains récepteurs, le domaine de type mucine se révélant nécessaire à la liaison avec le récepteur lectine [89].

- Les phosphatidylsérines de l'enveloppe virale vont interagir avec différents récepteurs.
Exemples de récepteurs à la phosphatidylsérine : T-cell Immunoglobulin and mucin domain TIM-1 et TIM-4, complexe protéique composé de Gas 6 ou protéine S et de la famille des récepteurs tyrosine kinase TAM (Tyro3, Axl et Mer).

Cette interaction entre les phosphatidylsérines de l'enveloppe virale et leur récepteur est d'ailleurs retrouvée chez de nombreux virus enveloppés [90].

De plus, le récepteur α du folate est un co-facteur important mais non nécessaire à l'entrée virale [91].

Ainsi, le large tropisme cellulaire du virus Ebola peut s'expliquer par sa capacité à se lier à différents types de récepteurs présents sur les lignées cellulaires à infecter, par liaison à sa GP, aux phosphatidylsérines de l'enveloppe virale ou aux deux. La liaison de la GP virale à son récepteur membranaire n'activera pas cette dernière, mais va activer le récepteur de type

lectine qui va déclencher une cascade de signalisation intracellulaire conduisant au processus d'endocytose.

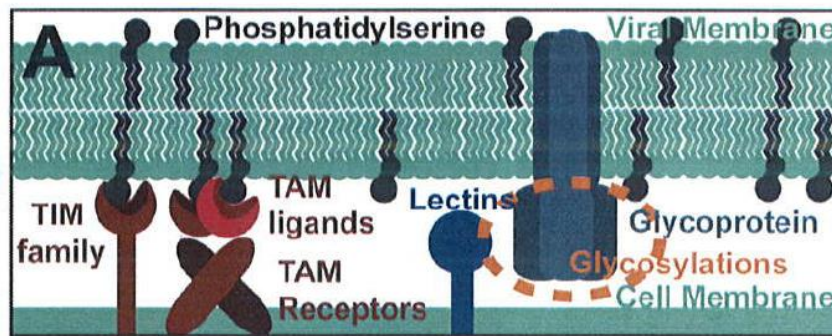


Figure 11. Adhésion du virus Ebola à la cellule cible. Liaisons aspécifiques des glycanes de la GP virale avec les récepteurs membranaires de type lectine et des phosphatidylsérines de l'enveloppe virale au récepteur TIM ou aux récepteurs tyrosine kinase TAM. (D'après Moller-Tank et Maury) [57]

1.2. Endocytose

Les deux mécanismes d'endocytose spécifiques les plus employés par les virus sont les vésicules tapissées de clathrines et l'endocytose dépendant de la cavéoline. Malgré que certaines études utilisant les virus pseudotypés exprimant la glycoprotéine virale aient mentionné des voies d'internalisation utilisant des vésicules tapissées de clathrine ou de cavéoline [92,93], la voie principale d'internalisation du virus Ebola est la macropinocytose avec formation de vésicules de 200 à 10 000 nm, compatible avec la taille de l'ordre du micromètre des virions. L'utilisation d'une voie par rapport aux autres dépend de la taille des particules et des récepteurs présents sur la cellule hôte [94,95].

Contrairement au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) exprimant sa GP native qui lie spécifiquement le récepteur LDL cholestérol permettant l'entrée cellulaire par endocytose par manteau de clathrine, le VSV recombinant exprimant la GP du virus Ebola n'interagit pas fortement avec un récepteur cellulaire spécifique, déclenchant ainsi l'internalisation par le mécanisme aspécifique de la macropinocytose.

La macropinocytose est un moyen d'internalisation qui doit être stimulé par la cellule cible (sauf dans les cellules dendritiques ou elle est constitutive). La liaison de la GP virale à son récepteur membranaire va activer la voie de signalisation PI3 Kinase, stimulant la macropinocytose par mobilisation du cytosquelette d'actine. Des inhibiteurs de cette voie de signalisation empêcheraient ainsi l'infection cellulaire par le virus. La présence du récepteur protéine kinase Axl sur la cellule cible, qui agirait comme un co-récepteur, en se liant aux

phosphatidylsérines de l'enveloppe viral favoriserait le mécanisme de macropinocytose augmentant ainsi l'infectivité [96-97].

Il existe également un mécanisme d'internalisation résultant de l'interaction de TIM-1 avec les phosphatidylsérines de l'enveloppe virale, indépendamment de la présence de la GP virale, par mimétisme apoptotique [98].

1.3. Trafic intracellulaire

La particule filovirale internalisée doit ensuite être acheminée jusqu'au compartiment cellulaire où se situe le matériel et l'environnement nécessaires à l'activation de la GP virale. Pour cela, la particule virale va transiter à travers le système de trafic vésiculaire de la cellule. Le transport du virus Ebola au sein des vésicules d'endosomes va nécessiter la présence de petites protéines GTPases, dénommées Rab5 et Rab7 qui en fonction de leur association au GTP ou GDP vont réguler le transport vésiculaire. La régulation des Rab se fait grâce aux *Guanine Exchange factor (GEG)* et *GTPases Activating Proteins (GAP)*. La maturation de l'endosome précoce s'effectue lors de la substitution de la protéine Rab5 associée à cette vésicule par la protéine Rab7 permettant la transformation en endosome tardif.

Le virus Ebola contrairement au virus Marburg nécessite un complexe protéique formé de différentes sous-unités nommé HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*), pour réguler la fusion des membranes au niveau du lysosome. En fait, le complexe HOPS va interagir avec les protéines Rab, régulant la transition des endosomes et avec les protéines SNARE responsables de la fusion des vésicules [95].

Ce transit intracellulaire a pour objectif d'accéder à des compartiments contenant deux facteurs cellulaires essentiels pour la fusion de la membrane des *Filovirus* avec celle de l'hôte, les cathepsines et la protéine Niemann-Pick C1.

1.4. Activation de la glycoprotéine virale

La particularité de la GP du virus Ebola est que sa maturation par clivage, libérant le peptide de fusion, n'a pas lieu par les protéases furine lors de la synthèse de nouveaux virions par la cellule-hôte, mais par des protéases endosomales après l'entrée cellulaire du virus. En effet, la libération du peptide de fusion ne sert pas à l'interaction avec la cellule-hôte puisque l'entrée se fait par endocytose aspécifique, ne nécessitant pas l'activation de la GP virale. Cette activation a lieu au niveau du lysosome afin d'assurer la fusion membranaire.

Une fois le virus internalisé et acheminé au compartiment cible, le clivage de la GP virale s'effectue par des protéases endosomales qui agissent à pH acide, en particulier les cathepsines B et L. La cathepsine B a un rôle essentiel, tandis que la cathepsine L est accessoire mais son activité augmente l'infection cellulaire. Des études ont montré que des thermolysines bactériennes et des protéases présentes dans les cellules VeroE6 peuvent se substituer à ces cathepsines. Les protéases vont cliver les régions variables de GP1 (domaine de type mucine et coiffe de glycosylation) découvrant ainsi le domaine N terminal de GP1 lié à GP2 par un pont disulfure [99-101].

1.5. Fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire

La libération du domaine N terminal du fragment GP1 expose une région se liant spécifiquement à une protéine lysosomale, le récepteur Niemann-Pick C1 (NPC1), dont le rôle physiologique est d'assurer le transport du cholestérol dérivé des LDL, des lysosomes au compartiment intracellulaire [102].

Cette liaison de GP1 à NPC1 est essentielle à la fusion de la membrane des *Filovirus* avec celle de la cellule cible puisque des études ont montré que l'absence de NPC1 conférait une résistance des cellules à l'infection par les *Filovirus*. L'expression de cette protéine est nécessaire, qu'elle soit fonctionnelle ou non. L'utilisation d'antagonistes spécifiques de ce récepteur n'interférant pas avec la fonction essentielle de transport du cholestérol de NPC1 semble être une piste thérapeutique intéressante. Une étude récente a montré que le virus Lassa possédait un mécanisme similaire de fusion virale grâce à l'existence d'un récepteur lysosomal spécifique LAMP1 liant la GP1 virale à pH acide [103,104].

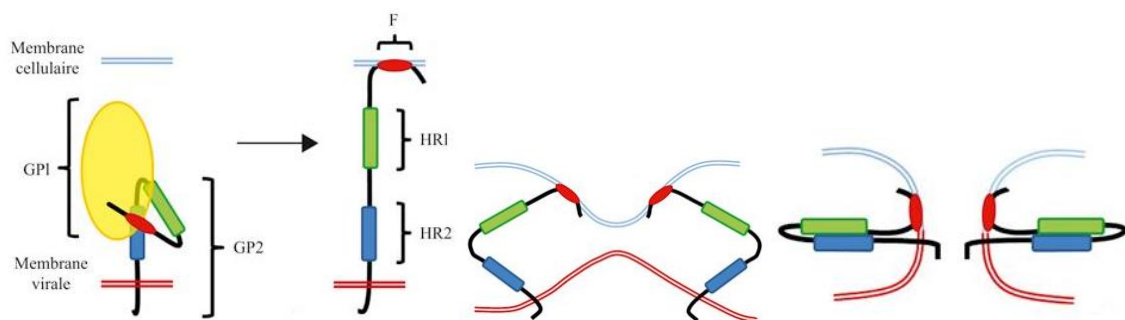


Figure 12. Le mécanisme de fusion membranaire. L'activation de GP1 par sa liaison au récepteur NPC1 va permettre le relâchement du peptide de fusion présent sur GP2 qui va s'insérer dans la membrane de l'hôte. La forte interaction entre les séquences peptidiques HR1 et HR2 va permettre le repli de GP2, conduisant ainsi à la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte (D'après Côté et al) [86].

Une fois GP1 activé par sa liaison à NPC1, elle ne restreint plus la sous unité GP2 qui étend sa boucle hydrophobe, insérant son peptide de fusion dans la membrane cellulaire. Le changement conformationnel de GP2 en milieu acide, d'une forme métastable à une forme stable de basse énergie par relâchement du peptide de fusion va libérer l'énergie nécessaire à la fusion des membranes. GP2 va ensuite se replier adoptant une conformation à six hélices, permettant la fusion des membranes, libérant la particule virale dans le cytoplasme [105].

2. Transcription et réplication

La transcription et la réplication du virus Ebola ont lieu dans le cytoplasme, après libération du génome viral. La transcription est médiée par le complexe VP30-VP35-polymérase virale. L'ARN polymérase ARN dépendante va synthétiser un ARN messager de polarité positive complémentaire du brin d'ARN viral, qui sera ensuite traduit en protéines virales. La phosphorylation de VP30 va entraîner sa dissociation du complexe, signal de la réplication de l'ARN viral négatif, qui sera de nouveau incorporé dans les virions infectieux [106].

3. Assemblage et libération du virion infectieux

Initialement décrit sur la protéine structurale Gag du VIH, des motifs peptidiques conservés ont été retrouvés chez la majorité des virus enveloppés. Ces séquences sont nommées les domaines tardifs ou L domaine (*late domain*), du fait de leur implication dans la phase tardive du bourgeonnement viral. Ces motifs sont normalement impliqués dans les interactions entre les protéines cellulaires, démontrant ainsi que les protéines virales par l'intermédiaire de ce domaine L peuvent interagir avec les protéines de l'hôte afin de détourner la machinerie cellulaire pour assembler les virions infectieux et permettre leur bourgeonnement. Ainsi, l'assemblage et la libération du virus Ebola à partir de la membrane plasmique requiert une interaction entre les protéines du virus et de la cellule hôte [107,108].

Lors de l'assemblage, la polymérase est associée au complexe ribonucléoprotéique grâce à son interaction avec VP35. La nucléoprotéine va servir de noyau pour l'assemblage de la nucléocapside, nécessitant les protéines VP35 et VP24. La protéine de matrice VP40 a un rôle majeur dans l'assemblage et la libération du virus Ebola, car son expression *in vitro* dans des cellules de mammifères entraîne la libération de particules pseudo-virales filamenteuses. Elle va interagir avec la nucléocapside afin de l'acheminer à la membrane plasmique, et permettre son incorporation au sein du virion infectieux [109,110].

Après synthèse de la protéine VP40 monomérique, cette dernière va exploiter la voie de transport rétrograde puis va cibler les radeaux lipidiques de la membrane plasmique qui vont servir de plateformes pour l'assemblage des virions. L'interaction électrostatique entre l'extrémité C terminale cationique des dimères de VP40 aux phosphatidylsérines anioniques de la membrane cellulaire va permettre un changement de conformation de VP40, qui forme un hexamère ou un octamère, lorsqu'elle est liée à de l'ARN. L'oligomérisation de VP40 va permettre l'insertion de la boucle hydrophobe, présente sur son extrémité C terminale, dans la membrane cellulaire, permettant ainsi l'ancrage de VP40, facilitant la libération future du virion. L'assemblage de plusieurs hexamères de VP40 conduit à la formation de particules pseudo-virales filamenteuses, apportant la force motrice nécessaire pour la courbure de la membrane plasmique nécessaire au bourgeonnement viral, avec l'aide des protéines de l'hôte [111,112].

La protéine VP40 contient deux domaines L constitués des motifs peptidiques PTAP et PPPEY, permettant le recrutement des protéines de l'hôte, indispensables à l'assemblage et au bourgeonnement viral. Le motif PTAP va lier la protéine Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*), sous-unité du complexe protéique ESCRT1 (*endosomal sorting complex required for transport*) impliqué dans le tri des protéines de la cellule hôte. La liaison à Tsg101 va permettre l'assemblage du complexe ESCRT1 au site de bourgeonnement cellulaire puis la formation du complexe ESCRT2 et enfin ESCRT3 contenant la protéine ATPase Vps4 nécessaire au désassemblage d'ESCRT3, permettant son utilisation pour la libération d'autres virions. Des mutants d'ESCRT3 et Vps4 entraînent l'arrêt du bourgeonnement viral à un stade tardif. Le second motif PPPEY du domaine L du virus Ebola va lier une ubiquitine ligase Nedd4, nécessitant l'oligomérisation de VP40. Ainsi le virus Ebola, comme la plupart des virus enveloppés, va recruter des facteurs cellulaires qui agissent normalement dans la formation de corps multivésiculaires à partir du lysosome. Ces protéines cellulaires vont aider à initier le processus d'assemblage des virions médié par la protéine VP40, par ubiquitinylation de cette dernière, processus permettant d'initier le bourgeonnement à partir de la membrane plasmique. Puis, le recrutement des complexes ESCRT notamment ESCRT3 et Vps4 qui sont nécessaires à la dernière étape du bourgeonnement viral, permet le relâchement du virus à partir de la membrane plasmique. Ainsi, la machinerie cellulaire de tri protéique serait donc impliquée dans le bourgeonnement et la libération du virus Ebola, nécessitant la présence d'actine pour les mouvements cellulaires [113,114].

PARTIE 4 : EPIDEMIOLOGIE ET CYCLE DE TRANSMISSION VIRALE

1. Aire de répartition géographique de la maladie à virus Ebola

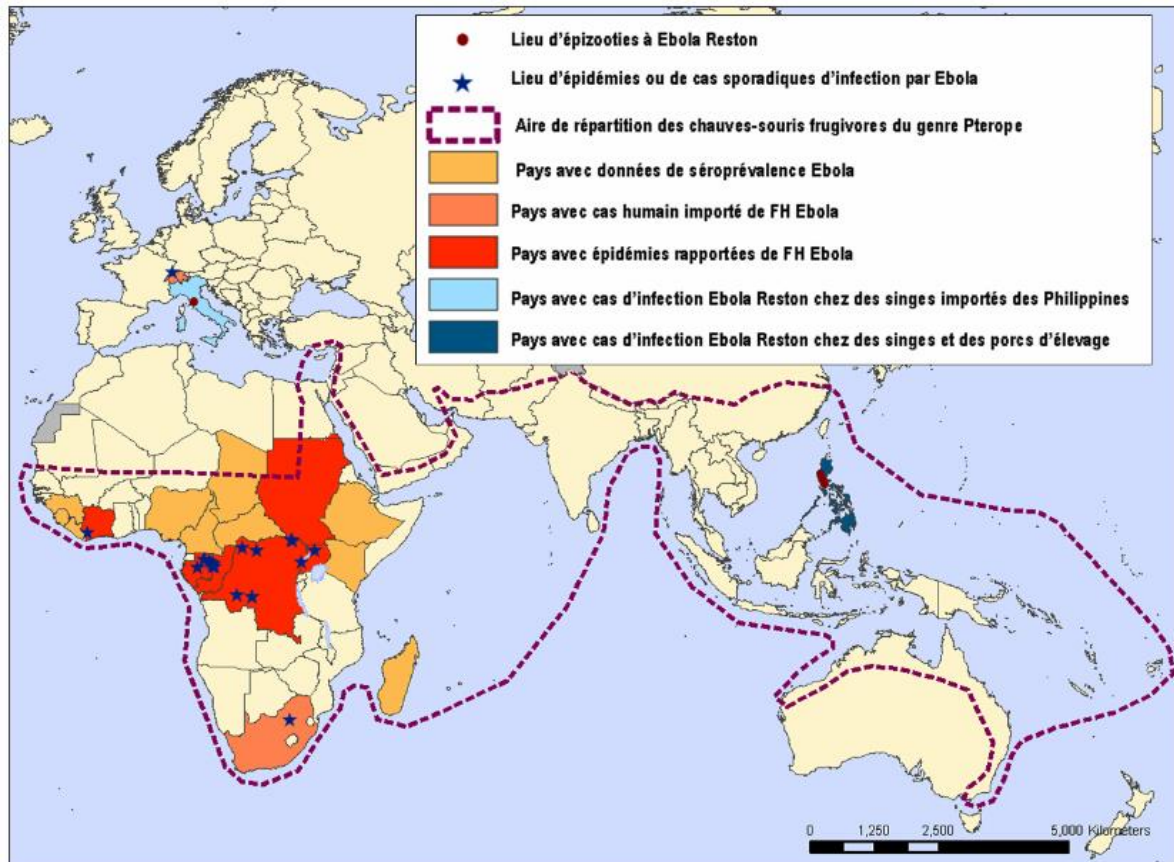


Figure 13. Répartition géographique des épidémies de maladie à virus Ebola humaines et animales ainsi que de la séroprévalence dans la population. (D'après l'OMS, 2007) [115].

Sur cette carte, on peut voir que les épidémies à virus Ebola chez l'homme sont concentrées en Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest, avec comme épicode les villages ruraux situées à la lisière de la forêt tropicale dense et humide, comme la forêt du Bassin du Congo ou la forêt de Tai en Côte d'Ivoire, véritable niche écologique du virus Ebola. De plus, dans de nombreux pays de cette région africaine, il existe une preuve sérologique de circulation de ce virus dans la population. L'espèce Ebolavirus Reston est la seule souche d'origine asiatique, retrouvée aux Philippines, où elle est responsable d'épidémies chez le singe et le porc d'élevage [24]. L'aire de répartition géographique du virus Ebola semble être comprise entre les 5^{ème}s parallèles Nord et Sud situés de part et d'autre de l'équateur. Néanmoins, la découverte récente du génome d'un *Filovirus* chez des chauves-souris, en Europe, pourrait laisser supposer que cette famille virale a une répartition géographique beaucoup plus vaste que celle révélée par la présence des épidémies, circulant « silencieusement » au sein de son espèce réservoir. De plus, on peut voir que la répartition

géographique des épidémies à virus Ebola chez l'homme et l'animal est corrélée à l'aire de répartition des chauves-souris frugivores, corroborant ainsi l'hypothèse qu'elles constituent le réservoir naturel du virus Ebola et la source de contamination animale et humaine.

2. Espèce réservoir du virus Ebola

Les chauves-souris frugivores de la famille des *Pteropodidae* seraient les hôtes naturels du virus Ebola. En effet, en étudiant des milliers de petits vertébrés sains capturés près de carcasses de primates infectés, les chercheurs ont isolé des anticorps spécifiques IgG dirigés contre EBOV et des fragments du génome viral dans le foie et la rate de trois espèces de chauve-souris frugivores. Pour autant, la présence du virus Ebola vivant répliquatif n'a jamais été retrouvée chez les chauves-souris, contrairement au virus Marburg [5]. De même, l'espèce Roussette d'Égypte a été identifiée comme étant le réservoir naturel du virus Marburg [116,117]. Le séquençage des fragments génomiques montre une grande stabilité du virus Ebola, suggérant une faible multiplication virale au sein de l'hôte réservoir sans véritable pression de sélection [118]. Les chauves-souris sont des animaux qui hébergent de nombreux virus, tels que les *Rhabdovirus* ou *Paramyxovirus*, sans développer les symptômes de la maladie, car ces espèces ont co-évolué depuis des millions d'années avec ces virus, permettant une adaptation complète de ces derniers à leur hôte. Elles sont porteuses saines du virus Ebola, ne présentant ainsi pas de signes évolutifs de la maladie. Elles ont donc un rôle majeur dans la persistance du virus dans l'environnement. La baisse de la population de ces chauves-souris en Afrique ces dernières années a réduit la capacité d'hébergement du virus Ebola, qui a ainsi subi un goulot d'étranglement génétique, réduisant la diversité génétique virale [119].

Les grands singes ne constituent pas le réservoir naturel du virus, ce sont des hôtes accidentels, qui au contact du virus Ebola, développent la maladie et décèdent en quelques jours.

3. Hôtes intermédiaires

De même, des séquences génomiques du virus Ebola ont été isolées dans des organes de plusieurs espèces de rongeurs et petits mammifères, avec absence de répllication virale et d'anticorps spécifiques, évoquant un cycle incomplet de répllication virale. Ces espèces seraient vraisemblablement des hôtes intermédiaires du cycle du virus Ebola [120]. Les séquences virales se sont intégrées dans le génome de l'hôte, ce qui est plutôt rare pour les

virus de mammifères non rétroviraux, leur réplication n'étant pas nucléaire et ceux-ci nécessitent la cooptation de la reverse transcriptase endogène pour former des transcrits d'ADN viraux [121]. Ceci souligne ainsi la coévolution de ces petits mammifères avec le virus sur une longue période, de plusieurs millions d'années [122].

4. Transmission virale de l'espèce réservoir aux animaux de brousse

Les chauves-souris sont des vecteurs de la maladie Ebola et sont sources d'épizooties, contaminant différentes espèces au régime frugivore, comme les grands singes ou les antilopes. Il y a un pic de mortalité chez les grands singes à la fin de la saison sèche, où les ressources se raréfient, et où les chauves-souris et autres espèces frugivores entreraient en compétition pour manger les mêmes fruits, occasionnant des rapprochements entre les deux espèces. La saison sèche est aussi la période des mises bas de chauve-souris, conduisant à des changements immunitaires avec reprise de la réplication du virus Ebola et apparition d'une virémie. La contamination se ferait par consommation de fruits souillés par le sang ou les liquides placentaires de la chauve-souris lors de la mise bas [123].

Aux Philippines, en plus d'infecter le singe crabier, RESTV peut également infecter le porc de manière asymptomatique. L'étude a montré que les porcs contaminés excrétaient le virus par leur nasopharynx, ont transmis Ebola à plusieurs fermiers travaillant sur l'exploitation qui présentaient une sérologie positive, démontrant ainsi qu'une transmission du porc à l'homme est possible. Les élevages de porcs contaminés étaient situés à côté de vergers abritant de nombreuses chauves-souris, probable source de contamination virale [25]. De même, une étude chez le chien a montré une séroprévalence à virus Ebola plus élevée dans les villages africains ayant subi une épidémie (32%), comparée à ceux vivant en milieu urbain (8%). La preuve scientifique n'a pas été apportée de la possible transmission virale du chien à l'homme. Néanmoins, ils constituent un indicateur indirect de la circulation du virus Ebola [124].

5. Transmission de l'animal à l'Homme

Le virus est également zoonotique puisque l'homme est un hôte accidentel qui va être contaminé par contact avec les carcasses d'animaux infectés comme les primates, les antilopes, les porcs épics ou les petits rongeurs. Ainsi, en 1994, une ethnologue suisse a été contaminée par le virus Ebola lors de l'autopsie d'un chimpanzé, et de nombreuses épidémies

humaines ont débuté par la manipulation et le dépeçage de carcasses d'animaux retrouvés morts ou tués lors de la chasse [28].

De plus, en 2009, des chercheurs de l'IRD ont montré que les chauves-souris peuvent directement transmettre le virus Ebola à l'homme. Ainsi elles furent à l'origine de l'épidémie de 2007 en République du Congo, où la migration annuelle des chauves-souris était particulièrement massive cette année-là, constituant ainsi une importante source de nourriture pour le village où est née l'épidémie. Le patient zéro était une fillette de 4 ans dont le père vendait des chauves-souris fraîches au marché, la fillette s'étant contaminée en effectuant de longs trajets dans les bras de son père [6]. De même, des chauves-souris ont été retrouvées dans l'usine de coton de Nzara, point de départ de la première épidémie à SUDV et plusieurs cas de contaminations humaines à virus Marburg ou Ebola, par contact avec des chauves-souris ou leurs déjections dans des grottes africaines ont été rapportés.

6. Eco-épidémiologie

La perturbation de l'écosystème forestier par l'homme ces dernières années augmente le risque de contact entre le réservoir du virus et l'homme. La création de routes forestières et de villages le long de ces routes permet la pénétration de l'homme dans un écosystème fermé, où le virus circulait dans son réservoir sauvage jusque-là peu accessible. Le défrichement dû aux activités agricoles et l'exploitation forestière va dégrader le milieu forestier, conduisant à une migration de la faune aux lisières habitées, à l'origine d'un rapprochement entre les hôtes intermédiaires et l'homme. La surveillance microbiologique chez ces populations intermédiaires permet de détecter précocement de possibles épidémies animales, permettant de mettre en place des mesures de prévention adaptées afin d'éviter la transmission à l'homme [118].

7. Transmission interhumaine

Tant que les sujets infectés ne présentent pas de symptômes, ils ne sont pas contagieux. L'homme se contamine par contact direct de sa peau lésée ou d'une de ses muqueuses avec du sang, des organes, des sécrétions ou liquides biologiques (sueur, urine, salive, selles, vomissements, lait maternel et semence) de personnes ou d'animaux de brousse infectés comme les singes, les chauves-souris frugivores, les antilopes des bois ou les porcs épiques malades ou morts. L'homme peut également se contaminer par ingestion de viande de brousse crue contaminée, mais également lors de sa manipulation au cours de la chasse, son

dépeçage et sa transformation pour sa consommation. La contamination peut également être indirecte, par contact avec des surfaces ou des matériaux comme le linge de lit ou des vêtements souillés par des liquides biologiques contaminés [125].

Les rites funéraires jouent un rôle important dans la transmission du virus en Afrique. Lors des cérémonies funéraires de lavement de la dépouille, les proches sont en contact direct avec le défunt. En effet, lors de la mort d'un individu infecté, la charge virale est à son point culminant, c'est pourquoi les défunts sont fortement contagieux pour leurs proches [126].

Lors des premières épidémies à virus Ebola, la transmission était essentiellement nosocomiale, dans les établissements de soins et hôpitaux locaux, contaminant le personnel de santé, qui ne disposait pas d'équipements de protection individuelle, et les patients sains, par réutilisation d'aiguilles contaminées notamment [18,22].

La contamination se faisant par contact direct avec les liquides biologiques d'un patient infecté, la transmission sexuelle a donc été évoquée. Une étude récente chez 68 survivants du virus Ebola lors de l'épidémie de 2014-2015 en Sierra Leone a montré que le virus pouvait persister dans la semence des patients pendant 1 an. Cette transmission sexuelle a été la source de nouveaux cas d'Ebola en janvier 2016, du fait de la persistance du virus Ebola au niveau testiculaire, alors qu'on annonçait la fin de l'épidémie après l'arrêt de toutes les chaînes connues de transmission, et la fin des 42 jours correspondant au double de la durée de la période d'incubation. De même, un médecin américain ayant contracté Ebola a subi une réactivation virale plusieurs mois après sa guérison, au niveau de son œil, qui est devenu inflammatoire, sans que le virus ne soit excrété dans les larmes et les tissus extérieurs de l'œil [127-129].

Les femmes enceintes sont susceptibles de transmettre le virus au fœtus, avec risque de fausse couche spontanée ou de mort fœtal *in utero*. De même, les femmes allaitant leur enfant peuvent les contaminer, le virus pouvant être excrété dans le lait maternel.

Les moustiques ou autres insectes ne sont pas des vecteurs de la maladie à virus Ebola. Ainsi, le virus Ebola ne se réplique pas, après inoculation intrathoracique chez plusieurs arthropodes. Seules quelques espèces de mammifères comme les singes, certaines espèces de rongeurs, les chauves-souris et l'homme ont montré la capacité de devenir infectées et propager le virus Ebola [130].

Concernant la transmission par voie aérienne, lors de l'épidémie à RESTV aux Etats-Unis, un singe infecté situé dans une cage séparée, a contaminé d'autres singes sans qu'il n'y ait de contact direct entre eux, soulignant la possibilité d'une transmission aérienne d'Ebola. De même, une étude chez le primate non humain a montré une contamination des animaux après inhalation de particules aérolisées contenant le virus EBOV [131,132]. Pour autant, le virus Ebola ne serait pas contagieux par voie aérienne chez l'homme, mais uniquement par dépôt de gouttelettes chargées de virus sur une peau lésée ou des muqueuses, lors de l'éternuement notamment. Les scientifiques ont émis l'hypothèse de possibles mutations virales à l'origine d'un changement du mode de transmission virale, permettant ainsi sa transmission par voie aérienne. Du fait de la facilité d'expansion du virus dans une population par contact direct, de la stabilité virale ces dernières années avec un taux relativement constant de mutations malgré une réplication intense au cours de l'épidémie de 2014-2015, et le fait qu'il faudrait de nombreuses mutations sur une longue période pour pouvoir changer son mode de transmission, cela semble ainsi peu probable.

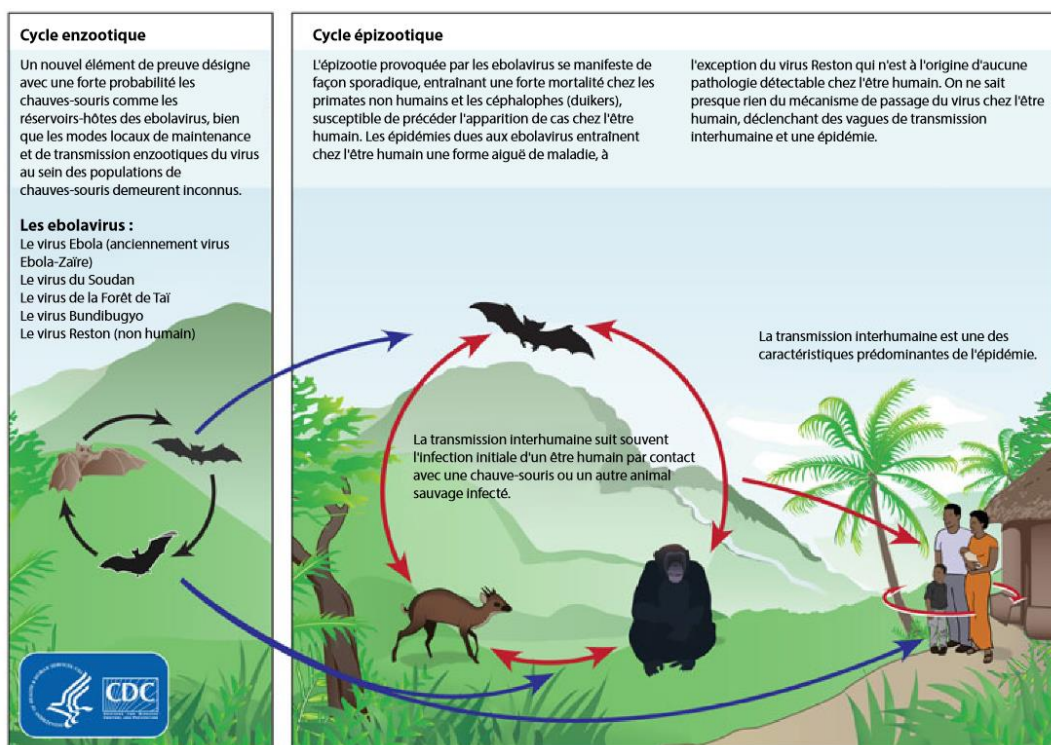


Figure 14. Le cycle naturel du virus Ebola. Au sein de sa niche écologique, la forêt tropicale africaine, le virus Ebola circulerait dans son réservoir naturel, la chauve-souris. De manière sporadique, lors de la raréfaction des ressources, ces dernières entreraient en compétition avec des animaux de brousse possédant le même régime alimentaire, à l'origine d'un rapprochement entre ces espèces, menant à la contamination. L'homme va se contaminer par contact direct avec des carcasses d'animaux de brousse retrouvées dans la forêt ou auprès de l'espèce réservoir. L'épidémie va ensuite se propager par transmission interhumaine (d'après *The Center For Disease Control*) [133].

PARTIE 5 : EVOLUTION VIRALE

1. Origine des *Filovirus*

Bien que les premiers cas d'infection à *Filovirus* aient été découverts récemment, chez le primate, il y a presque 50 ans, l'analyse phylogénétique regroupant les séquences génomiques des différentes espèces des virus Ebola et Marburg semblent indiquer que ces virus circulent depuis plusieurs milliers d'années. Auparavant, on pensait que les *Filovirus*, y compris le virus Lloviu découvert en 2003 et appartenant au genre *Cuevavirus*, partageaient un ancêtre commun datant de 10 000 ans environ, estimé à partir du taux de substitutions non synonymes du gène de la GP du virus Ebola et Marburg, qui est de l'ordre de $3,6 \times 10^{-5}$ par site par an (évolution 100 fois plus lente que les *Rétrovirus*) et du degré de divergence entre les deux séquences virales [134]. En 2014, une étude comparant les séquences des cinq espèces du virus Ebola, estimait l'âge de l'ancêtre commun du virus Ebola à 1257 ans. [135] Carroll *et al.* ont estimé que l'ancêtre commun des différents variants de la souche EBOV datait de 1960 ans, alors qu'il était de 1173 ans pour SUDV et 1979 ans pour RESTV [49]. Une étude récente a pourtant démontré que les *Filovirus* infectent les mammifères depuis beaucoup plus longtemps, estimant l'âge de l'ancêtre commun à 16 à 23 millions d'années. Les chercheurs ont trouvé des gènes fossiles de *Filovirus* intégrés dans l'ADN de quatre espèces de rongeurs différents. Cette insertion génétique a probablement eu lieu chez l'ancêtre commun de ces rongeurs, datant l'infection virale avant l'époque du Miocène, période à laquelle les rongeurs ont évolué en différentes espèces, vu la probabilité infinitésimale que le gène viral s'insère au même endroit chez les quatre espèces, sur des milliards de paires de base. Le matériel génétique ressemblant davantage au virus Ebola qu'au virus Marburg, cela montre que les deux lignées virales avaient déjà divergé au cours du Miocène [122].

2. Taux de mutations

Une étude conduite rétrospectivement, séquençant les 249 nucléotides de la GP virale a montré l'incroyable stabilité du virus Ebola lors de l'épidémie de 1994 au Kikwit, qui a duré 6 mois, suggérant que le virus Ebola a très peu évolué au cours des épidémies sporadiques antérieures [136]. En 2013, Carroll *et al.* ont montré en séquençant le génome entier des souches EBOV, SUDV et RESTV la relative stabilité du virus Ebola, avec respectivement 7.06×10^{-4} , 0.46×10^{-4} , and 8.21×10^{-4} substitutions par site par an, la souche SUDV ayant un taux d'évolution beaucoup plus lent, ce qui en fait la souche la plus ancienne [49].

3. Diversité génétique

Si on considère que les chauves-souris sont le réservoir naturel du virus, il est intéressant de noter qu'Ebola virus Zaïre a subi récemment un goulot d'étranglement génétique, probablement du fait de la réduction importante du nombre de chauves-souris, suite aux variations climatiques et aux activités humaines. En effet, le séquençage du gène de la polymérase d'EBOV chez ces chauves-souris montre un ancêtre commun récent. Ceci pourrait expliquer le fait que toutes les épidémies d'Ebola depuis 2001 sont dues à des virus ayant évolué à partir de cet ancêtre commun récent, *Circa*, qui date de 1999, probablement introduit par les chauves-souris.



Figure 15. Arbre phylogénétique comparant les séquences des différents Filovirus. Etablissement des relations de parenté par comparaison de trente et une séquences de génome entier de *Filovirus* grâce au logiciel Clustal Omega 1.2. (D'après de la Vega et al.) [81].

4. Pression de sélection

Bien que les ratios inférieurs à 1 d'EBOV (0,229), SUDV (0,328) et RESTV (0,329) montrent que la GP virale ne subit pas d'importantes pressions de sélection, d'autres analyses ont montré que certains acides aminés de la GP étaient sous sélection positive. On peut penser que certaines mutations au niveau de la GP, qui est impliquée dans la liaison du virus à la cellule-hôte et la fusion membranaire, a permis le passage de la barrière d'espèce des chauves-souris aux primates. L'adaptation du virus Ebola aux primates a été à l'origine de l'incroyable réduction de diversité génétique depuis 1970, seule une petite proportion de la population virale initiale a su s'adapter à son hôte, subissant des pressions de sélection extrêmes.

5. Origine et évolution du virus Ebola au cours de l'épidémie de 2014-2015

La souche guinéenne du virus Ebola responsable de l'épidémie de 2014-2015 en Afrique de l'Ouest est issue du virus Ebola Zaïre présent en Afrique centrale, qui aurait migré vers l'Ouest au cours de l'année 2004. L'épidémie est due à une transmission unique de l'animal à l'homme, ayant conduit à une propagation interhumaine. Deux lignées virales divergentes vont ensuite s'étendre de la Guinée à la Sierra Leone. Etant donné que l'épidémie en Afrique de l'Ouest, a touché un plus grand nombre de patients, sur une plus longue période, comparée aux épidémies antérieures, on peut s'attendre raisonnablement, à ce que le virus, dont l'ARN polymérase fait déjà de nombreuses erreurs de répllication, du fait de la répllication intense, subisse un plus grand nombre de mutations. Bien que l'étude menée par Gire *et al* alarmait quant à l'augmentation du taux de mutation de la souche guinéenne Makona (deux fois plus élevé par rapport au taux de mutations de base), de nombreuses études ont démenti son affirmation [137]. L'étude la plus récente, basée sur le génome entier, mentionnait un taux d'évolution de 1.23×10^{-3} , montrant une relative stabilité virale au cours de cette épidémie à grande échelle. Malgré une dispersion spatiale importante, l'évolution virale est caractérisée par une dérive génétique neutre. Bien que peu probable, l'accumulation de mutations combinée à la sélection naturelle et la dérive génétique, pourrait conduire à une transmission aéroportée du virus Ebola. De même, il est important de surveiller l'évolution virale et les mutations avec sélection positive d'épitopes cruciaux afin d'évaluer la perte possible d'efficacité des traitements expérimentaux et des tests diagnostiques basés sur le séquençage du génome viral [81].

PARTIE 6 : LA MALADIE A VIRUS EBOLA

1. Aspects cliniques de la maladie à virus Ebola

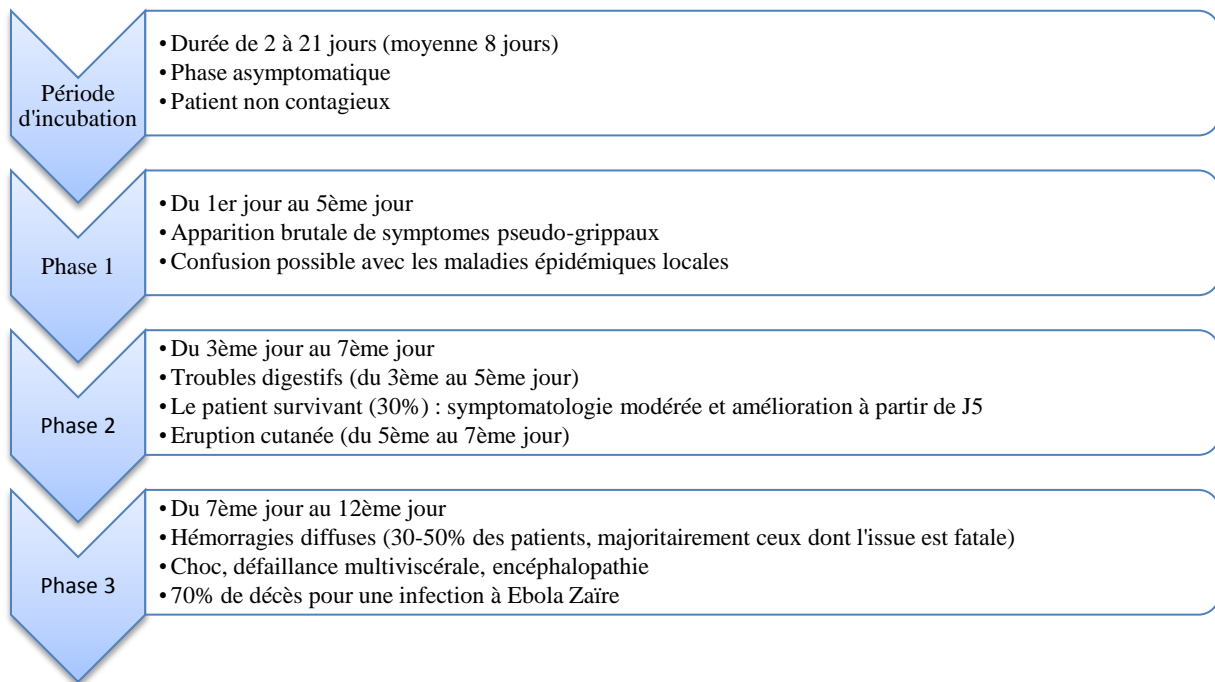


Figure 16. Les différentes phases cliniques de la maladie à virus Ebola. A partir de symptômes relativement aspécifiques, la maladie à virus Ebola se distingue des autres pathologies épidémiques présentes en Afrique, par la présence d'une éruption cutanée caractéristique fréquente et de signes hémorragiques, généralement frustes et peu fréquents. La contagiosité augmente avec la progression de la maladie et l'intensification de la réplication virale.

La période d'incubation, qui est définie comme le temps écoulé entre l'infection par le virus Ebola et l'apparition des premiers symptômes, s'échelonne entre 2 et 21 jours, variant notamment en fonction du mode de contamination par le virus Ebola (environ 6 jours par une injection contaminée, 10 à 13 jours par contact direct avec l'hôte infecté), avec une moyenne de 8 jours. Tant qu'elles ne présentent pas de symptômes, les personnes infectées n'excrètent pas le virus dans leurs fluides corporels, et ne sont donc pas contagieuses.

Au stade précoce, les signes cliniques de la maladie sont aspécifiques, d'où la difficulté de différencier la maladie à virus Ebola des autres maladies infectieuses épidémiques en Afrique (paludisme, fièvre typhoïde, choléra...). Les premiers symptômes sont de type pseudo-grippaux avec apparition brutale d'une forte fièvre, malaise, asthénie intense, myalgies, arthralgies, céphalées persistantes et parfois pharyngite accompagnée de toux.

La maladie peut progresser, avec l'apparition environ 3 à 5 jours plus tard de la deuxième phase de la maladie qui est caractérisée par des symptômes gastro-intestinaux avec une

anorexie, des douleurs abdominales, des diarrhées aqueuses profuses (jusqu'à 5 litres par jour, symptomatologie semblable au choléra) et des vomissements, pouvant mener à la déshydratation du patient. Une éruption cutanée non prurigineuse de type morbilliforme apparaît parfois aux environs du 5^{ème} au 7^{ème} jour, suivie d'un érythème violacé pouvant se généraliser à l'ensemble du corps.

Une fois la maladie installée, la coagulation intravasculaire disséminée va conduire à la formation de caillots, qui en obstruant les capillaires sanguins, vont entraîner la nécrose de nombreux organes, comme le foie, les reins, la rate ou le cerveau, aboutissant entre autres à une insuffisance rénale et hépatique, renforcées par la cytotoxicité propre du virus Ebola. Les symptômes neurologiques sont fréquents lors des infections à *Filovirus*. Le patient va être prostré, aura un comportement passif, un visage inexpressif, mais peut également devenir agité et colérique, ou présenter des troubles de la mémoire. Les premières infections à virus Marburg, du fait de la découverte de l'atteinte cérébrale lors de l'autopsie des patients décédés, étaient à tort assimilées au virus de la Rage.

La troisième phase de la maladie à partir du 6^{ème} jour, est caractérisée par la présence de signes hémorragiques généralement discrets, présents chez environ 30 à 50% des patients. Ils peuvent être frustes, comme des ecchymoses, des pétéchies, hémorragies conjonctivales, épistaxis, saignements des gencives, oraux ou vaginaux, puis ils deviennent généralisés avec principalement un méléna (appelée « diarrhée rouge » dans les pays africains), hématomène ou *vomito negro*, fortement contagieux. Au stade terminal de la maladie, l'hypotension réfractaire accompagnée de la coagulation intravasculaire disséminée aboutit à un état semblable à un choc septique, pouvant entraîner un collapsus et une défaillance multiviscérale conduisant à la mort du patient. L'atteinte cérébrale terminale peut conduire à une perte de conscience, à des crises épileptiques, puis à l'état de mort cérébral.

Les enfants présentent plus de symptômes respiratoires tels que toux ou dyspnée, ainsi que des symptômes gastro-intestinaux et moins de signes neurologiques ou de saignements.

Chez les patients survivants (environ 30% pour EBOV), les symptômes sont relativement frustes tels que fébricule, conjonctivite, céphalée, diarrhée légère, pendant plusieurs jours, puis l'amélioration de l'état général survient aux environs du 5^{ème} jour, suivie d'une phase de convalescence de 1 à 3 semaines, avec persistance d'une asthénie, anorexie, d'arthralgies et de myalgies pendant environ 6 mois. Les survivants peuvent également avoir des séquelles neurologiques, hépatiques ou oculaires.

Concernant l'épidémie en Afrique de l'Ouest, la maladie est mortelle pour environ 70% des patients, avec développement précoce de signes cliniques graves, le décès survenant généralement entre le 7^{ème} et 12^{ème} jour. Presque tous les patients survivant au 13^{ème} jour, survivront à l'infection à virus Ebola [138-140].

2. Physiopathologie

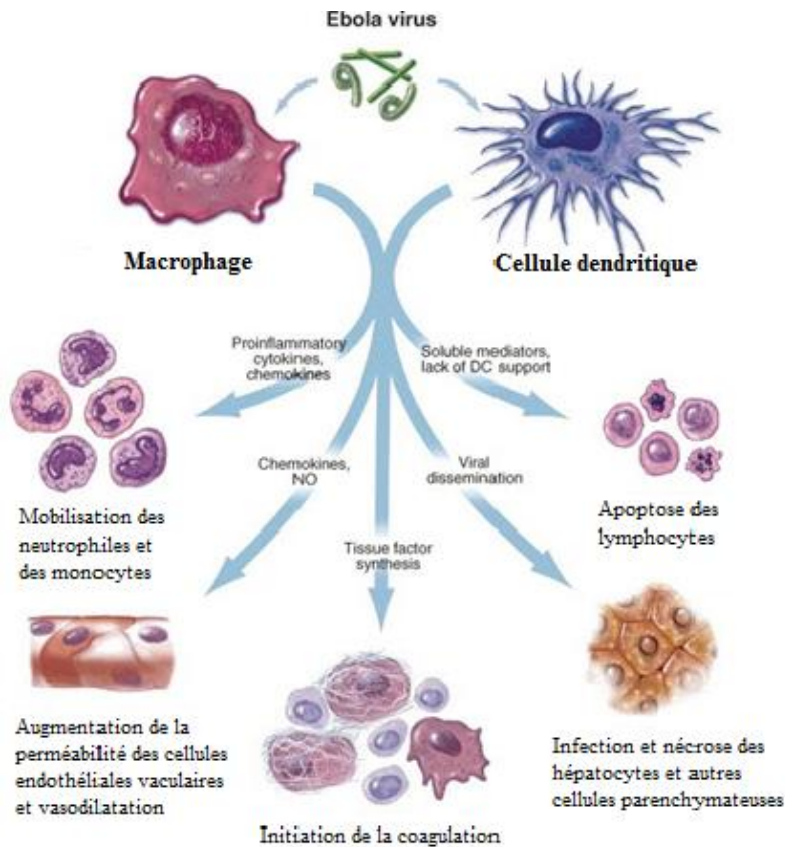


Figure 17. Rôle des macrophages et des cellules dendritiques dans la pathogénèse du virus Ebola. La pathogénicité du virus Ebola résulte de sa cytotoxicité directe sur les cellules infectées, et de sa capacité à déréguler le système immunitaire, entraînant à la fois une immunosuppression puis une réaction inflammatoire systémique incontrôlée à l'origine des symptômes cliniques graves de la maladie. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont des cibles précoces du virus, leur infection conditionnant par la suite l'évolution de la maladie. La sécrétion de chimiokines par les macrophages va permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires permettant la diffusion de l'infection par la voie lymphatique. La cellule dendritique dont la maturation est défective, n'active pas le système immunitaire adaptatif mais participe à l'apoptose des lymphocytes naïfs, conduisant à l'immunosuppression. La sécrétion d'autres médiateurs vont altérer les systèmes vasculaires et de la coagulation, qui associée à la cytotoxicité propre du virus sur de nombreux organes, conduit à la défaillance multiviscérale terminale responsable de la mort du patient. (D'après Bray et Geisbert) [141].

Les données physiopathologiques proviennent principalement de l'infection des modèles animaux de laboratoire par EBOV, des études *in vitro* dans des laboratoires de biosécurité 4 sur des cellules infectées par le *Filovirus*, ainsi que des quelques données recueillies au cours des épidémies à virus Ebola.

2.1. Entrée virale

Le virus va pénétrer dans l'organisme à travers une muqueuse, une brèche dans la peau, ou par insertion parentérale. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques (CD) et les macrophages sont les premières cibles virales, privilégiées du fait de l'expression de facteurs d'adhérence comme les récepteurs DC-SIGN ou Tyro3. La réplication précoce du virus Ebola au sein de ces cellules immunitaires va inhiber la mise en place d'une réponse immunitaire efficace, permettant la diffusion de l'infection au sein de l'organisme, déclenchant par la suite une réaction inflammatoire inappropriée, contribuant à la pathogénèse du virus Ebola [141,142].

2.2. Réponse inflammatoire dérégulée

La liaison de la GP virale aux macrophages déclenche la production massive et dérégulée de cytokines pro-inflammatoires, d'oxyde nitrique et de chimiokines qui seront responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, d'une vasodilatation et du recrutement de cellules cibles immunitaires supplémentaires, qui une fois activées, sécréteront, elles aussi des médiateurs de l'inflammation. De même, la GP1,2Δ tronquée par la métalloprotéase TACE et sécrétée par les cellules infectées peuvent activer les CPA par liaison à leur récepteur de type Toll 4 (TLR4), amplifiant la réponse inflammatoire [143].

2.3. Immunosuppression

Le virus engendre une paralysie précoce du système immunitaire inné. Ainsi, les CPA sollicitées ne pourront pas limiter la réplication virale du fait d'une inhibition de la production de l'interféron (IFN) de type I antiviral par la protéine VP35 du virus Ebola, de manière similaire à la protéine NS1 du virus Influenza. La protéine VP24 du virus Ebola, bloque quant à elle la réponse cellulaire à l'IFN dans les cellules infectées et voisines. Le virus Ebola va également déclencher l'apoptose des cellules NK (*Natural Killer*), contribuant ainsi à affaiblir de manière très efficace la mise en place de la réponse antivirale précoce. [83,84]

Le virus va également inhiber l'activation de la réponse immunitaire spécifique. Les CD infectées ne parviennent pas à subir une maturation efficace, du fait de la sécrétion inappropriée de cytokines sous l'influence des protéines virales VP35 et VP24, et par défaut de cellules NK activatrices de leur maturation. Les CD sont donc dans l'incapacité à présenter l'antigène aux lymphocytes naïfs de manière efficace, étape essentielle à l'initiation de la réponse adaptative [144,145].

Le défaut de maturation de la CD empêchant la présentation efficace de l'antigène aux lymphocytes, la sécrétion de facteurs solubles par les macrophages comme l'oxyde nitrique et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) pro-apoptotiques, ainsi que la liaison du peptide immunosuppresseur présent sur l'extrémité carboxy-terminale de la GP virale, aux lymphocytes naïfs, bien que le virus n'infecte pas ces derniers, contribueraient à déclencher une apoptose massive « spectatrice » de ces lymphocytes, renforçant ainsi l'immunosuppression. Cette lymphopénie est d'ailleurs retrouvée dans d'autres fièvres hémorragiques virales. Le virus a également développé de nombreux mécanismes afin d'échapper à la réponse humorale (cf. partie immunologie) [146,147].

2.4. Diffusion virale

Du fait de l'incapacité du système immunitaire inné à exercer son activité antivirale, par inhibition de l'IFN principalement, le virus va infecter la plupart des cellules immunitaires recrutées grâce à la sécrétion de chimiokines, lors de la réponse inflammatoire initiale. Les CD infectées survivent plus de 6 jours, permettant au virus de diffuser au sein de ces cellules immunitaires vers les ganglions lymphatiques régionaux, puis dans la circulation sanguine, pour ensuite atteindre le foie, la rate et d'autres organes. Au fur et à mesure de la diffusion virale, la réplication intense du virus Ebola va entraîner une réponse inflammatoire systémique incontrôlée, délétère pour l'hôte, contribuant à l'issue fatale de la maladie [8].

2.5. Cibles cellulaires

De nombreux virus fortement pathogènes peuvent également déclencher une tempête cytokinique, mais la gravité particulière de la maladie à virus Ebola est due au large tropisme cellulaire du virus. De nombreux types cellulaires peuvent être infectés, comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les hépatocytes, cellules corticales surrénales et les cellules épithéliales. Au stade précoce de la maladie, le virus va infecter principalement les macrophages, le foie et la rate, ceci grâce à la présence des récepteurs de type lectine présents

sur ces différents types cellulaires, augmentant ainsi l'avidité de la liaison à la GP virale. Au stade terminal de l'infection, la plupart des tissus et organes sont saturés par le virus. Une infection fatale montre de nombreuses nécroses multifocales, principalement dans des tissus comme le foie, les reins ou la rate, sites de réplication virale privilégiés, conduisant à une insuffisance fonctionnelle de ces organes [88].

2.6. Dysfonctionnement gastro-intestinal

Les troubles digestifs typiquement retrouvés lors de l'infection, peuvent conduire à une importante hypovolémie, contribuant à l'hypotension présente dans la maladie. Ils seraient dus à l'action cytotoxique du virus sur les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal ainsi qu'à l'augmentation des cytokines circulantes agressant ces cellules.

2.7. Anomalies de la coagulation

Suite à la dérégulation cytokinique, les macrophages infectés vont sécréter le facteur tissulaire qui déclenche la voie de la coagulation extrinsèque. La sécrétion incontrôlée de facteur tissulaire par les macrophages ainsi que le défaut de synthèse par le foie de la protéine C anticoagulante, par insuffisance hépatique, vont conduire à une réaction de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) qui aboutit à la formation de caillots dans de nombreux capillaires, responsables de multiples sites de nécrose au sein de différents organes [148].

2.8. Atteinte de l'intégrité vasculaire

Les cellules endothéliales sont des cibles privilégiées du virus, du fait de la présence de récepteurs DC-SIGNR liant la GP. Cette dernière exerce son effet cytotoxique sur les cellules endothéliales, déclenchant l'arrondissement de ces cellules et leur détachement par réduction des intégrines, molécules nécessaires à l'adhésion des cellules entre elles et permettant l'intégrité de la barrière vasculaire. L'action synergique des cytokines pro-inflammatoires, comme l'oxyde nitrique ou le TNF- α agissant sur la perméabilité, l'intégrité vasculaire et de l'action cytotoxique directe du virus Ebola vont induire la perte de la fonction barrière des cellules endothéliales. Cette atteinte vasculaire, avec la consommation importante de thrombine par la CIVD, ainsi que le défaut de synthèse de facteurs de la coagulation, du fait de la nécrose des hépatocytes par le virus, vont être responsables des signes hémorragiques caractéristiques de la maladie. Pour autant, lors d'autopsies de patients décédés d'Ebola, l'atteinte vasculaire n'a pas été retrouvée. De même, chez le primate, l'infection des cellules endothéliales par le virus Ebola était rare, limitée aux stades terminaux de la maladie. La

CIVD conjuguée au défaut de synthèse hépatique des facteurs de la coagulation auraient ainsi un rôle prédominant dans l'apparition des symptômes hémorragiques [63, 149]

2.9. Hypotension et défaillance multiviscérale

Du fait de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'atteinte infectieuse du rein et de la corticosurrénale, ne permettant plus la synthèse d'aldostérone et d'autres molécules chimiques nécessaires au maintien d'une tension artérielle normale lors d'une perte hydrique importante, la tension artérielle va brusquement chuter au stade terminal de l'infection, ce qui peut entraîner un choc semblable à un choc septique, à l'origine d'un collapsus vasculaire et d'une défaillance multiviscérale responsable de la mort du patient.

3. Diagnostic de la maladie à virus Ebola

3.1. Quelle méthode de diagnostic utiliser ?

Puisque les symptômes précoces de la maladie à virus Ebola sont relativement aspécifiques, il est important d'éliminer une autre étiologie par l'établissement d'un diagnostic précis, afin de mettre rapidement en place des soins de support et d'isoler le patient pour éviter la création de multiples chaînes de transmission.

Période de l'infection	Tests de diagnostic possibles
Quelques jours après l'apparition des symptômes	Tests primaires : Réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR), test ELISA de capture d'antigène, IgM ELISA, isolement du virus
Plus tard dans l'évolution de la maladie ou après récupération	Tests secondaires : Anticorps IgM et IgG ELISA
Rétrospectivement chez les patients décédés	Test d'immunohistochimie, RT-PCR, isolation du virus

Tableau 4. Tests diagnostiques effectués en fonction de la période de l'infection virale. Ces tests doivent être suffisamment sensibles et spécifiques pour apporter un diagnostic fiable, du fait des conséquences importantes d'un diagnostic erroné sur le patient et la société (*d'après The Center for Disease Control*) [150].

➤ **Tests primaires de détection de l'infection virale aigue**

- **Transcription inverse suivie d'une réaction en chaine par polymérase (RT-PCR)**

Ce test permet la détection du génome viral dans le sang ou les tissus du patient et est spécifique s'il est effectué au moins 72h après le début des symptômes. La reverse transcriptase permet de transformer l'ARN viral en ADN qui sera ensuite amplifié par réaction en chaine par polymérase pour pouvoir être détecté. Différents tests existent utilisant les amorces de différents gènes viraux et récemment un système PCR multiplex automatisé a été développé [151,152].

C'est la méthode de référence utilisée lors des épidémies car elle est plus sensible, permettant une détection du virus 24 à 48 h avant la méthode de détection par capture d'antigène, et ce test est également positif plus longtemps, jusqu'à 3 jours après l'élimination de l'antigène viral. De l'ARN du virus Ebola a même été détecté jusqu'à 1 an après l'apparition des symptômes, dans la semence d'un patient survivant, cette technique permettant ainsi de contrôler une possible transmission sexuelle du virus Ebola. Elle a comme principaux avantages, le suivi de l'évolution de la maladie par quantification de la charge virale par PCR quantitative (2log10 fois supérieure chez un patient non survivant) et le séquençage de l'ADN permet également de typer la souche virale épidémique et d'étudier la phylogénie. Les résultats de la PCR sont disponibles en 1 à 6 heures [153].

- **Détection d'antigène viral par la méthode ELISA**

Au stade précoce de la maladie, des titres élevés de *Filovirus* infectieux sont présents dans le sang et les tissus des patients, suggérant que la détection d'antigène viral est adaptée à un diagnostic précoce. Ce test a montré son efficacité clinique sur le terrain lors de plusieurs épidémies au Congo, Gabon et en Ouganda. Il est encore utilisé lorsque l'on veut confirmer le résultat du diagnostic par PCR. Différents tests ont été développés, utilisant différents anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement des épitopes de protéines antigéniques du virus Ebola, comme la GP ou NP [154].

L'antigène et l'ARN viraux sont détectables dans le sang du 3^{ème} jour au 7-16^{ème} jour après l'apparition des symptômes.

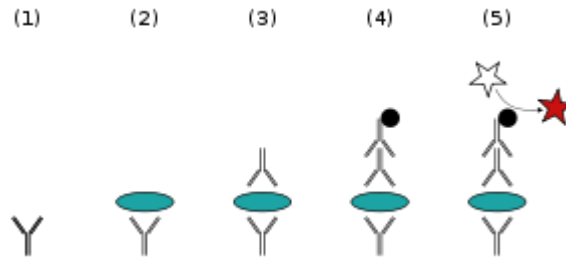


Figure 18. La méthode de capture d'antigène ou ELISA « sandwich ». (D'après Jeffrey M. Vinocur) 1) La plaque est revêtue d'un anticorps de capture. 2) Lors du dépôt de l'échantillon, tout antigène présent va se lier à son anticorps de capture spécifique. 3) On ajoute un anticorps de détection qui se lie à l'antigène. 4) On rajoute ensuite un anticorps secondaire contenant une enzyme, qui se lie à l'anticorps de détection. 5) Un substrat est ajouté, et est converti par l'enzyme en une forme détectable (fluorescence ou signal électrochimique)

➤ Isolement du virus

On effectue des cultures cellulaires puis on isole le virus ou on étale directement le sérum du patient sur une lame afin de détecter le virus par microscopie électronique. Le virus Ebola se réplique dans une grande variété de lignées cellulaires, mais en pratique on utilise souvent les cellules Vero E6. Les contraintes de cette technique est l'acheminement des échantillons dans le respect de la chaîne du froid, jusqu'aux rares laboratoires BSL-4 présents sur le terrain pour l'analyser en toute sécurité, ainsi que l'impossibilité à identifier l'espèce en cause lors de l'analyse morphologique de ces *Filovirus*. Pour obtenir l'identification sérologique de l'espèce concernée, on effectue un test d'immunohistochimie, technique largement répandue pour le diagnostic post-mortem, avec un panel d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement l'antigène d'une espèce concernée, que l'on couple à un anticorps, contenant une enzyme convertissant un substrat en une forme détectable, ou marqué par un fluorophore [155].

➤ Tests secondaires de détection de l'infection virale

Ces tests permettent de confirmer ou suivre l'évolution de l'infection, en mesurant la réponse immunitaire de l'hôte par la détection des anticorps spécifiques dirigés contre le virus Ebola. Les tests immuno-enzymatiques ELISA sont sensibles et spécifiques et ont supplanté le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT) pour le diagnostic, qui consistait à utiliser des anticorps rabiques marqués à la fluorescéine ayant une affinité pour les anticorps anti-EBOV présents dans le sérum du patient, eux-mêmes liés à l'antigène du virus Ebola Zaïre produits par des cellules HeLa.

- Le test ELISA de détection des IgM utilise des cellules Vero E6 comprenant l'antigène d'Ebola Zaïre pour détecter les IgM spécifiques à cette souche. Ces IgM sont détectables à partir du 2^{ème} jour après l'apparition des symptômes et persistent jusqu'au 30^{ème} à 168^{ème} jour après l'infection.
- Le test ELISA de détection des IgG (affinité plus importante pour le virus) utilise des particules virales obtenues après détertion du virus. Il est plus spécifique que l'IFAT, ces IgG sont détectables entre le 6^{ème} et 18^{ème} jour et le test reste positif sur plusieurs années. Il est utilisé pour connaître la séroprévalence dans une population donnée. [156]

➤ **Développement de tests de diagnostic rapide**

- **eZYSCREEN®**

Développé en France, par le commissariat aux énergies atomiques (CEA), eZYSCREEN® a été testé en conditions réelles dans les centres de Traitement Ebola en Guinée, de fin 2014 à août 2015, où il a fait ses preuves, avec une excellente spécificité et une sensibilité adaptée à ce type de test rapide. Un résultat négatif doit cependant être vérifié, ce n'est pas un test d'exclusion. Le marquage CE a été obtenu en octobre 2015 et sa production est effectuée par le laboratoire VEDALAB. Il permet la détection d'antigènes viraux par la présence d'anticorps monoclonaux se liant aux protéines virales, à partir du prélèvement d'une goutte de sang, de plasma ou d'urine du patient. Ces tests sont adaptés au terrain, car il ne nécessite pas de matériel sophistiqué, ni de personnel spécialisé pour leur utilisation, répondant ainsi aux critères OMS de mise au point d'un test de diagnostic rapide.



Figure 19. Le test de diagnostic rapide eZYSCREEN®. La simplicité d'emploi de ce test en fait un outil important pour le diagnostic rapide de la maladie à virus Ebola. Les résultats du test sont obtenus en 10 à 15 minutes, ce dernier se révélant positif lorsque deux bandes colorées apparaissent [157].

- **ReEBOV®**

Développé par la firme américaine Corgenix Medical Corp, testé en février 2015 dans 2 centres de traitement Ebola sierra-léonais, ce test a montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 92%. Il consiste à prélever une goutte de sang du patient que l'on dépose sur une bandelette, mise dans un tube à essai où elle va réagir avec des anticorps monoclonaux associés à des nanoparticules d'or liant spécifiquement la protéine VP40 virale. Si le test est positif, une bande rose se forme en 15 minutes environ sur la bandelette de papier [158].

- **Test japonais**

L'équipe du professeur Jiro Yasuda a développé un test capable de détecter le virus Ebola en moins de 12 minutes. Les résultats sur 100 prélèvements effectués en mars 2015 étaient identiques aux résultats par la traditionnelle méthode de RT-PCR. Le test utilise la technique RT-LAMP qui consiste à désactiver le virus potentiellement présent dans l'échantillon sanguin, à transcrire l'ARN viral en ADNc par inclusion de la reverse transcriptase dans l'échantillon dans lequel on ajoute des amorces, l'ADN polymérase et d'autres substances qui vont amplifier les gènes viraux, qui une fois chauffé à 60-65°C, trouble l'échantillon [159].

3.2. Quel patient diagnostiquer ?

Situation du patient	Prise en charge du patient
Patient symptomatique à risque identifiable de contamination dans les 21 jours précédents (même faible)	<p>Nécessité de mise en place rapide d'un diagnostic par RT-PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Possibilité de faire un diagnostic rapide (résultat en 15 min), mais doit être confirmé par RT-PCR. • Si RT-PCR négatif lorsqu'il est effectué <72 h après l'apparition des symptômes, refaire un autre test après 72h. • Si RT-PCR négatif lorsqu'il est effectué ≥72h après le début des symptômes, le patient n'est pas malade.
Patient asymptomatique à risque identifiable de contamination dans les 21 jours précédents	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de mise en place de diagnostic. • Surveillance de l'apparition des symptômes (test si symptômes), possibilité de mise en quarantaine dans un centre de soin avant l'apparition des symptômes si risque de contamination élevé
Patient symptomatique sans risque identifiable de contamination dans les 21 jours précédents	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de mise en place de diagnostic de la maladie à virus Ebola. • Diagnostic de la maladie épidémique régionale la plus probable en fonction de la symptomatologie (paludisme, fièvre de Lassa, fièvre typhoïde...)

Tableau 5. Résumé des recommandations pour la gestion des patients en attente de diagnostic, en fonction de l'évaluation du risque potentiel d'exposition au virus Ebola. (D'après The Center for Disease Control) [160].

Les symptômes retenus pour la maladie à virus Ebola sont : fièvre, maux de tête sévère, faiblesse, douleurs musculaires, vomissements et diarrhée.

Un risque élevé de contamination est défini comme :

- Une exposition percutanée (par piqure d'aiguille), une exposition des muqueuses ou un contact direct sans équipement de protection individuelle (EPI) avec du sang ou des liquides biologiques de personnes malades symptomatiques.
- Un contact direct avec un cadavre sans EPI dans un pays où la transmission est intense, et où les cas sont très répandus dans les zones urbaines, avec des mesures de contrôle incertaines.
- Un patient ayant vécu sous le même toit et fourni des soins directs à une personne malade symptomatique.

Un risque intermédiaire de contamination est défini comme :

- Un voyage dans un pays où la transmission est intense, ou les cas sont très répandus dans les zones urbaines et où les mesures de contrôle de la maladie sont incertaines.
- Un contact direct avec un EPI approprié avec une personne malade symptomatique ou ses fluides corporels.
- Un patient ayant été en contact étroit (1 mètre du malade) pendant une période prolongée sans EPI.

Un risque faible de contamination est défini comme :

- Un voyage dans un pays où la transmission est intense, avec des cas dans les zones urbaines où les mesures de contrôle sont incertaines, sans exposition connue au virus Ebola.
- Un contact direct bref (serrer la main) sans EPI avec une personne au stade précoce de la maladie.
- Une proximité (même pièce) sur une période brève sans que ce soit une zone de soins avec une personne symptomatique.
- Une personne ayant été en contact direct ou avec des fluides d'une personne malade avec EPI sans transmission ou cas répandus dans le pays.
- Un patient ayant voyagé dans un avion avec une personne symptomatique.

De plus, une personne ayant été en contact direct avec un animal tel que le primate ou la chauve-souris provenant des zones endémiques d'Afrique, est considéré comme à risque de la maladie à virus Ebola.

Il y a absence de risque de contamination par le virus Ebola dans les situations suivantes :

- Un contact avec une personne asymptomatique ayant été en contact avec une personne malade symptomatique, ou tout contact avec une personne malade avant qu'elle ne soit symptomatique.
- Un voyage dans un pays où la transmission est intense il y a plus de 21 jours, ou voyage dans un pays comportant quelques cas de malades sans transmission urbaine, et sans qu'il y n'y ait eu d'exposition
- Un voyage à côté d'une personne provenant d'un pays où la transmission est intense [160].

3.3. Anomalies biologiques d'un patient infecté par Ebola

- **Numération formule sanguine** : Le patient va présenter une leucopénie attribuable à la lymphopénie suite à l'apoptose massive des lymphocytes ainsi qu'une thrombopénie due à la CIVD. L'hématocrite est également anormal.
- **Anomalies de la coagulation** : Le taux de pro-thrombine et le temps de céphaline activé sont généralement augmentés, avec présence de produits de dégradation de la fibrine, de D-dimères dus à la CIVD.
- **Atteintes d'organes** : Du fait des nécroses multifocales hépatiques, il y a une augmentation des transaminases (ASAT et ALAT). L'atteinte rénale entraîne une protéinurie mais également la possibilité d'une insuffisance rénale qui peut être précoce dans l'évolution de la maladie, caractérisée par une augmentation de la créatininémie et de l'urémie.
- **Anomalies électrolytiques** : Du fait des manifestations gastro-intestinales on observe souvent une hyponatrémie et une hypokaliémie [155].

PARTIE 7 : MESURES DE PREVENTION

1. Stratégies établies par l'OMS pour prévenir la transmission du virus Ebola à l'homme

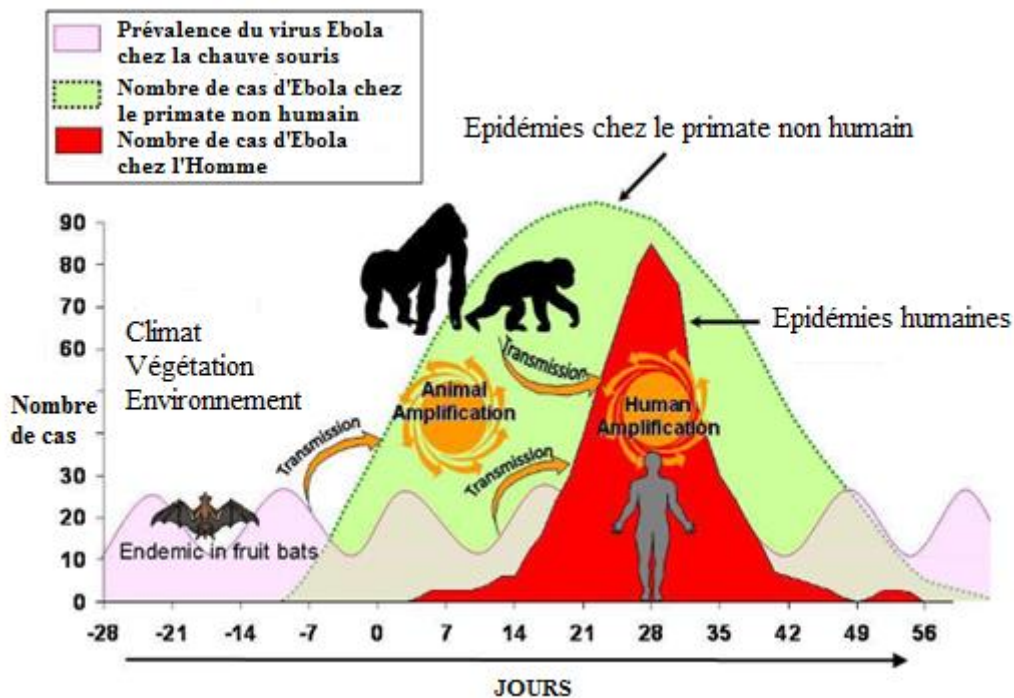


Figure 20. Courbes des épidémies à virus Ebola chez l'homme et l'animal. La prévalence du virus Ebola chez les chauves-souris frugivores varie en fonction de la saison et de la proportion de jeunes chauves-souris non immunisées qui vont se contaminer auprès d'adultes porteurs sains. Lors de l'augmentation de la circulation du virus chez les chauves-souris, ces dernières vont contaminer les primates par contact direct ou indirect via leurs liquides biologiques, à l'origine d'épidémies animales à grandes échelles. L'homme va se contaminer directement auprès de chauves-souris ou auprès des primates infectés, lors de la chasse notamment, ou lors de séjours prolongés dans des grottes ou des mines colonisées par ces chauves-souris. (D'après l'OMS) [162].

1.1. Phase pré-épidémique

- **Système de surveillance sanitaire de la faune sauvage**

Les épidémies animales à virus Ebola précèdent les cas de contamination humaine. Il faut mettre en place un système de surveillance sanitaire des populations animales sauvages et alerter les autorités sanitaires et les populations locales en cas de mortalité anormalement élevée de ces animaux.

- **Appliquer les précautions standards d'hygiène dans tous les lieux de soins**

Afin d'éviter la transmission du virus Ebola au personnel soignant, qui est en première ligne, il faut appliquer ces précautions standards lors de soins apportés à tout patient.

- **Education sanitaire sur les risques liés à la manipulation de la faune sauvage**

Etant donné qu'il n'y a pas encore de traitement ou vaccin conventionnés, une meilleure connaissance par la population des facteurs de risque et des mesures de protection individuelle constitue un enjeu majeur afin d'enrayer les épidémies.

Il faut informer les populations à risque, les chasseurs et personnes vivant aux abords des forêts, des risques de contamination par la faune sauvage, notamment les chauves-souris et les primates, qui sont les principaux vecteurs de la maladie. Il faut éviter tout contact avec des animaux retrouvés morts et ne pas vendre ou manger ces animaux. Lors de la chasse dans des régions présumées porteuses du virus Ebola, éviter de chasser des animaux malades ou au comportement étrange et ne pas toucher directement les carcasses des animaux chassés, porter des gants et des vêtements protecteurs.

En ce qui concerne la consommation de viande de brousse et de produits animaliers (lait, sang) dans des régions épidémiques, bien cuire ces aliments avant leur consommation et porter des gants pendant leur préparation. Ne pas préparer de plats à base de viande crue de chauve-souris ou de primates.

1.2. Alerte sanitaire

Dès qu'un cas de virus Ebola est suspecté, une équipe de scientifiques avec un équipement de protection adapté, est envoyé sur place pour enquêter, évaluer le risque, prélever des échantillons et mettre en œuvre des mesures de contrôle jusqu'aux résultats du laboratoire.

1.3. Phase épidémique

- **Coordination des mesures de contrôle de l'épidémie et mobilisation des ressources**

Mettre en place la logistique concernant les équipements de protection individuelle, la création de centres de traitement Ebola, l'aide par du personnel soignant formé.

- **Création d'un système de surveillance des cas contact d'un patient diagnostiqué**

Des épidémiologistes effectuent des enquêtes sur le terrain afin de détecter et surveiller les cas contacts sur une période de 21 jours après leur dernier contact possible avec le patient malade. Il faut isoler ces patients s'ils deviennent symptomatiques.

- **Education sanitaire sur les mesures de précaution afin d'éviter la transmission**

Il faut informer la population locale sur les modes de transmission de la maladie. En période épidémique, se laver les mains régulièrement à l'eau et au savon, éviter également tout contact avec du sang ou des fluides corporels de personne malade ainsi qu'avec tout objet susceptible d'avoir été en contact avec ces fluides corporels.

Expliquer qu'une personne décédée du virus Ebola demeure contagieuse, qu'il faut s'abstenir de rituels funéraires ou de cérémonies d'enterrement nécessitant de toucher la dépouille sans aucune protection. Mettre en place des mesures de prévention adaptées afin d'effectuer ces cérémonies funéraires de manière sécuritaire tout en respectant la dignité du défunt.

Il faut décrire à la population les symptômes de la maladie à virus Ebola et conduire immédiatement au centre médical le plus proche, toute personne présentant ces symptômes, en s'abstenant de tout contact rapproché avec cette personne, afin qu'elle puisse être mise en quarantaine, en attendant le diagnostic. Il faut également désinfecter à l'eau de javel tout objet ou pièce souillée par des liquides biologiques du patient malade et surveiller l'apparition des symptômes de la maladie chez les proches du patient infecté pendant les 3 semaines suivantes.

Pour les touristes, ils doivent également surveiller toute fièvre supérieure ou égale à 38° survenant dans les 21 jours suivant un voyage dans un pays où une épidémie d'Ebola est en cours et le signaler immédiatement au SAMU en mentionnant le voyage en zone endémique. Rester à domicile en attendant les secours, et éviter le contact avec son entourage. Il existe une fiche résumée de conseils aux voyageurs devant se rendre dans un pays concerné sur le site du Ministère de la Santé.

Des recommandations ont été établies par l'OMS pour éviter la contamination par voie sexuelle des partenaires des patients survivants au virus Ebola. Ils doivent utiliser des préservatifs dans les 3 mois suivants l'apparition des symptômes et jusqu'à ce que l'analyse de sperme ait donné par deux fois à une semaine d'intervalle un résultat négatif de détection du génome viral [161].

- **Moyens de protection dans les centres médicaux de soins**

Dans les centres médicaux de traitement de patients infectés par Ebola, il faut avant tout éviter l'infection nosocomiale pour le personnel soignant, visiteurs et autres patients en attente de diagnostic. Il existe une zone à haut risque, contenant les patients infectés, dont l'accès est strictement réglementé, et une zone intermédiaire pour les patients en attente de diagnostic.

Le personnel soignant doit vêtir un équipement de protection individuelle lors des soins apportés à des patients atteints d’Ebola. De plus, il faut s’assurer de la bonne mise en place des précautions standards d’hygiène : établir des points d’eau propre afin d’assurer le lavage et la désinfection des mains avant et après tout contact avec un malade, utiliser des seringues à usage unique que l’on jettera sans les recapuchonner dans un container adapté, aux parois résistantes à la perforation, qui sera ensuite brûlé dans un incinérateur. Il faut isoler le malade et laver et désinfecter le linge ou matériel souillé par de l’eau de javel diluée, tout en prenant les précautions nécessaires pour éviter la transmission. On évitera chez les malades d’avoir recours au traitement par voie parentérale, tant que cela est possible, pour éviter le risque de contamination du personnel soignant par accident d’exposition au sang. On utilisera un incinérateur pour brûler les déchets contaminés dont les cendres seront enterrées dans une fosse adéquate et on maintiendra un niveau de sécurité optimal sur le site d’élimination des déchets.



Figure 21. Equipement de protection individuelle porté par le personnel soignant lors de l'épidémie à virus Ebola. [162]

PARTIE 8 : LES TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX

Actuellement, il n'y a pas de médicament commercialisé pour le traitement de la maladie à virus Ebola ou le traitement prophylactique post-exposition, chez les personnes en attente de diagnostic. La prise en charge d'un patient infecté par le virus Ebola se limite à la mise en place de soins de support. L'OMS, au cours de l'épidémie de 2014-2015, dans un besoin croissant de médicament antiviral efficace, a autorisé à usage compassionnel, l'utilisation de traitements expérimentaux développés contre le virus Ebola, testés jusque-là uniquement sur des modèles animaux. D'autres médicaments antiviraux commercialisés pour d'autres pathologies, ont été testés pour leur activité potentielle sur le virus Ebola [163].

1. Transfusion de sang et de plasma de convalescent

En 1977, du sérum d'un patient convalescent associé à de l'interféron humain ont été administrés à un chercheur anglais, accidentellement contaminé lors de la manipulation du virus Ebola. L'initiation de la thérapie a permis la décroissance rapide de la virémie ainsi que le ralentissement de l'évolution de la maladie virale, permettant la survie du chercheur [164].

Lors de l'épidémie de Kikwit en 1995, 8 patients infectés par le virus Ebola reçoivent des transfusions de sang à partir de 5 échantillons de patients convalescents. Seul 1 patient sur les 8 transfusés décède, ce qui fait un taux de mortalité de 12,5%, largement inférieur au taux de mortalité moyen de l'épidémie de Kikwit qui est de 80%. Les patients transfusés étaient sévèrement malades, certains présentant des manifestations hémorragiques. Il est difficile d'évaluer l'impact des transfusions sur la survie de ces patients, ces derniers recevant des soins médicaux intenses. De plus, ces patients qui étaient à un stade tardif de la maladie, auraient peut-être survécus, même en l'absence de transfusion, le pourcentage de survie étant plus élevé avec le temps. On ignore si cet effet bénéfique est attribuable aux anticorps ou aux protéines anticoagulantes présentes dans le sang de convalescents [165,166].

Chez le primate non humain (PNH), la transfusion de sang de macaques convalescents à des animaux naïfs peu de temps après un challenge léthal par le virus Ebola, a permis l'acquisition de titres d'anticorps comparables à ceux associés à une protection vaccinale efficace, mais a échoué à protéger les macaques contre cette injection létale [167].

Lors de l'épidémie de 2014-2015, une étude non randomisée en Guinée sur 84 patients ayant reçu deux doses consécutives de plasma de convalescents, n'a pas montré de réduction statistiquement significative de la mortalité chez ces patients [168].

2. Traitement par anticorps

Le traitement par anticorps vise à neutraliser le virus, empêchant ainsi sa réplication et sa diffusion au sein de l'organisme, et à alerter le système immunitaire de la présence d'un intrus, permettant ensuite l'élimination du pathogène par celui-ci. Pour le virus Ebola, une forte réponse humorale précoce est corrélée à la survie [169,170].

2.1. Immunoglobulines polyclonales

➤ Immunoglobulines polyclonales issues de sérum équin ou caprin hyperimmunisé

Les plasmas de convalescents sont disponibles en quantité limitée, ce qui a conduit à utiliser des immunoglobulines (Ig) animales. Développé pour la première fois en 1995, par des scientifiques russes, le sérum équin hyperimmunisé est obtenu par administration du virus Ebola isolé chez le singe, au cheval, un animal peu sensible à ce virus. Dans cette étude, ils ont montré que l'administration d'IgG isolées à partir du sérum équin préparé par fractionnement à l'alcool de Cohn a permis la protection de 100% des babouins hamadryas infectés par le virus Ebola par voie intramusculaire [171]. En 1996, une autre étude utilisant 6 macaques cynomolgus, traités immédiatement après infection, a montré des titres ELISA élevés 2 jours après, a retardé l'apparition de la virémie et des signes cliniques par rapport aux animaux témoins, mais n'a pas permis la protection des macaques, malgré l'effet bénéfique sur la réduction de la virémie. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences inter-espèces, les babouins hamadryas constituant un modèle animal moins fiable, plus résistant au virus Ebola mais également par les doses virales utilisées (1000 dose létale 50 dans cette étude pour 30 dose létale 50 dans l'étude russe). Ces IgG neutralisantes seraient efficaces pour de faibles doses virales, lorsqu'elles sont administrées précocement, dans les 1 à 2 heures suivant l'exposition virale. Son utilisation est néanmoins possible dans les 72 heures suivant une contamination accidentelle [172].

L'immunisation d'animaux non sensibles au virus Ebola permettant une production importante d'anticorps spécifiques neutralisants et non neutralisants, l'administration d'Ebola chez la chèvre a permis l'isolement d'IgG qui ont été protectrices chez le cobaye, lorsqu'elles étaient administrées dans les 48 heures. Des études cliniques ont été effectuées sur des

volontaires sains pour évaluer la tolérance de ces IgG de chèvre. Ces dernières ont également été administrées à titre prophylactique à des chercheurs soupçonnés d'être infectés par le virus Ebola [173].

➤ IgG polyclonales issues de macaques survivants

Dans les expériences avec du sérum équin ou caprin, les anticorps sont capables de contrôler rapidement la virémie mais subissent une clairance immunitaire importante du fait de leur nature hétérologue. L'essai a été renouvelé en multipliant les doses d'IgG polyclonales homologues, dont les propriétés pharmacocinétiques seraient plus favorables. Ainsi, en 2012, l'administration chez le PNH, de multiples doses d'IgG polyclonales isolées à partir de PNH survivants a permis la protection des animaux naïfs. Pour le virus Marburg, un traitement par IgG 15 à 30 min post-exposition virale puis au 4^{ème} et 8^{ème} jour a été complètement protecteur. Pour le virus Ebola, l'administration 48 heures après exposition puis au 4^{ème} et 8^{ème} jour a complètement protégé 2 singes sur 3, le 3^{ème} développant des symptômes légers et différés mais survivant à la maladie [174].

2.2. Anticorps monoclonaux

➤ KZ52

KZ52 est un anticorps monoclonal neutralisant, isolé chez un survivant de l'épidémie de 1995 au Kikwit. Il lie la GP virale dans sa conformation pré-fusion, à la base du calice, empêchant ainsi la boucle de fusion de s'insérer dans la membrane de l'hôte. *In vitro*, il neutralise EBOV.

En 2002, cet anticorps monoclonal a permis une protection dose dépendante des cobayes lorsqu'il était administré avant ou jusqu'à 1 heure après l'injection létale par le virus Ebola. KZ52 était également protecteur chez des cobayes malgré la persistance d'une virémie élevée, suggérant qu'en plus de réduire la virémie, il agirait également en déclenchant la mort des cellules infectées. Chez le PNH, l'anticorps KZ52 n'a pas montré d'efficacité, lorsqu'il était administré 1 jour avant et 4 jours après l'injection létale à virus Ebola, ayant peu d'effet sur la réplication virale [175,176].

➤ Zmab

Zmab est un cocktail de 3 anticorps murins (m1H3, m2G4 et m4G7) sélectionnés parmi les 8 anticorps anti-GP virale générés par des souris vaccinées par le vecteur VSV recombinant exprimant la GP d'EBOV. Ces 3 anticorps lient des régions distinctes de la GP

du virus Ebola ont montré leur efficacité chez le rongeur. S'il est administré dans les 24 heures, Zmab est totalement protecteur chez le PNH et dans les 48 heures, la protection est de 50%, les survivants ayant développé une réponse humorale et cellulaire spécifique anti-Ebola durable. En effet, les singes ont développé une réponse immunitaire mémoire protectrice contre une nouvelle injection létale du virus Ebola 10 semaines plus tard, et après 13 semaines la protection était toujours de 75%. Lors de l'administration de Zmab, les anticorps vont contenir le virus, laissant ainsi le temps à la réponse immunitaire adaptative pour se mettre en place. Une thérapie combinée associant Zmab à de l'interféron α vectorisé par un *Adénovirus* fournit une protection complète chez des macaques rhesus lorsqu'elle est administrée jusqu'à 72 h après l'infection [177-179].

➤ MB-003

MB-003 est un cocktail d'anticorps chimériques murin/humain (c13c6, h13F6, C6D8) produit dans des cellules ovariennes de hamster chinois ou dans des plants de *Nicotiana Benthamiana*, cette dernière technique ayant montré de meilleurs résultats en termes d'efficacité. Deux de ces anticorps (13C6 et 6d8) neutralisent le virus en présence du complément, et 13F6 n'a pas d'activité de neutralisation. De plus, l'anticorps 13C6 se lie à la GP sécrétée qui agit comme un leurre pour les anticorps protecteurs. MB-003 a permis la protection de macaques rhesus lorsqu'il était administré 1h après le challenge létal à EBOV. La protection était partielle lorsqu'il était administré dans les 24 à 48h (66%), les singes faiblement symptomatiques, avaient une virémie faible ou indétectable. [185] Lorsqu'il est administré après confirmation de l'infection selon le protocole de diagnostic de la *Food and Drug Administration*, avec observation d'une fièvre documentée, le traitement entraîne 43% de survie, alors que la mortalité est de 100% chez les animaux contrôles [180-181].

➤ Zmapp

Zmapp est un cocktail de 3 anticorps monoclonaux humanisés optimisé à partir des deux cocktails d'anticorps précédents (MB-003 et Zmab). Il est le fruit d'un programme financé par le gouvernement et l'armée américaine, en collaboration avec les autorités sanitaires canadiennes. La production de Zmapp s'effectue par Mapp Biopharmaceutical Inc. qui utilise, comme pour MB-003, un plant de tabac transgénique *Nicotiana Benthamiana*, pour produire les anticorps monoclonaux. On vaccine les souris avec le vecteur VSV exprimant la GP d'EBOV, puis on isole les anticorps monoclonaux d'intérêt, que l'on humanise ensuite par manipulation génétique. Ensuite, on insert le gène de l'anticorps d'intérêt dans le plant de tabac, afin qu'il produise l'anticorps en masse. Le problème est que cette production par les

plants de tabac est longue, de 4 à 6 mois, constituant ainsi un stock limité en Zmapp [182,183].



Figure 22. Schéma représentant le médicament Zmapp se fixant à la GP virale. Ce cocktail de 3 anticorps monoclonaux humanisés (c13C6, c2G4 et c4G7) va neutraliser le virus Ebola par fixation à sa GP virale. L'anticorps c13C6 se fixant sur l'apex de la GP virale, partie qui sera ensuite éliminée par les cathepsines pour permettre sa liaison au récepteur cellulaire, est non neutralisant mais protecteur chez l'animal, suggérant ainsi qu'il agit de concert avec le complément dans l'activation de la réponse immunitaire. Les deux anticorps fixés à la base de la GP virale sont neutralisants, empêchant la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte. (D'après le laboratoire Ward, *The Scripps Research Institute*). [184].

La question de sélection éventuelle de mutants échappant à la neutralisation par les anticorps monoclonaux doit être soulevée. Les résultats des tests ELISA montre que ZMapp neutralise efficacement la souche guinéenne d'Ebola responsable de l'épidémie de 2014-2015, suggérant ainsi que les niveaux de protection ne doivent pas être touchés.

Le fait que Zmapp soit un cocktail d'anticorps monoclonaux hautement purifiés constitue une alternative moins controversée que les transfusions de sang total de survivants convalescents. L'innocuité des thérapies par anticorps monoclonaux est bien documentée, avec des taux de réactions indésirables généralement faibles (quelques réactions allergiques).

Zmapp est capable de sauver 100% des macaques rhesus lorsqu'il est initié jusqu'à 5 jours après le challenge léthal, ces derniers présentant une fièvre importante et une virémie élevée. Il a montré une réversion de la maladie et un rétablissement complet des animaux à un stade avancé de la maladie, avec la présence d'enzymes hépatiques élevées, d'hémorragies des muqueuses, et de pétéchies généralisées. L'efficacité du traitement Zmapp chez l'homme demeure incertaine, le médicament n'ayant pas fait l'objet d'essais cliniques au moment de l'épidémie de 2014-2015. Seul un test initial de sécurité chez l'homme a été entrepris afin de permettre dès que possible l'usage compassionnel de Zmapp. Sur sept malades ayant reçu le traitement, cinq ont survécu. Mais il est difficile d'évaluer l'efficacité propre de Zmapp,

certaines personnes ayant reçu d'autres traitements expérimentaux. Il offre cependant la meilleure option de traitement expérimental actuellement en développement, pour le traitement des patients infectés par le virus Ebola, du fait de sa capacité à conférer une immunité protectrice rapide et spécifique chez toutes les populations, y compris chez les jeunes, les personnes âgées et immunodéprimées.

3. Les médicaments antiviraux

3.1. Inhibiteurs de polymérase

➤ Le favipiravir

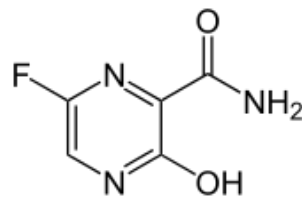


Figure 23. Structure chimique du favipiravir. Cette pyrazine organofluorée mime la structure d'un nucléoside de type purine. Sa forme active est obtenue par phosphoribosylation par des enzymes cellulaires [185].

Le favipiravir T705 a une activité antivirale à large spectre contre les virus à ARN, en inhibant sélectivement l'activité de l'ARN polymérase ARN dépendante, enzyme nécessaire à la réplication virale. Son action est atténuée par l'addition d'un acide nucléique de type purine. En effet, l'ARN polymérase reconnaît à tort le favipiravir-ribonucléotriphosphate comme un nucléotide qui, par sa fixation, va inhiber cette enzyme virale. Il est commercialisé sous le nom d'Avigan® depuis mars 2014 par la société japonaise Toyota Chemical dans l'indication du traitement de la grippe, ce médicament étant bien toléré chez l'homme [185].

Son efficacité a été testée sur le virus Ebola. La première utilisation de T705 a montré 100% de protection chez la souris contre une infection à EBOV par aérosol. L'administration biquotidienne sur 14 jours chez des souris déficientes en interféron a permis la protection contre le virus Ebola, même lorsqu'il était administré 6 jours après l'exposition virale. [186,187]. Le favipiravir inhibe l'infection virale *in vitro*. Néanmoins, il n'y a pas eu d'expérimentation chez le primate. Son administration simplifiée, par voie orale, et la disponibilité de plus de 10 000 doses de traitement en a fait un traitement expérimental particulièrement intéressant au cours de l'épidémie de 2014-2015. Les premiers résultats de l'étude JIKI, non randomisée, réalisée dans plusieurs centres de traitement d'Ebola en Guinée

semblait indiquer une amélioration de la survie chez les patients avec un niveau initialement modéré de réplication virale (la mortalité était en moyenne 33% inférieure à la valeur d'avant l'essai, la virémie diminuant rapidement avec la prise du traitement) et aucune efficacité chez les patients dont la réplication virale était très intense. Cependant, les résultats de l'étude ne montrent pas d'association statistiquement significative entre la prise de ce médicament et la réduction de la mortalité chez les 99 patients traités, comparés aux patients traités précédemment dans les mêmes centres. [188].

➤ BCX4430

Le BCX4430 est un nouvel analogue synthétique de l'adénosine qui inhibe l'ARN polymérase virale, en agissant comme un agent de terminaison de chaîne d'ARN non obligatoire. *In vitro* il inhibe l'infection de cellules humaines par les *Filovirus*. Il possède une activité virale de large spectre, agissant contre les *Bunyavirus*, *Arenavirus*, *Paramyxovirus*, *Coronavirus* et *Flavivirus*. Son administration chez le rongeur en post-exposition a protégé ces derniers contre le virus Ebola et Marburg. Chez le macaque, s'il est administré dans les 48 heures, il a montré une protection totale des animaux [189].

➤ Le brincidofovir (CMX001)

C'est un traitement antiviral expérimental contre les *Adénovirus*, le Cytomégalovirus, le virus de la Variole et le virus Ebola. Le brincidofovir est une pro-drogue qui par sa liaison à un lipide cellulaire, va libérer sa forme active, le cidofovir au sein de la cellule, qui va agir comme un analogue de cytosine, inhibant ainsi la polymérase virale. Ce médicament devait faire l'objet d'un essai clinique au Libéria en janvier 2015, afin d'évaluer son efficacité, mais du fait de la décroissance rapide du nombre de malades, l'essai clinique a été interrompu [190].

3.2. Nanoparticules lipidiques contenant des petits ARN interférents

Des cobayes ont été traités en pré ou post-exposition à un challenge léthal par le virus Ebola, par 4 petits ARN interférents (siARN) ciblant le gène L de la polymérase d'EBOV complexés à de la polyéthylénimine (PEI) ou à des particules lipidiques. L'association des siARN au PEI a diminué la virémie et a protégé partiellement les cobayes alors que celle des siARN aux particules lipidiques a complètement protégé les cobayes lorsqu'elle était administrée peu de temps après l'exposition virale. Un seul des 4 ARN interférents s'est révélé protecteur en administration unique [191].

Le TKM-Ebola est un médicament expérimental développé par la société canadienne TEKIRA Pharmaceuticals basée à Vancouver. Ce sont 3 petits ARN interférents ciblant l'ARNm de 3 protéines virales, la polymérase du virus Ebola, les protéines VP24 de l'enveloppe virale et VP35 cofacteur de la polymérase, associés à des nanoparticules lipidiques stables. Chez le PNH, l'administration en traitement post-exposition à intervalles réguliers, tous les 2 jours dans un schéma à 4 injections ou tous les jours pour un total de 7 injections a protégé respectivement 66% et 100% des macaques. Le traitement fut bien toléré, avec une légère augmentation des enzymes hépatiques, probablement liée à l'infection virale. [192]

La FDA a partiellement levé en août 2014, la suspension des essais cliniques portant sur ce médicament du fait de ses effets indésirables de type pseudo-grippaux, pour son utilisation potentielle au cours de l'épidémie Africaine. L'essai clinique de phase II en Sierra Leone a été interrompu car le traitement n'a pas montré de bénéfice thérapeutique global.

3.3. Oligonucléotides anti-sens

Ces PMOs (phosphorodiamidate morpholino oligomers) sont chimiquement modifiés pour interférer avec la translation de l'ARN messenger viral, bloquant ainsi, comme les siARN, l'expression des gènes viraux. Chez le rongeur, on a identifié 3 PMOs, spécifiquement efficaces contre le virus Ebola en pré ou post-exposition, ciblant les gènes des protéines VP24, VP35 et de la polymérase virale. Son administration prophylactique a protégé 75% des macaques rhesus. L'identification des sites de liaison optimaux pour la transcription a permis le développement d'AVI-6002 contenant 2 PMOs, AVI-7537 et AVI-7539 pour le virus Ebola, et le développement d'AVI-6003 contenant les PMOs AVI-7287 et AVI-7288 pour le virus Marburg. Puis on a montré que l'administration d'un PMO unique, l'AVI-7537 ciblant le gène de VP24 d'Ebola ou AVI-7288 ciblant la NP de Marburg a été efficace. Son administration 30 à 60 minutes après l'infection protège plus de 60% des macaques rhesus contre le virus Ebola et 100% des macaques cynomolgus contre le virus Marburg [193-195].

4. Autres traitements

4.1. Modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstrogène (SERMs)

On a testé *in vitro* une batterie de molécules qui pourraient avoir une activité antivirale sur le virus Ebola. Un ensemble de SERMs a été identifié comme potentiel inhibiteur de ce virus, dont le clomiphène et le torémifène. Ces résultats ont été confirmés chez la souris où ces

SERMs inhiberaient l'entrée du virus après son internalisation. Leur action ne semble pas liée aux récepteurs à l'œstrogène puisqu'ils exercent leur activité antivirale même en l'absence de leur expression. Ils agiraient probablement dans l'étape de fusion des membranes [196].

4.2. Traitement par anticoagulant

L'infection par le virus Ebola induit chez le PNH la surexpression du facteur tissulaire pro-coagulant par les monocytes et les macrophages. L'inhibition de ce facteur tissulaire pourrait améliorer la symptomatologie de la maladie à virus Ebola. Ainsi, l'administration chez le macaque rhesus, 10 minutes ou 24 heures après une dose létale du virus Ebola, de la protéine recombinante C2 de nématode anticoagulante, inhibitrice du facteur tissulaire, a prolongé le temps de survie d'environ 3 jours, avec un taux de survie d'environ 33%. Elle va diminuer la coagulation, avec une diminution des D-dimères, moins de dépôt de fibrine et de thromboemboli intravasculaire [197].

4.3. Thérapie liée au sepsis

Les stades tardifs de l'infection mènent à un état ressemblant à un sepsis sévère, avec hypotension et désordres de la coagulation. Le sepsis sévère est caractérisé par une rapide diminution de la protéine C. La protéine C activée recombinante humaine (rhPCA) est administrée pour traiter les patients en sepsis sévère à haut risque de décès. L'efficacité de rhPCA a été testée pour la maladie à virus Ebola. Son administration chez le macaque 30 à 60 minutes après le challenge létal puis continuée sur 7 jours a prolongé la survie, mais seulement 2 singes sur 11 ont survécu [198].

PARTIE 9 : REPOSE IMMUNITAIRE LORS DE L'INFECTION A VIRUS EBOLA

1. Mécanismes viraux de dérèglement ou d'échappement immunitaire

L'infection virale repose sur un équilibre entre le pouvoir pathogène du virus pour affaiblir les défenses de l'hôte et le maintien de l'intégrité cellulaire afin d'assurer la réplication virale. Les virus ont ainsi évolué pour supprimer les réponses immunitaires de l'hôte de manière sélective afin de favoriser leur réplication et la transmission de la descendance.

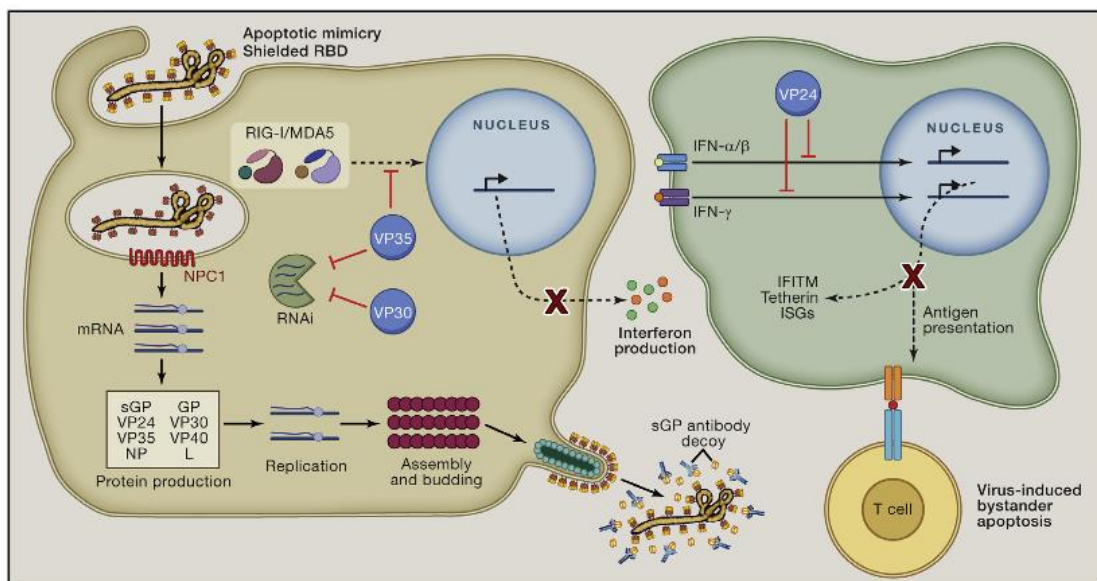


Figure 24. Mécanismes développés par le virus Ebola pour échapper au système immunitaire. Le virion va être rapidement internalisé par les cellules phagocytaires par mimétisme apoptotique. La protéine virale VP35 va inhiber la synthèse d'interféron (IFN) alors que la protéine VP24 inhibe la réponse cellulaire à l'IFN de type I et II, les empêchant d'exercer leur action antivirale et bloquant le mécanisme de présentation d'antigène à la cellule T. VP30 et VP35 vont inhiber conjointement l'action des petits ARN interférents (RNAi) sur l'ARN viral. (D'après Misasi et Sullivan) [199].

1.1. Stratégie d'échappement au système immunitaire par mimétisme apoptotique

Des études ont montré que l'entrée cellulaire du virus Ebola par macropinocytose fait intervenir les protéines TIM-1 et Axl. Une quantité importante de phosphatidylsérine est présente sur l'enveloppe du virus Ebola, lipide qui est normalement présent sur le feuillet interne des membranes cellulaires. Lors de l'apoptose des cellules, il y a exposition de la phosphatidylsérine, du fait de la formation de corps apoptotiques, alertant les cellules phagocytaires voisines. Ces dernières vont absorber les corps apoptotiques par macropinocytose médiée par TIM-1 et Axl, mécanisme qui n'induit pas de réponse

inflammatoire. Du fait de sa grande taille, le virus Ebola va se comporter comme un pseudo-corps apoptotique, et son absorption rapide par macropinocytose par les cellules phagocytaires, mécanisme non inflammatoire, va lui permettre d'échapper au système immunitaire [97,98].

1.2. Inhibition de l'immunité innée

- Inhibition des réponses interféron de type I et II

Le virus est repéré précocement par la cellule présentatrice d'antigène, cellule dendritique, monocyte ou macrophage. Les protéines VP35 et VP24 du virus Ebola agissent de manière coordonnée afin d'inhiber efficacement la réponse immunitaire innée médiée par les interférons (IFN) de type I et II, cytokines sécrétées notamment par les cellules du système immunitaire, permettant la communication cellulaire et l'organisation de la réponse immunitaire antivirale [83,84].

La protéine VP35 est un cofacteur de la polymérase virale dont la fonction est d'assurer la transcription et la réplication de l'ARN viral. VP35 va inhiber la production cellulaire d'IFN par deux principaux mécanismes. En amont, il va se lier par son domaine C terminal à l'ARN viral double brin afin d'empêcher la liaison de RIG-I et MDA-5, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, qui détectent les ARN viraux étrangers et déclenchent la cascade d'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. En aval, il inhibe la phosphorylation du facteur de régulation de l'IFN-3 (IRF-3) qui agit en tant que facteur de transcription du gène de l'interféron. De même, VP35 se lie à la protéine PACT, empêchant sa liaison au récepteur RIG-I, nécessaire à son activation. Le virus Lassa, également pourvoyeur de fièvre hémorragique, cible comme le virus Ebola plusieurs effecteurs des voies cellulaires impliquées dans la production d'IFN [200,201].

VP24 inhibe directement la réponse à l'interféron de type I et II, par sa liaison à la karyophérine α , protéine permettant le transport du dimère phosphorylé STAT (transducteur de signal et activateur de transcription) au niveau du noyau cellulaire afin qu'il puisse se lier aux éléments de réponse à l'IFN et induire la transcription du gène, empêchant ainsi l'IFN d'exercer son action antivirale [202].

- Perturbation de la réponse antivirale par les ARN interférents

L'infection cellulaire par les virus à ARN va activer la voie des ARN interférents, petits ARN non codants qui vont se lier à l'ARN viral pour le cliver et empêcher la transcription de

ces gènes viraux. Les protéines VP35 et VP30 du virus Ebola vont se lier à des protéines composant le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), empêchant la formation de ce complexe multiprotéique qui guide les petits ARN interférents afin de cibler l'ARN viral et permettre sa destruction. Le virus Ebola va donc inhiber ce mécanisme de défense de l'immunité innée [203].

- Rétablissement de la machinerie cellulaire favorisant la réplication virale

Lors d'une infection virale, la cellule va se protéger en inhibant la synthèse protéique afin de ralentir la réplication virale, par le biais de la protéine kinase PKR. Cette dernière, stimulée par le double brin d'ARN viral, va inhiber le facteur d'initiation de traduction eucaryote (eIF-2 α), qui est nécessaire à l'initiation de la production des protéines cellulaires. La protéine VP35 virale va inhiber cette voie PKR/eIF-2 α , rétablissant la machinerie cellulaire [204].

- Inhibition de la téthérine, dernier rempart avant la libération du virion

La téthérine est une protéine cellulaire induite par l'IFN de type I, qui contient 2 domaines transmembranaires reliant la membrane virale et cellulaire, empêchant ainsi le bourgeonnement du virus à partir de la membrane plasmique. La protéine Vpu du VIH ainsi que la GP du virus Ebola, vont inhiber l'action de cette protéine régulatrice, permettant la libération du virion [205].

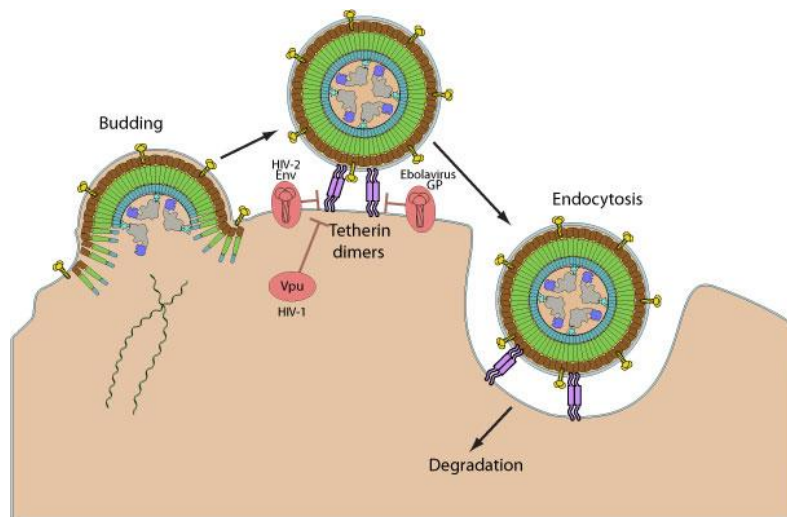


Figure 25. La téthérine est une protéine cellulaire qui empêche le bourgeonnement et la libération des virus enveloppés. Contrairement à la protéine Vpu du VIH, la GP du virus Ebola ne diminue pas l'expression membranaire de la téthérine. Plusieurs mécanismes sont envisagés, comme l'encombrement stérique de la GP empêchant la liaison de la téthérine à la membrane virale ou encore l'atteinte de l'intégrité de cette protéine. Le domaine transmembranaire de la GP serait impliqué dans cet antagonisme. [206].

1.3. Inhibition de l'immunité adaptative

- Echec de l'activation de la réponse adaptative

In vitro, l'infection de la cellule dendritique par le virus Ebola entraîne une inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 à la surface cellulaire. De même, la CD se retrouve dans l'incapacité à produire des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN de type I, qui favorise le mécanisme de présentation d'antigène aux lymphocytes T naïfs. Les protéines VP24 et VP35 du virus Ebola seraient ainsi responsables de la maturation anormale de la CD. La présentation de l'antigène au lymphocyte T ne s'effectuera pas de manière efficace, conduisant à l'échec du déclenchement de la réponse adaptative par défaut d'activation du lymphocyte T. En effet, la synapse immunologique entre la CD et le lymphocyte T doit comporter trois signaux : la liaison du peptide-CMH de la CD au récepteur TCR du lymphocyte est bien présente (signal 1) mais il y a absence de molécules de co-stimulation à la surface de la CD (CD40, CD80) et présence de molécule co-inhibitrice (B7-H1) dans un contexte de production cytokinique dérégulée (signal 2 et 3 défaillants). Cet échec de l'activation des lymphocytes T conduit à une « apoptose spectatrice » (spectatrice, car les lymphocytes ne sont pas infectés par le virus Ebola). Cette apoptose massive des lymphocytes T entraîne une lymphopénie détectable 48 heures après l'infection, conduisant à une immunosuppression [144-146, 207-208].

- Propriétés du virus Ebola permettant le détournement de la réponse humorale

La taille importante des virions de l'ordre du millimètre présentant une GP de haute densité représente un obstacle majeur pour une inhibition efficace par des anticorps mesurant environ 10 nanomètres. Le virus filamenteux peut se replier sur lui-même et former des « poches » de glycoprotéines inaccessibles aux anticorps. De plus, la glycosylation lourde dans le domaine de type mucine de la GP peut limiter l'accès à des épitopes cruciaux nécessaires pour une neutralisation efficace, par exemple au niveau du domaine de liaison au récepteur intracellulaire nécessaire à l'entrée virale. La glycoprotéine soluble sGP dont la partie N terminale est identique à celle de la GP virale sert de leurre antigénique auprès des anticorps neutralisants, empêchant ainsi la neutralisation de la GP présente sur les virions infectieux. La sGP est également responsable d'un mécanisme de subversion antigénique, détournant la réponse humorale vers la synthèse d'anticorps dirigés contre ses propres épitopes, diminuant ainsi la production d'anticorps neutralisants spécifiquement la GP virale [75,76,199]. (cf. Partie 1;6;1)

2. Réponse immunitaire précoce et survie

Etudes in vitro

L'absorption rapide des virions par macropinocytose par les CPA, premières et principales cibles virales, empêche la sécrétion précoce et équilibrée de cytokines pro et anti-inflammatoires nécessaire au contrôle de l'infection, le virus Ebola inhibant la sécrétion de TNF- α , IL-6 et IL-10, cette dernière ayant un rôle important dans la régulation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Au sein de la CPA, le virus va disséminer dans les ganglions lymphatiques, la rate, le foie ou les poumons où il va se répliquer activement et où la CPA, par défaut de maturation, ne peut déclencher l'activation de la réponse immune adaptative. L'absence de déclenchement de la réponse immunitaire humorale et cellulaire associée à une altération précoce de l'immunité innée vont empêcher le contrôle de la maladie, favorisant la propagation virale. Le virus va disséminer, infectant de nombreuses cellules. La GP présente à la surface des cellules infectées va être lysée par la métalloprotéase TACE qui va libérer l'ectodomaine de la GP, GP1,2 Δ , qui produit en grande quantité, va se fixer sur le récepteur TLR-4 des cellules dendritiques et des macrophages, déclenchant une production massive de cytokines pro-inflammatoires. L'interaction précoce du virus avec la CPA aboutit à une réponse immune défectueuse et à une apoptose massive des cellules immunitaires, affaiblissant les défenses de l'hôte, permettant ainsi au virus de disséminer et proliférer activement, à l'origine d'une production tardive et incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires délétères pour l'hôte.

Du fait de la stabilité génétique du virus Ebola, de la symptomatologie identique aux stades précoces de l'infection entre les patients survivants et ceux dont l'issue est fatale, les 30% de patients survivants à l'infection au virus Ebola ne seraient pas infectés par une souche virale atténuée, moins virulente, mais auraient une réponse immunitaire précoce efficace permettant la survie. Les personnes capables de surmonter le blocage de la réponse immunitaire innée par les protéines virales VP24, VP30 et VP35 vont établir une sécrétion cytokinique précoce, équilibrée et de courte durée. L'activation des cellules *Natural Killer*, effecteurs majeurs de l'immunité innée, aurait un rôle prépondérant dans le contrôle précoce de l'infection à virus Ebola. Ils détruiraient les cellules infectées par un mécanisme dépendant de la perforine, réduisant ainsi les capacités de répllication virale avant que la réponse immunitaire adaptative se mette en place, nécessaire à l'élimination de l'agent infectieux.

Le paradoxe de la maladie à virus Ebola, est que la survie et la mortalité sont liées à la génération de fortes réponses immunitaires, l'une précoce et de courte durée, l'autre tardive, incontrôlée et prolongée. Ainsi l'évolution de la maladie est déterminée de façon irréversible de manière très précoce, par l'activation efficace des CPA permettant la mise en place d'une réponse immune adaptative humorale et cellulaire [209,210].

Etude in vivo

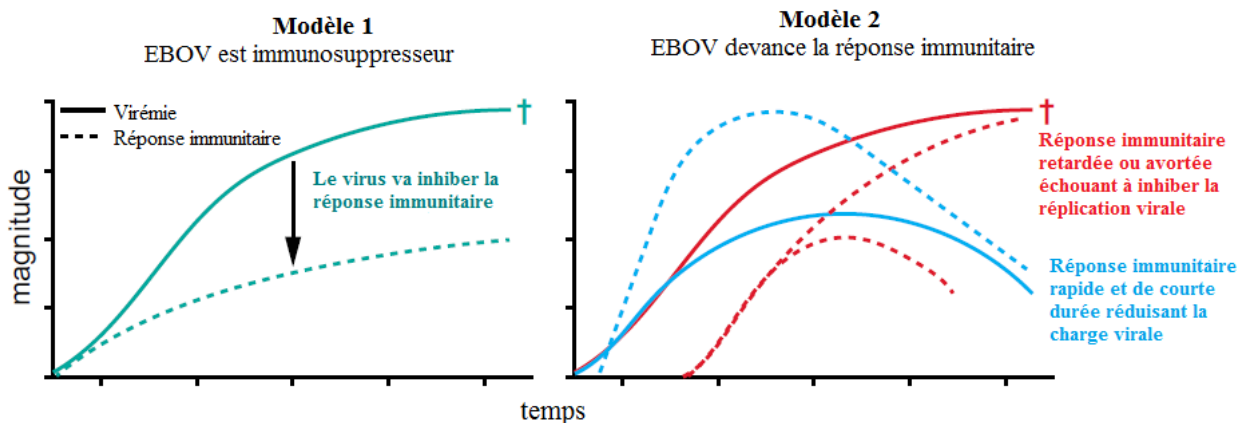


Figure 26. Les différents modèles envisagés pour expliquer la défaillance de la réponse immunitaire face à l'infection à virus Ebola. Modèle 1. Les études *in vitro* semblent indiquer que le virus Ebola exerce une action immunosuppressive sur les cellules immunitaires de l'hôte, inhibant ainsi la maturation de la cellule dendritique nécessaire à la mise en place de l'immunité adaptative. Modèle 2. L'étude de Mc Elroy montre cependant de robustes réponses immunitaires T et B spécifiques chez 4 patients infectés par Ebola. Des différences de cinétiques de réplication virale et d'initiation de la réponse immunitaire seraient donc impliquées dans l'issue de la maladie [211].

Dans l'étude de Mc Elroy publiée en 2015, dont l'objectif principal était de déterminer de manière précise les réponses immunitaires cellulaires activées au cours d'une infection aiguë à EBOV, on a effectué le suivi biologique de 4 patients infectés par EBOV. Contrairement à ce qui a été observé *in vitro*, les 4 patients présentaient une activation significative des réponses cellulaires spécifiques B et T CD8+ cytotoxique au cours de la phase aiguë de l'infection virale, malgré la présence d'une lymphopénie chez 3 patients. Néanmoins, les lymphocytes T exprimaient de manière importante un récepteur inhibiteur, PD-1, normalement exprimé lors de l'expression importante ou chronique d'un antigène viral, ce qui pourrait laisser supposer que les lymphocytes T présenteraient une certaine déficience fonctionnelle. De plus, ils ont remarqué une seconde activation des lymphocytes plus de 60 jours après l'apparition des symptômes, soulignant ainsi la persistance de l'antigène viral, à l'origine de cette réactivation lymphocytaire [212].

3. Les différents profils immunologiques de réponse à l'infection à virus Ebola

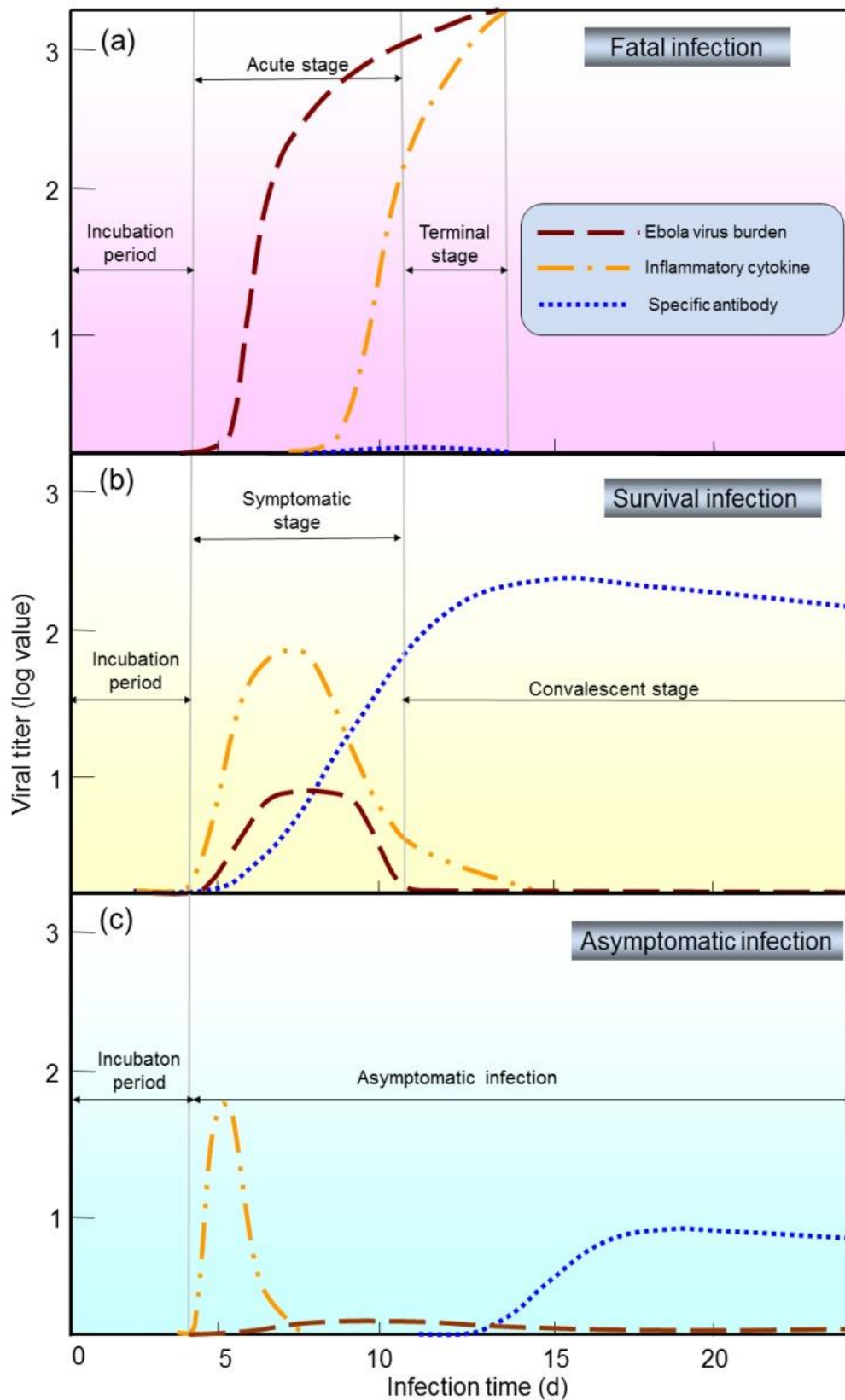


Figure 27. Courbes représentant les différents profils immunitaires. Cas d'une infection fatale (a), chez un survivant (b) et une infection asymptomatique (c) à virus Ebola. (D'après Zhang et al) [213].

Au cours d'une infection à virus Ebola 3 stades se succèdent :

- La phase d'incubation ou phase de latence qui est asymptomatique, le malade n'étant pas contagieux.
 - La phase aigüe ou symptomatique
 - La phase de convalescence ou stade terminal qui aboutit à la guérison ou à la mort du patient
- Infection fatale

Une réponse inflammatoire efficace doit faire intervenir un profil particulier de cytokines spécifiques du pathogène à éliminer, sécrétées de manière contrôlée, à dose suffisante mais non excessive pour ne pas être délétère pour l'hôte. Dans une infection létale, la sécrétion de cytokines inflammatoires est retardée (environ 7 jours post-infection) et prolongée, entretenue par la réplication active du virus. Leur production incontrôlée, à des doses 5 à 1000 fois plus importantes comparées à celles chez un patient survivant, est corrélée à l'augmentation de la charge virale.

La survie est conditionnée par la mise en place rapide du système immunitaire adaptatif, avec la production d'anticorps spécifiques à un stade précoce de la maladie, neutralisant ainsi la diffusion du virus, et l'immunité cellulaire CD8+ afin de détruire les cellules infectées par le virus, stoppant ainsi la réplication virale. Dans une infection fatale, la production d'anticorps IgM spécifiques est faible, tardive et détectable uniquement chez 30% des patients. La production d'IgG spécifiques, plus affines pour l'antigène viral et donc plus neutralisants, est nulle.

Du fait de l'absence d'anticorps neutralisants produits à un stade précoce de l'infection, la charge virale va rapidement augmenter, avec plus de 10 millions de copies du virus Ebola par millilitre de plasma, dès le 2^{ème} jour de la phase symptomatique. Le virus va diffuser dans la circulation générale, envahir et détruire les organes de l'hôte, et la diffusion virale incontrôlée va renforcer la production de cytokines pro-inflammatoires aboutissant à une tempête cytokinique, toxique pour l'hôte. La charge virale ne cesse d'augmenter jusqu'à la mort, où elle est 100 fois plus élevée que chez un survivant.

Ainsi, l'infection fatale est caractérisée par une défaillance chez l'hôte du système immunitaire adaptatif, favorisant la diffusion virale et aboutissant à une production

incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires qui contribuent aux symptômes cliniques responsables de la mort de l'individu.

- Patient survivant

La réponse inflammatoire est précoce (dès le 4^{ème} jour), de courte durée et mesurée, par une balance efficace entre les cytokines pro et anti-inflammatoires, avec sécrétion d'IL1 β , IL6 et TNF- α . La réponse INF- α est inhibée par le virus Ebola, et cela pour une infection létale ou chez le survivant. Chez le survivant, il y a une production précoce d'anticorps spécifiques avec présence d'IgM dès le 2^{ème} jour de la phase symptomatique et des IgG à partir du 5^{ème}-6^{ème} jour, associée à une activation des cellules cytotoxiques.

Après une période d'incubation, où la charge virale est indétectable, les 2 premiers jours de la phase symptomatique, les taux d'antigènes viraux sont similaires dans une infection fatale ou chez un patient survivant. L'activation précoce de la réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire entraîne une clairance rapide du virus, empêchant sa diffusion et l'augmentation de la sécrétion de cytokines associée à l'expansion virale. Chez les survivants, la charge virale est généralement inférieure à 100 000 copies/mL et commence à décliner rapidement, parfois dès le 3^{ème} jour de la phase symptomatique. Le patient est complètement rétabli lorsque la charge virale devient indétectable.

Ainsi, la survie du patient est conditionnée par la mise en place précoce du système immunitaire adaptatif humoral et cellulaire, permettant de contenir l'infection virale, conduisant au rétablissement de l'individu.

- Patient asymptomatique

Chez le patient asymptomatique, la réponse inflammatoire est immédiate et efficace, avec production massive d'IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 et MIP-1 α / β dans le plasma à partir du 7^{ème} jour post-infection qui vont inhiber la réplication virale, permettant ensuite la destruction des cellules infectées par les cellules *Natural Killer*.

La production d'anticorps spécifiques a lieu tardivement, dans les 2 à 3 semaines après l'infection et atteignant des niveaux modérés seulement 1 mois plus tard. Les anticorps n'ont pas de rôle dans la survie de l'individu, celle-ci étant attribuable à la réponse cytokinique précoce. Les personnes asymptomatiques ont la charge virale la plus faible, mais l'ARN du virus est détectable jusqu'à trois semaines après l'exposition initiale.

Ainsi, une infection asymptomatique est caractérisée par la sécrétion précoce et mesurée de cytokines adaptées permettant de solliciter de manière efficace la réponse immunitaire innée, bloquant précocement la réplication du virus avant que l'infection ne soit symptomatique.

La meilleure connaissance des profils immunologiques suite à l'infection par le virus Ebola pourrait laisser entrevoir des stratégies thérapeutiques. Ainsi, à un stade précoce de la maladie, l'administration de l'IFN de type I aux propriétés antivirales pendant la période d'incubation, permettrait de ralentir la réplication virale, et laisserait le temps au système immunitaire de l'hôte pour prendre en charge l'infection virale. Au stade terminal, on essaierait de moduler l'immunité par l'administration de cellules stromales mésenchymateuses, empêchant ainsi l'agression des cellules-hôtes par la sécrétion inappropriée de cytokines pro-inflammatoires [8,213-215].

4. Existe-t-il une immunité naturelle contre le virus Ebola ?

Les survivants à une infection à virus Ebola ne semblent pas pouvoir se réinfecter, puisqu'aucun cas de seconde infection n'est connu à ce jour, bien que cela ne soit pas prouvé scientifiquement. De plus, ils présentent un taux élevé d'anticorps circulants anti-Ebola. Néanmoins, on ignore quelle est la durabilité de cette immunité et s'il y a une possible réaction croisée avec les autres espèces du virus Ebola.

De plus, des chercheurs ont montré chez la souris, la présence de marqueurs génétiques de résistance naturelle à l'infection à virus Ebola, les souris infectées ne développant pas de symptômes cliniques de la maladie. Ceci pourrait expliquer la présence d'infections asymptomatiques chez l'homme [216].

Une étude de l'Institut pour la Recherche et le Développement a montré en 2010 qu'une proportion importante de la population gabonaise était immunisée contre le virus Ebola puisque des anticorps spécifiques ont été retrouvés chez 15% de la population, sans que ceux-ci aient présenté antérieurement des symptômes spécifiques de la maladie, ce nombre important de porteurs sains survenant même dans les régions non touchées par des épidémies antérieures. Des études *in vitro* ont montré que ces personnes présentaient un nombre important de lymphocytes T CD8+ spécifiques. Le mode de contamination possible serait l'ingestion de fruits contaminés par la salive de chauves-souris porteuses du virus Ebola ou de viande contaminée insuffisamment cuite [217].

PARTIE 10 : LA VACCINATION CONTRE LE VIRUS EBOLA

1. Définition du vaccin idéal

La population cible du vaccin, à risque d'infection par les *Filovirus*, a été définie comme les proches d'une personne infectée lors d'une épidémie en cours, le personnel de santé travaillant dans une zone à risque, le personnel de laboratoire manipulant des *Filovirus* et les militaires du fait de l'utilisation possible de ces virus comme arme biologique.

Pour répondre à ces besoins, il faut développer un vaccin permettant une protection vaccinale complète et rapide avec une seule injection, du fait de l'urgence du contexte épidémique, et persistance de cette protection sur le long terme contre toutes les espèces pathogènes du virus Ebola et les différentes souches du virus Marburg [218].

2. Les différentes étapes de la commercialisation d'un vaccin

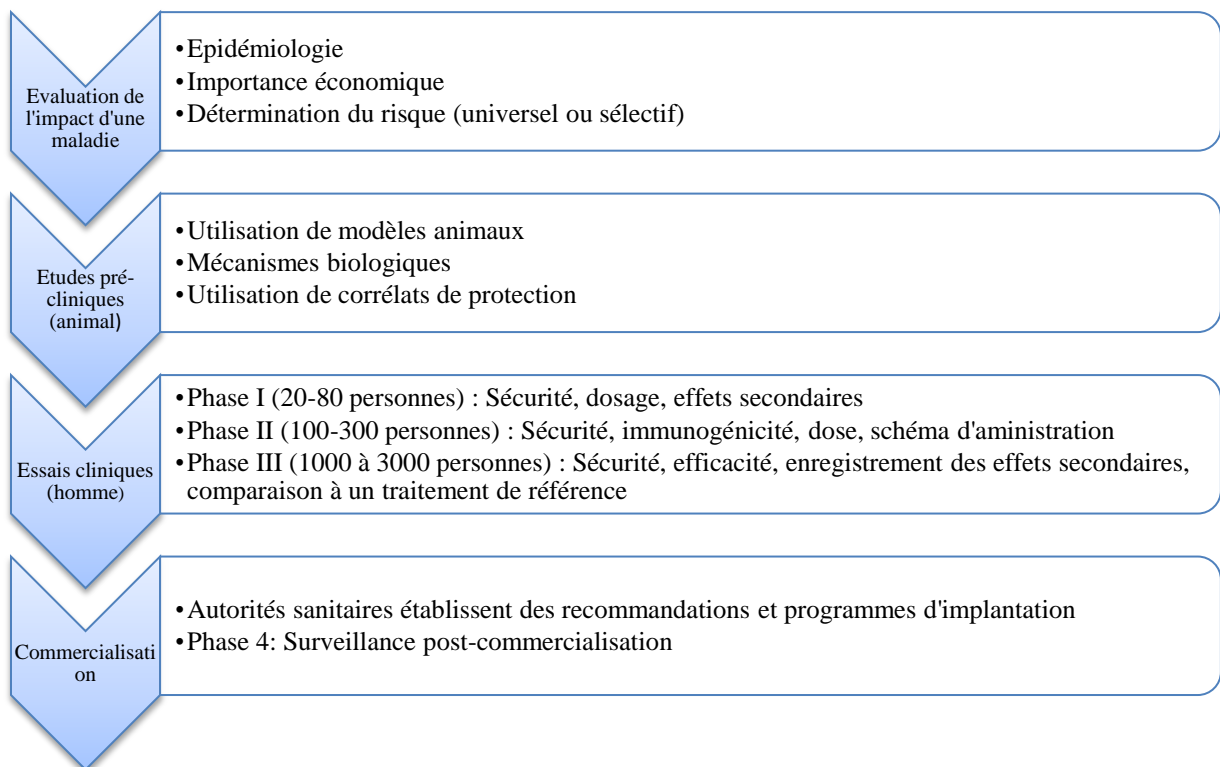


Figure 28. Représentation schématique du processus de développement vaccinal, de l'évaluation du risque au programme d'implantation vaccinal. Avant de commencer les recherches scientifiques sur un vaccin potentiel, il faut évaluer le besoin dans la population. Des études précliniques afin de déterminer l'efficacité et l'innocuité vaccinale sont effectuées sur des modèles animaux appropriés. Une fois ces derniers validés, des essais cliniques sont effectués chez l'homme afin d'évaluer la tolérance locale et générale, l'immunogénicité et l'efficacité vaccinale dans la population cible. Une fois le dossier complet accepté, le vaccin est commercialisé, et ce dernier fait l'objet d'une surveillance post-commercialisation. (D'après Garon et al.) [219].

3. Les modèles animaux pour l'évaluation de l'efficacité vaccinale

Des essais cliniques de phase III visant à évaluer l'efficacité vaccinale chez la population cible contre une infection à virus Ebola hautement pathogène sont difficiles à mener du fait de l'apparition sporadique et imprévisible des épidémies à virus Ebola ces dernières années, mis à part l'épidémie à grande échelle de 2014-2015 qui a permis la mise en place d'essais cliniques de phase III pour certains vaccins. La *Food and Drug Administration* a défini la notion de « modèle animal » fiable permettant d'évaluer l'efficacité vaccinale, grâce à une extrapolation des résultats trouvés chez l'animal, à l'homme. L'objectif est d'établir une corrélation entre la réponse immunitaire observée chez ce modèle animal et la protection vaccinale. Si cette réponse immunitaire est retrouvée chez l'homme, on en déduit que le vaccin est efficace car immunogène. L'innocuité et l'immunogénicité vaccinale sont déterminées lors des essais cliniques de phase I et II chez l'homme.

3.1. Le primate non humain (PNH)

Le PNH constitue le modèle de référence (« *gold-standard* ») pour l'évaluation de l'efficacité vaccinale. Le virus Ebola sauvage infecte naturellement les PNH qui sont très sensibles à ce virus fortement mortel et ont été de nombreuses fois responsables de la transmission du virus Ebola à l'homme. Les macaques rhesus et cynomolgus ont été choisis du fait de la similarité des symptômes cliniques de la maladie avec l'homme. La pathogénicité du virus Ebola, qui a été étudiée chez ces animaux, est similaire à celle retrouvée chez l'homme, caractérisée par l'infection précoce des cellules présentatrices d'antigène. Du fait du coût important et de l'espace nécessaire pour conduire des essais cliniques sur ces animaux dans un laboratoire sécurisé, on a évalué la possibilité d'utiliser des petits animaux comme modèle animal.

3.2. Le cobaye

Les cobayes sont sensibles au virus Ebola sauvage mais ce dernier est peu adapté à cet animal et donc faiblement pathogène. Le passage successif de ce virus chez le cobaye a permis une adaptation à son hôte avec formation d'une souche fortement létale chez cet animal. Les cobayes présentent une similarité importante des symptômes cliniques de la maladie avec le PNH et l'homme. La pathogénèse est semblable, constituant ainsi un bon modèle animal. Cependant, la réponse immunitaire (surtout la réponse cellulaire T) sera moins réactive comparée à celle du PNH.

3.3. La souris

Le virus Ebola sauvage n'est pas pathogène chez la souris, mis à part chez les jeunes souris. Une souche virale adaptée à cet animal a été isolée après passages successifs chez ces jeunes souris. Le virus est infectieux uniquement par injection intra-péritonéale. Malgré quelques différences dans la symptomatologie clinique et la pathogénèse chez la souris, par rapport au PNH, il constitue un bon modèle animal. Des souris transgéniques peuvent être utilisées pour comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire, qui comme les cobayes, est moins réactive [220].

4. Quelle cible antigénique choisir pour neutraliser le virus Ebola ?

L'administration chez le PNH de virus Ebola tués contenant un mélange de protéines virales inactivées a permis la production massive d'anticorps qui se sont révélés non protecteurs, ceci pouvant s'expliquer entre autres par la nature agressive du virus Ebola dont la pathogénèse est d'évolution rapide, devançant rapidement les capacités de clairance virale par la réponse humorale. De plus, le manque de spécificité, avec présence d'anticorps non neutralisants, dirigés contre des protéines virales non impliquées dans l'attachement ou l'entrée cellulaire, peut réduire l'efficacité vaccinale. L'administration chez la souris de différents vecteurs génétiques codant pour différents antigènes du virus Ebola a permis de cibler chez le rongeur les protéines virales immunogènes corrélées à la protection vaccinale, prédictives de l'efficacité vaccinale chez l'homme [221].

La GP virale, protéine clé immunogène, est une protéine transmembranaire facilement accessible par le système immunitaire. En effet, c'est la seule protéine virale située à la surface du virion et des cellules infectées par ce dernier. Elle permet l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule-hôte, grâce à son peptide de fusion. Sa neutralisation par le système immunitaire empêche ainsi l'infection cellulaire et le cycle de réplication virale. Elle entraîne donc la production d'anticorps neutralisants, qui se sont révélés partiellement protecteurs dans une étude utilisant un vaccin sous unitaire contenant la GP du virus Marburg [222]. Pour le virus Ebola, ce seraient les anticorps non neutralisants qui seraient impliqués dans la protection vaccinale, faisant intervenir d'autres mécanismes de protection immunitaire. Néanmoins, l'utilisation de la GP comme antigène immunogène est nécessaire et suffisante à l'induction d'une immunité protectrice. Certaines formulations vaccinales contiennent en plus de la GP, d'autres protéines virales, comme la nucléoprotéine (NP), contribuant ainsi à augmenter la réponse immunitaire cellulaire notamment [223].

5. Les différents essais vaccinaux contre le virus Ebola

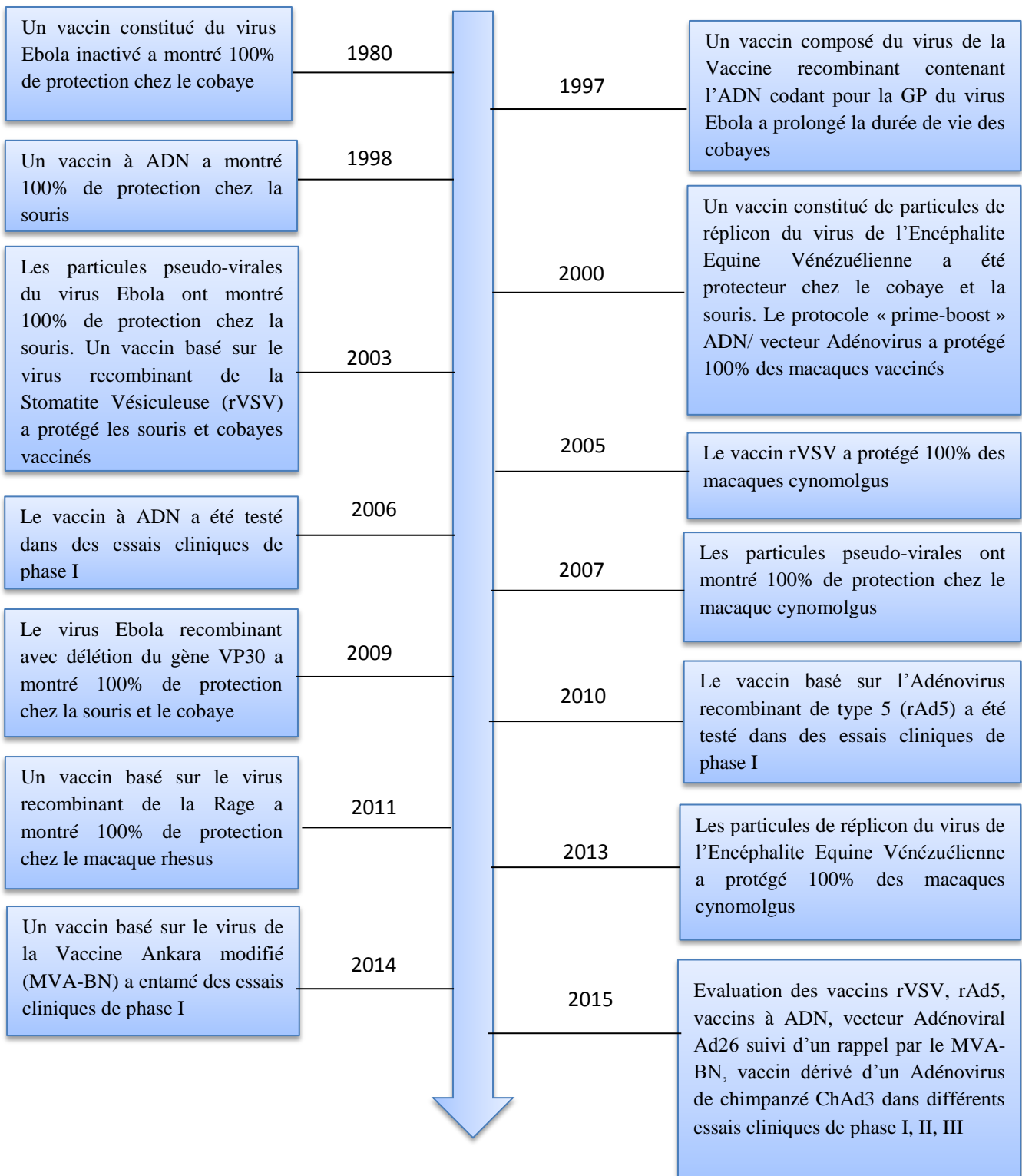


Figure 29. Principales avancées scientifiques dans la découverte et la commercialisation d'un vaccin sûr et efficace contre le virus Ebola. (D'après Wu et al.) [224]

6. Vaccins composés de virus entier

6.1. Vaccin vivant atténué

L'inoculation d'un vaccin contenant le virus Ebola vivant dont la virulence aurait été atténuée ne semble pas appropriée, compte tenu de l'agressivité du virus sauvage, de sa capacité à déréguler le système immunitaire réduisant l'efficacité vaccinale, et du risque potentiel de réversibilité de la souche virale en une souche pathogène, les virus à ARN présentant un taux de mutation élevé, bien que le virus Ebola soit un virus relativement stable génétiquement.

Un vaccin vivant défectueux pour la réplication, composé du virus Ebola Mayinga pour lequel le gène de la protéine VP30 nécessaire à la réplication virale a subi une délétion par génétique inverse (EBOV Δ VP30), a néanmoins été développé. Ce virus, morphologiquement similaire au virus sauvage, se réplique à des titres élevés dans des cellules Vero qui expriment la protéine VP30 et s'est montré génétiquement stable après passages successifs dans ces cellules [225]. Deux injections successives de ce vaccin se sont avérées complètement protectrices chez la souris et le cobaye, avec des titres viraux beaucoup plus faibles chez les animaux vaccinés, déclenchant une forte réponse humorale anti-GP virale et une réponse cellulaire CD8+ dirigée contre la NP virale. Son innocuité a été évaluée chez la souris STAT-1-KO, fortement sensible au virus Ebola, le vaccin n'entraînant pas de signes cliniques de maladie à virus Ebola ou de décès chez les animaux [226]. Chez le PNH, une seule inoculation d'EBOV Δ VP30 a protégé tous les animaux, malgré qu'un singe soit devenu virémique, et qu'un autre ait développé de la fièvre. Deux injections à 4 semaines d'intervalle ont complètement protégé les PNH vaccinés, avec absence de virémie détectable et de signes cliniques de la maladie, grâce au déclenchement de réponses humorale et cellulaire robustes [227].

6.2. Vaccin inactivé

Une des façons d'induire un taux élevé d'anticorps est d'inoculer une préparation de virus Ebola inactivés par la chaleur, du formol ou par gamma irradiation, qui contient un mélange des différentes protéines virales. Pour autant, il y a une perte d'efficacité vaccinale car absence de sélectivité des anticorps neutralisants et dénaturation de certains antigènes en fonction des techniques d'inactivation utilisées.

En 1980, des chercheurs ont montré que l'administration de la souche EBOV inactivée par du formol ou par la chaleur et combinée à de l'hydroxyde d'alun protégeait totalement les cobayes d'un challenge léthal par EBOV [228]. Or, il s'est avéré que le virus utilisé pour le challenge léthal était peu adapté au cobaye, puisqu'il n'entraînait la mort que de 4 des 13 animaux-contrôle. Une seconde étude a d'ailleurs montré qu'une inoculation de virus Ebola tué ne protégeait pas les cobayes d'une injection létale [229]. Des études ultérieures chez le PNH, dont le système immunitaire plus complexe est proche de l'homme, se sont révélées non concluantes. Ceci démontre ainsi la difficulté des modèles animaux de type rongeur à prédire l'efficacité de candidats vaccinaux chez le PNH, du fait des différences possibles dans la pathogénicité entre ces différentes espèces animales [230].

On démontra par la suite que le mode d'inactivation affectait de manière différente la structure et l'immunogénicité des protéines virales. Ainsi, l'inactivation vaccinale par utilisation d'une sonde alkylante photo-induite (INA) couplée à l'irradiation UV entraînait un vaccin protecteur chez la souris [231], alors que l'inactivation par gamma-irradiation qui hydroxyle les acides aminés et génère des radicaux libres détruisant les propriétés antigéniques de certains épitopes, forme des vaccins inactivés non protecteurs chez la souris et le PNH. De même, le vaccin EBOV Δ VP30 inactivé par du peroxyde d'hydrogène par souci d'innocuité, a permis la protection de tous les PNH vaccinés, malgré une légère diminution de l'antigénicité par rapport au vaccin EBOV Δ VP30. Il inactive le virus en déclenchant des cassures des brins d'ARN, préservant ainsi les épitopes antigéniques clés. [227]

7. Les vaccins recombinants

La nouvelle génération de vaccins, utilisant les techniques de recombinaison génétique, ont supplanté les techniques traditionnelles de production vaccinale consistant à atténuer un pathogène par modification de ses conditions de croissance ou à l'inactiver de manière physique ou chimique. Les avancées récentes dans les techniques de génie génétique, l'amélioration de nos connaissances en immunologie et sur la génomique des pathogènes, a permis l'élaboration d'approches moléculaires afin de délivrer l'antigène immunogène à la cellule présentatrice d'antigène, associé ou non à des molécules immunostimulatrices. Plusieurs plateformes vaccinales reposant sur ces techniques de recombinaison génétique ont été développées. On peut produire l'antigène immunogène *in vitro* par transfection du gène d'intérêt vaccinal dans des cellules de mammifères ou d'insectes. Il s'agit des vaccins sous-unitaires, permettant l'inoculation chez la personne à vacciner de la protéine immunogène

responsable de la production d'anticorps neutralisants protecteurs. On peut également produire des particules pseudo-virales, qui s'assemblent spontanément *in vitro*, par transfection cellulaire de gènes codant pour les protéines virales nécessaires à l'assemblage et à la libération du virion. Une autre technique consiste à apporter le gène d'intérêt vaccinal directement ou grâce à un vecteur viral non pathogène, permettant la synthèse *in vivo* de l'antigène d'intérêt vaccinal par la cellule-hôte, qui présentera ce dernier au système immunitaire. Un vecteur viral chimérique peut également exprimer à sa surface plusieurs antigènes d'intérêt vaccinal afin de les présenter au système immunitaire.

Plateforme vaccinale	Immunogène	Caractéristique	Efficacité en pré-exposition	Efficacité en post-exposition	Remarques
Plasmides d'ADN	GP, NP	Déficient pour la réplication	Multiples vaccinations (0-100%)	Non reporté	Nécessite stratégie prime-boost Efficacité limitée
Particules de réplicon du virus de l'Encéphalite Equine Vénézuélienne (VEEV)	GP, NP, GP/NP	Réplication unique	Multiples vaccinations (0-100%)	Non reporté	Nécessite stratégie prime-boost
Particules pseudo-virales (PPVs)	VP40/NP/GP	Déficient pour la réplication	Multiples vaccinations (0-100%)	Non reporté	Production Nécessite stratégie prime-boost
Adénovirus de type 5 (Ad5)	GP, NP GP/NP	Déficient pour la réplication	Injection unique (100%)	Non reporté	Immunité pré-existante Nécessite forte dose
Virus Parainfluenza Humain de type 3 (VPIH3)	GP, GP/NP	Virus répliatif atténué	Injection unique (50-100%)	Non reporté	Immunité pré-existante Sécurité
Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV), sérotype indien	GP	Virus répliatif atténué	Injection unique (100%)	Injection unique (50 à 100%)	Sécurité

Tableau 6. Différentes plateformes vaccinales prometteuses chez le PNH. L'Adénovirus de type 5 et le virus de la Stomatite Vésiculeuse constituent une approche vaccinale intéressante, par leur capacité à induire une protection totale des PNH contre le virus Ebola, avec une injection unique. (D'après Geisbert et Feldmann) [218].

7.1. Vaccins sous unitaires

La GP étant la protéine clé immunogène, des stratégies consistant à apporter directement cet antigène à la cellule-hôte afin de produire une grande quantité d'anticorps neutralisants spécifiques ont été développées.

On a purifié la GP produite par des cellules d'insectes préalablement transfectées par un *Baculovirus* recombinant contenant le gène de la GP virale. Son utilisation chez le cobaye,

soit en immunisation unique, soit comme rappel après un vaccin à ADN a permis uniquement une protection partielle des cobayes vaccinés, malgré la production importante d'anticorps neutralisants. Il n'y avait pas de corrélation entre le taux d'anticorps neutralisants et la protection vaccinale [232].

Pour augmenter l'efficacité de ce vaccin sous-unitaire, on a produit dans des cellules de mammifères une protéine recombinante constituée de la partie extracellulaire de la GP d'EBOV fusionnée au fragment Fc d'une immunoglobuline humaine IgG1 (EBOVGP-Fc). On a utilisé des cellules de mammifères car les modifications post-traductionnelles et glycosylations variaient légèrement dans les cellules d'insecte et pouvaient expliquer cette protection partielle, affectant la structure des épitopes, la formation de la GP trimérique et la stabilité de la protéine soluble vaccinale sGP. Le fragment Fc a été utilisé pour simplifier la purification de la GP, augmenter la stabilité de la protéine de fusion, et pour son effet immunostimulant par interaction avec le récepteur Fcγ présent sur les cellules présentatrices d'antigène. Chez la souris, une primo-immunisation avec ce vaccin conjugué aux adjuvants de Freund complets, suivi de 3 administrations successives avec des adjuvants de Freund incomplets a protégé 90% des souris immunisées, avec production d'anticorps neutralisants anti-GP et déclenchement d'une réponse cellulaire T spécifique. Ces résultats doivent être confirmés chez le cobaye et le PNH, avec l'utilisation d'autres adjuvants utilisables chez l'homme permettant d'augmenter l'immunogénicité d'EBOVGP-Fc [233].

7.2. Les particules pseudo-virales

Les particules pseudo-virales (PPVs) sont des particules ressemblant morphologiquement au virion infectieux, constituées des protéines structurales de surface du virus qui s'assemblent spontanément suite à leur production *in vitro*. Elles sont dépourvues d'information génétique, ce qui en fait des particules non infectieuses incapables de se répliquer.

L'intérêt de ces PPVs est qu'elles permettent une présentation au système immunitaire des protéines de surface du virus fortement immunogènes, stratégie plus efficace pour induire la production d'anticorps neutralisants comparée aux antigènes solubles. Ces PPVs sont produites facilement *in vitro*, sont non infectieuses et donc sécuritaires, ce qui est particulièrement important pour le virus Ebola. Elles ne contiennent pas la protéine VP35, facteur de virulence de ce *Filovirus*. Il est possible d'incorporer dans ces PPVs des molécules

qui permettent de cibler les cellules dendritiques ou stimulent l'immunité. Ce type de vaccination s'est déjà révélé efficace pour le Papillomavirus, le Parvovirus et Rotavirus. [234]

On obtient des PPVs d'Ebola en faisant exprimer par les cellules de mammifères 293T ou cellules d'insectes les gènes codant pour la protéine de matrice VP40 et la GP du virus Ebola, qui vont ensuite s'assembler spontanément *in vitro*, grâce à la présence des radeaux lipidiques membranaires. L'expression de la protéine VP40 est suffisante pour la formation de PPVs et leur bourgeonnement à partir de la membrane plasmique. Néanmoins, l'interaction de VP40 avec la GP est importante dans la morphogénèse de ces PPVs. [235]

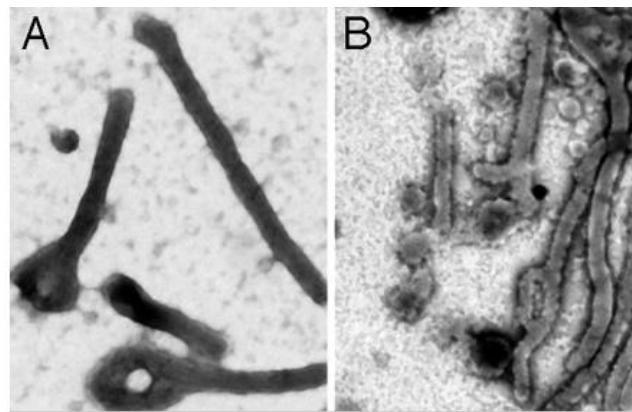


Figure 30. Photographies de particules pseudo-virales morphologiquement identiques au virus Ebola infectieux, visibles au microscope électronique. A. Cellules VeroE6 infectées par le virus Ebola Zaïre. B. Transfection de plasmides codant pour les gènes de la GP et de la protéine VP40 du virus Ebola dans des cellules de mammifère 293T permettant la production de particules pseudo-virales morphologiquement et antigéniquement similaires au virus Ebola infectieux, s'assemblant spontanément *in vitro*. (D'après Warfield et al.) [236]

Chez la souris, trois immunisations successives par ces PPVs produites par des cellules de mammifères 293T a permis la protection totale des animaux contre un challenge létal avec une souche d'EBOV adaptée à la souris. Ces PPVs entraînent la maturation des cellules dendritiques murines *in vitro*, premières cibles de l'infection virale dont le défaut de maturation explique l'échec du déclenchement de la réponse immune adaptative anti-Ebola. Ces PPVs activent chez la souris la réponse innée, augmentant le nombre de lymphocytes *Natural Killer*, et les deux types de réponse adaptative, cellulaire ainsi qu'humorale avec la production de titres élevés d'anticorps neutralisants de manière dose dépendante. Néanmoins, le titre d'anticorps totaux ou d'anticorps neutralisants n'est pas prédictif de la protection

vaccinale, ce qui montre que la réponse humorale n'est pas suffisante pour expliquer la protection des souris vaccinées [236,237]. L'utilisation de souris transgéniques a montré que les deux types de réponses immunitaires adaptatives, cellulaire CD8+ et humorale seraient requises pour la protection vaccinale [238].

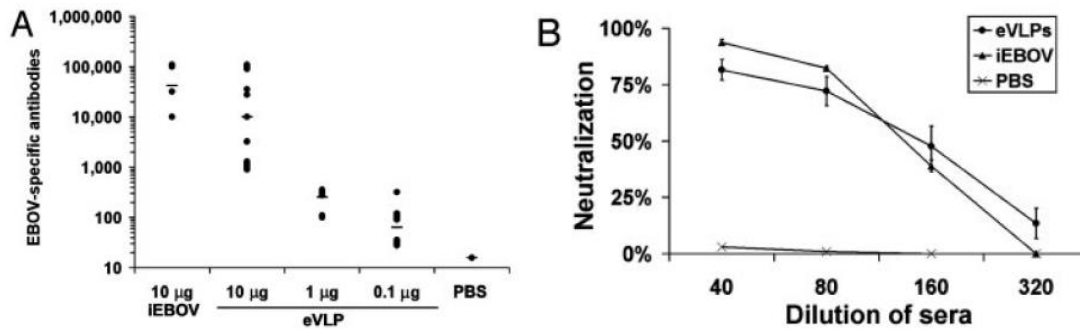


Figure 31. Comparaison des titres d'anticorps entre le vaccin constitué de virus Ebola inactivés (iEBOV) et le vaccin constitué de PPVs (eVLPs). Malgré des titres d'anticorps anti-Ebola (A) et d'anticorps neutralisants (B) similaires entre iEBOV et eVLPs à la même dose vaccinale, le vaccin inactivé n'induit qu'une protection marginale des souris vaccinées comparée au vaccin par particules pseudo-virales, démontrant ainsi que la protection vaccinale n'est pas corrélée au titre d'anticorps. (D'après Warfield et al.) [236].

Combiné à un adjuvant, ces PPVs ont montré une protection totale des souris immunisées après deux immunisations successives [239]. Chez le cobaye, une injection unique d'un vaccin « pan-Filovirus » contenant un mélange de PPVs contenant la GP du virus Ebola et celle du virus Marburg a permis la protection des cobayes contre un challenge par ces deux *Filovirus* [240].

Chez le PNH, trois immunisations successives de PPVs contenant la NP, la GP et la protéine VP40 virales combinées à un adjuvant a protégé 100% des macaques vaccinés [241]. De même, un vaccin à base de PPVs produites par des cellules d'insectes transfectées par un vecteur *Baculovirus* recombinant, permettant une production en masse de ce vaccin, s'est révélé également protecteur chez la souris [242].

7.3. La vaccination génétique ou vaccins à ADN

Dans les essais précédents, l'immunité humorale s'étant révélée non suffisante pour protéger contre une infection à virus Ebola, des stratégies de vaccination génétique ont été élaborées pour activer les réponses immunitaires cellulaires et humorales.

Née dans les années 1990, la technique d'« immunisation génétique » ou vaccins à ADN se révélait très prometteuse. Son principe est simple, on injecte chez la personne à vacciner un plasmide bactérien qui grâce aux techniques de génie génétique, contient le gène codant pour l'antigène d'intérêt vaccinal, ici la GP ou la NP virale. Ce gène qui est sous contrôle d'un promoteur approprié, va être transcrit *in vivo* au sein de la cellule, qui va exprimer à sa surface le peptide antigénique pour qu'il soit présenté au système immunitaire. L'immunisation peut se faire par voie intramusculaire, ou par voie transcutanée, par la technique du « fusil à gène » qui va bombarder la peau de microparticules d'or ou de tungstène enrobées du gène d'intérêt permettant la pénétration cellulaire, et la réduction des doses d'ADN injectées [243-245].

Les avantages : Ces vaccins sont facilement productibles en masse, leur coût de production est faible. Ils sont stables à température ambiante, ne nécessitant pas de respect de la chaîne du froid et permettent de vacciner contre des antigènes rares ou difficiles à produire. La tolérance de ces vaccins s'est avérée excellente lors de différents essais cliniques chez le PNH et l'homme. De plus, ils ne nécessitent pas l'utilisation d'adjuvants toxiques mais il est néanmoins possible de rajouter des gènes immunostimulateurs, permettant d'activer le processus de présentation d'antigène.

Ces vaccins ADN vont activer les trois types de réponses immunitaires, la réponse T cytotoxique, T auxiliaire et humorale. Ils stimulent fortement la réponse cellulaire cytotoxique par la synthèse d'antigène *in vivo* dans la cellule à partir du brin d'ADN injecté permettant la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8+ via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I. Les vaccins ADN auraient ainsi la même efficacité que les vaccins vivants atténués sur l'activation de la réponse cellulaire, sans présenter de risque d'infection ou de réversion du pathogène. La persistance de la synthèse antigénique à partir de l'ADN épisomal présent dans la cellule, va permettre d'induire une réponse immunitaire de longue durée. L'antigène sera reconnu par la cellule présentatrice d'antigène qui le présentera elle-même aux lymphocytes auxiliaires CD4+ via le CMH de type II.

Les séquences CpG non méthylées des plasmides bactériens, immunostimulatrices, vont orienter la réponse vers un profil Th1, renforçant ainsi la réponse cellulaire cytotoxique par la sécrétion d'IFN- γ . Ces motifs bactériens stimulent également la réponse innée en activant les cellules « *Natural Killer* ».

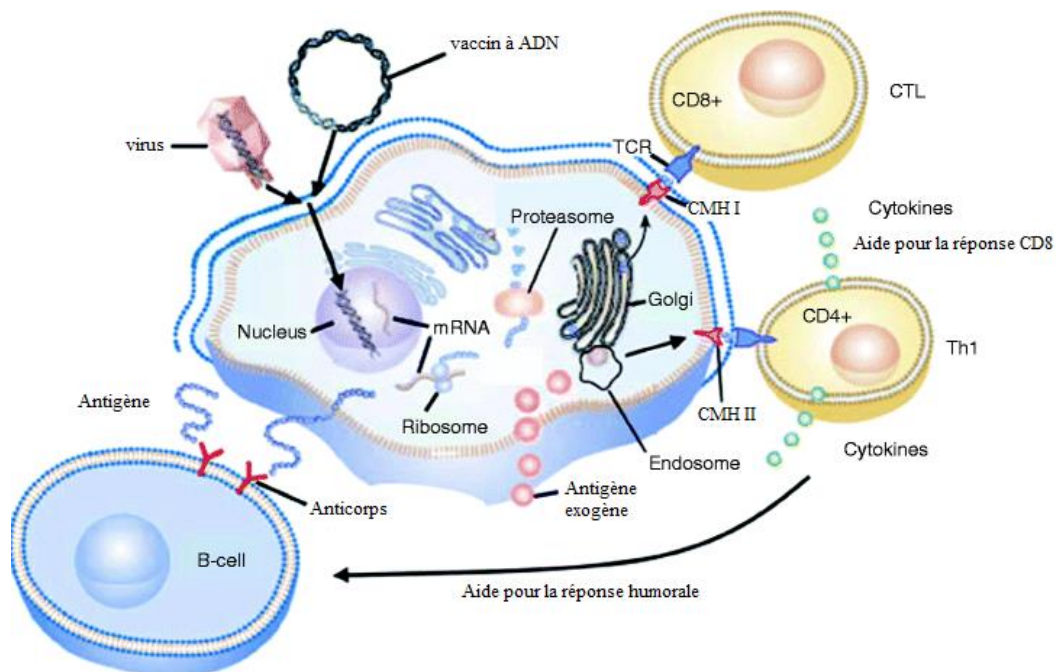


Figure 32. Réponse immunitaire déclenchée par l'injection de vaccins à ADN. Tout comme l'inoculation de vaccin vivant atténué, les vaccins à ADN permettent le recrutement des complexes majeur d'histocompatibilité de type I et II (CMH I et II) présents sur la cellule présentatrice d'antigène permettant d'activer la réponse LT8 cytotoxique et LT4 qui aide à la mise en place de la réponse cellulaire et humorale, ainsi qu'à l'établissement de la mémoire immunitaire.

Les inconvénients : Malgré que les premières études sur la souris aient montré des réponses immunitaires fortes et durables engendrées par ces vaccins ADN, chez le PNH, les réponses sont moins persistantes et notamment la réponse anticorps s'est révélée d'intensité modeste. En effet, cette dernière est plus faible que celle engendrée par l'injection de l'antigène d'intérêt. Ceci a conduit à développer des stratégies de type « prime-boost » avec une première immunisation par un vaccin ADN permettant l'activation de la réponse cellulaire et l'orientation vers le profil Th1, et un rappel par injection de l'antigène d'intérêt afin d'amplifier la réponse humorale.

Les problèmes d'innocuité de ces vaccins à ADN doivent être soulevés, avec la possibilité d'intégration du gène dans le génome de l'hôte, activant potentiellement un oncogène ou inactivant un gène suppresseur de tumeur. Un mécanisme de tolérance

immunitaire a été retrouvée, notamment chez les jeunes animaux, où l'on observait une persistance du pathogène lors de son introduction, ceci pouvant s'expliquer par la production sur le long terme de l'antigène en faible concentration. Néanmoins, cette production est limitée par la réponse cytotoxique et par la réponse humorale lors des stratégies « prime-boost ». La possibilité de réaction auto-immune a été mentionnée avec la présence d'anticorps dirigés contre l'ADN, retrouvés notamment dans le lupus érythémateux disséminé, même si ces anticorps n'ont pas été retrouvés chez des animaux hyperimmunisés ou lors des essais chez l'homme [246].

Efficacité : Plusieurs études ont montré des résultats contradictoires chez les différents modèles animaux. Quatre inoculations sous cutanées par bombardement de particules de billes d'or enrobées des gènes de la GP ou de la NP du virus Ebola ont montré une protection chez 78% des souris vaccinées, et la protection était totale après augmentation de la dose vaccinale. Les deux types de vaccins ont entraîné une réponse T cytotoxique et humorale spécifique dose-dépendante, et une protection partielle persistait 9 mois après la dernière immunisation [247]. Une étude chez le cobaye a démontré l'efficacité protectrice de 4 injections intramusculaires successives de 100 µg de plasmides d'ADN codant pour la GP soluble (sGP) ou la GP transmembranaire, alors que les plasmides contenant le gène de la NP se révélaient insuffisamment protecteurs du fait de l'absence d'activation de la réponse cellulaire T, malgré des titres élevés d'anticorps. De même, 3 injections intramusculaires chez la souris de 50 µg de plasmides ADN codant pour la GP du virus Ebola a permis la production d'anticorps non neutralisants et la mise en place d'une réponse T cytotoxique, non retrouvée après vaccination par plasmides d'ADN codant pour la NP virale [69]. L'inoculation intramusculaire de plasmides d'ADN codant pour différentes protéines du virus Ebola s'est révélée inefficace chez le macaque de type cynomolgus.

Développement de la stratégie « prime-boost » pour renforcer l'efficacité des vaccins à ADN

Le développement de la stratégie de primo-immunisation suivie d'une injection de rappel hétérologue a montré une efficacité vaccinale chez le macaque nettement supérieure à une stratégie d'administration unique ou une primo-immunisation suivie d'un rappel homologue. On va ainsi immuniser l'individu contre un antigène donné en le présentant successivement par l'utilisation de deux voire trois vecteurs ou formulations différentes.

Des études préalables chez le cobaye avaient montré une efficacité de 100% contre une injection létale du virus Marburg par l'inoculation de plasmides ADN codant pour la GP

du virus Marburg suivie de l'administration d'un vaccin sous unitaire, la GP tronquée de son domaine transmembranaire, produite par un système d'expression à *Baculovirus*, couplée à un adjuvant immunogène. Une étude utilisant le même protocole avec la GP du virus Ebola s'est révélée non concluante. [222,232]

Chez le macaque, trois immunisations intramusculaires successives d'un plasmide codant pour les GP des 4 espèces du virus Ebola, boostées ensuite un an plus tard par l'administration d'un vecteur *Adénovirus* recombinant défectueux pour la réplication portant les gènes codant pour la GP et la NP virales, a permis l'induction de fortes réponses humorale et cellulaire. L'administration trois mois plus tard d'une dose létale du virus Ebola aux macaques préalablement immunisés a montré une protection contre l'infection, y compris contre l'espèce Bundibugyo non contenue dans le vaccin, démontrant ainsi la capacité de réaction croisée induite par ce protocole vaccinal. C'est le premier essai vaccinal contre le virus Ebola complètement protecteur chez le PNH [248,249].

Différents vaccins à ADN ont été testés lors d'essais cliniques chez l'homme. Un vaccin à ADN codant pour la GP dont la partie transmembranaire cytotoxique a été délétée et ayant subi certaines mutations, a été évalué lors d'essais cliniques de phase I en 2006. Ce dernier a été bien toléré sans effet secondaire notable. Trois immunisations ont été immunogènes, avec production d'anticorps spécifiques et activation d'une réponse cellulaire T spécifique. Un autre essai de phase I a été mené lors de l'épidémie de 2014-2015, avec 3 immunisations successives de vaccins ADN codant pour les GP sauvages d'EBOV et SUDV, qui ont été bien tolérées et ont déclenché une réponse cellulaire et humorale spécifique [250,251].

7.4. Développement des vecteurs viraux

Les vaccins à base de virus vivants induisent la meilleure protection vaccinale et la durabilité de cette protection dans le temps. L'idée a été d'utiliser des virus que l'on sait sécuritaires, par sélection de souches non ou peu pathogènes pour l'homme, dont la virulence aurait été atténuée, au génome suffisamment malléable pour intégrer des fragments d'ADN étranger, afin de les acheminer jusqu'à la cellule hôte.

L'utilisation de ces vecteurs viraux vivants atténués et génétiquement manipulés induit une réponse T cytotoxique élevée du fait de la présentation de l'antigène d'intérêt à la cellule

dendritique, soit par reconnaissance direct du vecteur viral portant l'antigène d'intérêt vaccinal, soit par reconnaissance de l'antigène exprimé par la cellule-hôte infectée par le vecteur viral. Les vecteurs viraux sont choisis de préférence non répliatifs pour la sécurité d'emploi relative au pouvoir pathogène résiduel, surtout chez l'immunodéprimé, mais également pour éviter les possibilités de recombinaisons génétiques avec des souches sauvages. La séroprévalence contre le vecteur viral doit être faible dans la population générale, car cette immunité anti-vecteur réduit considérablement l'efficacité vaccinale [252].

Vecteur	Genre	Type de génome	Réplication	Production en masse	Remarques
Virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV)	<i>Alphavirus</i>	ARN simple brin positif	Non	Complexe	Origine non humaine
Adénovirus humain de type 5 (rAd5)	<i>Adénovirus</i>	ADN double brin négatif	Non	Etablie	Immunité préexistante (remplacé par ChAd3) Dose importante nécessaire
Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)	<i>Rhabdovirus</i>	ARN simple brin positif	Oui	Etablie	Origine non humaine Possible neurotoxicité si administré en intranasal
Virus Parainfluenzae humain de type 3	<i>Paramyxovirus</i>	ARN simple brin négatif	Oui	Complexe	Immunité préexistante

Tableau 7. Propriétés des principaux vecteurs viraux utilisables pour la vaccination contre le virus Ebola. [253]

7.4.1. Particules de réplicon du virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela (VEEV)

Le VEEV est un petit virus enveloppé de genre *Alphavirus*, dont le matériel génétique est constitué d'ARN simple brin positif. Trois *Alphavirus* sont utilisés comme vecteur, le VEEV, le virus de la forêt de Semliki et le virus Sindbis. L'intérêt de l'utilisation du VEEV comme vecteur est qu'il est faiblement pathogène pour l'homme et que l'immunité préexistante anti-VEEV est faible, cette maladie étant essentiellement retrouvée du Nord de l'Argentine à la Floride. Il se réplique uniquement dans le cytoplasme, empêchant ainsi l'intégration ou la recombinaison avec l'ADN de la cellule-hôte. Ce virus possède un large tropisme cellulaire, produit d'importantes quantités d'antigène *in situ* à l'origine d'une forte réponse immunitaire. Son génome est relativement flexible. Ainsi, les gènes structuraux du VEEV vont subir une délétion et seront remplacés par le gène d'intérêt vaccinal. Ces vecteurs ARN appelés réplicons ont la capacité de se répliquer par eux-mêmes mais ne seront pas

encapsidés dans des particules virales en l'absence de production des protéines structurales du VEEV, effectuant ainsi un unique cycle de réplication, sans se propager de cellule à cellule. Lorsqu'il est administré dans les coussinets de la souris, il va cibler les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques de la peau, permettant ainsi la présentation de l'antigène initiant la réponse immunitaire adaptative. Des études chez la souris ont montré que ce vecteur déclenchait une forte réponse humorale ainsi qu'une réponse T cytotoxique. [254]

On va utiliser un réplicon d'ARN appartenant au VEEV que l'on va modifier génétiquement. On va ainsi remplacer les gènes de structure du VEEV par les gènes codant pour la GP et/ou la NP du virus Ebola. Les réplicons recombinants ont été insérés avec un promoteur eucaryote de type CMV, dans des pseudo-particules de VEEV produites par insertion par un *Baculovirus* de ses gènes structuraux dans des cellules de mammifères. L'avantage de ces pseudo-particules de VEEV est qu'elles n'induisent pas une forte immunisation anti-vecteur. Chez le cobaye, l'administration de réplicons d'ARN du VEEV recombinant codant pour la GP virale a montré une efficacité, alors que chez la souris, l'administration du VEEV codant pour la NP virale a été protectrice [255].

Trois immunisations à la dose de 10^7 particules infectieuses de VEEV exprimant la GP et/ou la NP d'EBOV n'ont pas protégé les macaques cynomolgus d'un challenge léthal à EBOV. Pourtant, le VEEV exprimant la GP +/- la NP de MARV avait montré une protection chez le PNH, ceci pouvant s'expliquer par les différences de pathogénicité entre les deux virus. [256] Néanmoins, une autre étude a montré que l'efficacité vaccinale était dépendante de la dose administrée, puisqu'une injection unique de 10^{10} particules infectieuses de VEEV codant pour la GP d'EBOV a protégé les macaques d'un challenge léthal à EBOV. Pour autant, le vaccin n'induit pas de protection croisée puisque l'administration intramusculaire unique chez le macaque de réplicons du VEEV codant pour la GP de SUDV a protégé contre une injection létale de cette même souche virale, mais pas contre la souche EBOV. L'administration concomitante des gènes des 2 GP virales a protégé contre une injection létale à EBOV et SUDV. De même, deux injections intramusculaires du gène de la GP de SUDV ont protégé d'une contamination par aérosol par SUDV. Ainsi, ce vaccin VEEV nécessite de fortes doses vaccinales pour être efficace et la question d'immunité préexistante doit être évaluée [257].

7.4.2. Particules de réplicon du virus Kunjin exprimant la GP virale

Un vaccin basé sur les particules de réplicon du virus Kunjin, membre de la famille des *Flavivirus* a été testé chez le cobaye. Comme pour le VEEV, les particules de réplicon du virus Kunjin contenant le gène de la GP d'EBOV sont incorporées dans des particules pseudo-virales. Ce vecteur viral a protégé 86% des cobayes vaccinés. [258]

7.4.3. Virus Parainfluenza humain de type 3 (HPIV3)

Une seule inoculation intranasale du virus recombinant répliatif HPIV3 exprimant la GP seule ou associée à la NP virale d'EBOV a protégé les cobayes contre une injection létale intrapéritonéale de cette même souche [259]. Chez le PNH, deux inoculations par voie respiratoire sont nécessaires pour protéger complètement d'une injection létale, démontrant ainsi la capacité de ce vecteur viral à induire une immunité muqueuse [260]. Chez les macaques préalablement immunisés par HPIV3, le vaccin est faiblement immunogène, nécessitant d'augmenter le nombre de doses vaccinales pour obtenir une efficacité protectrice. [261] Pour contrecarrer l'immunité anti-vecteur préexistante chez certaines personnes, compte tenu de l'importante séroprévalence du virus HPIV3, un nouveau vecteur recombinant chimérique a été développé, avec délétion des gènes des glycoprotéines F et HN qui seront remplacés par le gène de la GP virale, seule protéine transmembranaire exprimée. Ce vecteur, aux capacités répliatives atténuées est toujours hautement immunogène chez le cobaye. [262]. L'utilisation d'un *Paramyxovirus* aviaire comme vecteur, le virus Newcastle, afin de résoudre le problème d'immunité préexistante, s'est révélé moins immunogène que le HPIV3, mais demeure néanmoins protecteur dans des stratégies « prime-boost » hétérologues. [263]

7.4.4. Virus recombinant de la Rage

Il appartient à la famille des *Rhabdovirus*, virus constitué d'ARN monocaténaire de polarité négative. Le virus de la Rage s'est révélé être un excellent vecteur viral dans des essais de vaccination contre le VIH ou l'hépatite C. L'intérêt d'un vaccin bivalent contenant les protéines virales de la Rage et du virus Ebola permettant d'immuniser contre ces deux virus serait profitable en Afrique où la rage cause plus de 24 000 décès chaque année. Un virus de la Rage atténué répliatif (RV-GP), non répliatif par délétion de la GP rabique (RVΔG-GP), et un virus chimiquement inactivé ont été utilisés comme vecteur viral pour exprimer la GP du virus Ebola. Les trois candidats vaccinaux étaient non virulents après inoculation intra-thalamique chez les souris adultes, mais RVΔG-GP à la différence de RV-GP n'a pas montré de neurovirulence chez les jeunes souris, la GP du virus Ebola ne se substituant pas à celle du virus rabique qui a été soustraite, pour produire des virions

infectieux répliatifs. Chez la souris, ces vaccins protègent contre une injection létale du virus Ebola et du virus rabique et induisent de robustes réponses humorale et cellulaire dirigées contre la GP du virus Ebola. La réponse humorale était toujours présente chez les souris préalablement immunisées contre le virus de la Rage [264]. Une seule injection du virus répliatif recombinant de la Rage exprimant la GP virale a protégé partiellement les souris d'un challenge létal, alors que chez le PNH, deux injections vaccinales ont été complètement protectrices [265]. Par souci d'innocuité, l'inoculation du virus tué chez le PNH, conserve également ses propriétés immunogènes, car est toujours partiellement protecteur.

7.4.5. Virus recombinant de la Vaccine

C'est le premier vecteur viral utilisé pour la vaccination contre le virus Ebola. Ainsi en 1998, des chercheurs ont évalué l'efficacité de l'administration du virus de la Vaccine recombinant portant le gène de la protéine VP24 du virus Ebola chez des cobayes. Même si ce vaccin n'a pas permis la survie des animaux, il a néanmoins prolongé leur durée de vie, stimulé l'immunité innée et induit une faible production d'anticorps [266]. De même, l'utilisation du virus de la Vaccine comme vecteur vaccinal recombinant dont le génome code pour la GP du virus Ebola a montré une efficacité chez la souris et le cobaye, mais pas chez le macaque. Le vecteur est actuellement utilisé comme rappel vaccinal dans la stratégie « prime-boost » du vaccin ChAd3-MVA ZEBOV.

7.4.6. Cytomégalo virus recombinant

Le Cytomégalo virus (CMV) est un virus hautement immunogène qui a montré récemment son efficacité comme plateforme vaccinale. Il pourrait être utilisé pour l'immunisation des grands singes en Afrique contre le virus Ebola, source de contamination humaine, du fait de ses propriétés de réinfestation et de dissémination dans la population cible, quelle que soit l'immunité préexistante anti-CMV, permettant ainsi d'obtenir une haute couverture vaccinale dans cette population inaccessible. Chez la souris, un virus recombinant murin exprimant l'épitope des cellules T CD8+ de la NP du virus Ebola fusionné à une protéine du CMV murin a montré une protection des souris vaccinées contre un challenge létal du virus Ebola, déclenchant une forte réponse cellulaire CD8+ durable, bien que la production d'anticorps anti-Ebola soit faible [267,268]. Chez le PNH, le CMV a montré son efficacité, mais l'immunité protectrice était de type humoral, avec absence d'immunité cellulaire anti-GP [269].

7.4.7. Adénovirus de type 5 défectif pour la réplication(rAd5)

Intérêt du vecteur Adénovirus

Les *Adénovirus*, famille de virus nus à ADN double brin linéaire, sont des vecteurs attractifs du fait de leur capacité à stimuler la réponse immunitaire innée et adaptative dans les cellules de mammifères, particulièrement recherchée pour la présentation d'antigène peu immunogène. Du fait de sa croissance importante en culture cellulaire, ce vecteur viral est produit facilement et à faible coût. Son tropisme particulier pour les cellules épithéliales lui permet de cibler l'immunité muqueuse et systémique. Le rAd5 est déficient pour la réplication, par délétion du gène E1, et généralement le gène E3 subit également une délétion pour permettre l'insertion d'un gène étranger. Son utilisation comme vecteur vaccinal a été testée pour de nombreux pathogènes comme le VIH ou *Plasmodium*. [270]

Efficacité vaccinale

Ce vecteur Adénoviral rAd5 a été initialement utilisé comme rappel vaccinal, un an après l'inoculation de vaccin ADN codant pour la NP et les GP de différentes souches du virus Ebola [248]. Néanmoins, on comprend la nécessité d'un vaccin rapidement immunogène dans un contexte épidémique. Ainsi, chez le PNH, une seule immunisation avec un mélange de vecteurs rAd5 portant les gènes codant pour la GP ou la NP du virus Ebola a complètement protégé les PNH contre un challenge léthal de ce même virus, administré 1 mois plus tard, malgré une réponse humorale plus faible que celle induite par les administrations répétées de vaccin ADN [271]. Puis une autre étude a montré qu'une seule inoculation de 10^{10} particules de rAd5 exprimant uniquement la GP d'EBOV (rAd5-EBOV-GP) était également protectrice, avec production de titres élevés de cellules CD8+ et d'anticorps spécifiques. [10] Un vaccin bivalent cAdVax constitué d'un complexe adénoviral contenant les gènes des GP des virus EBOV et SUDV protège les PNH d'un challenge léthal par voie parentérale ou par aérosol [272]. Dans la recherche d'un vaccin « pan-*Filovirus* », un vecteur complexe cAdVax recombinant exprimant les GPs de différentes souches du virus Ebola et Marburg a été administré au PNH, et ce vaccin s'est révélé protecteur contre différentes espèces de *Filovirus*, après deux immunisations [273]. Chez le PNH porteur du VIH simien, le rAd5-ZEBOV-GP est immunogène mais la production rapide d'anticorps anti-rAd5 limite la réponse immune lors d'injections répétées de ce même vecteur. Il faut préférer le protocole ADN/rAd5 pour générer une réponse durable et de bonne amplitude chez ces PNH immunodéprimés. [274]

Dose vaccinale

L'administration de fortes doses, à partir de 10^{13} particules d'Adénovirus, est toxique pour le PNH et pour l'homme. [275] Ainsi, des études visant à évaluer l'innocuité vaccinale ont montré que l'administration intramusculaire de 2×10^{11} de rAd5 et rAd35 ont été sûres et appropriées pour la vaccination chez l'homme. [276] Chez le PNH, la dose minimale efficace de rAd5 exprimant la GP du virus Ebola est de 10^{10} particules. Ainsi, lors des essais cliniques chez l'homme, les doses de 2×10^9 à 2×10^{11} particules seront utilisées.

Mécanismes immunitaires impliqués

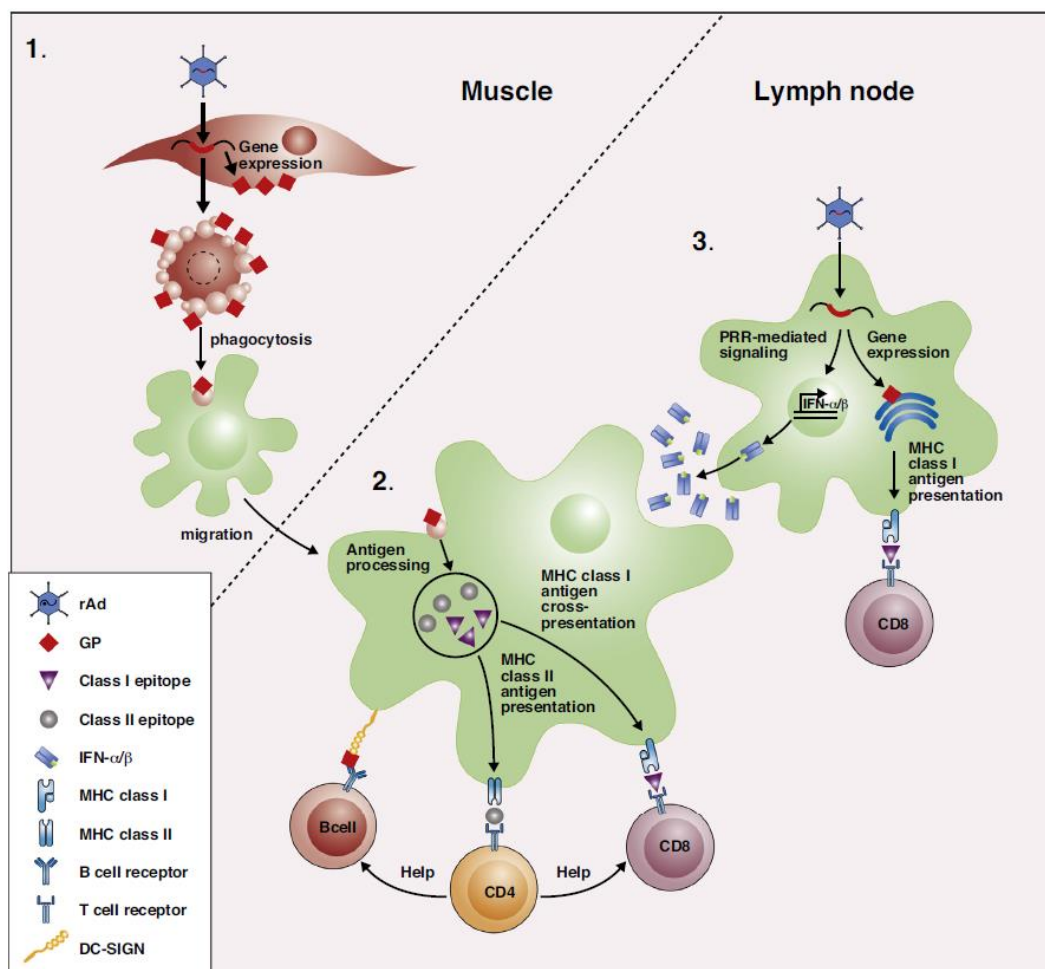


Figure 33. Mécanismes immunitaires déclenchés par l'inoculation de rAd5-GP non répliatif. 1. Lors de l'injection intramusculaire de rAd5, la cellule musculaire, qui va exprimer le gène de la GP, va devenir apoptotique sous l'effet cytotoxique de la GP virale, permettant sa phagocytose par la cellule présentatrice d'antigène (CPA). 2. Dans le ganglion lymphatique, la CPA activée va permettre le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative cellulaire (lymphocytes T CD8+) et humorale (lymphocytes B) dirigée contre la GP virale 3. L'expression du gène de la GP dans la CPA va induire la production d'interféron de type I qui permet la maturation de la CPA et améliore la fonction effectrice des CD8+ (D'après Zhou et Sullivan) [221].

Corrélat immunitaire de protection vaccinale

Chez le PNH, la protection vaccinale lors des essais par vaccin à ADN suivi d'un rappel par rAd5 ou par injection unique de rAd5, est corrélée au titre d'anticorps spécifiques IgG anti-GP virale détectables par test ELISA [223,277]. Néanmoins, les cellules CD8+ ont un rôle majeur dans la protection immunitaire induite par le vaccin rAd5 contre le virus Ebola. Ainsi, la déplétion de cellules CD3+ après la vaccination et juste avant le challenge létal, abroge la protection vaccinale chez 2 macaques sur 5 et celle des cellules CD8+ élimine la protection vaccinale chez 4 des 5 macaques immunisés. De plus, le transfert passif d'IgG polyclonales issues de macaques vaccinés par ADN/rAd5 à des animaux naïfs a échoué à les protéger contre le virus Ebola. [278]

Les études ont également montré que chez les macaques qui avaient été infectés naturellement par l'Ad5 sauvage, la protection vaccinale contre le virus Ebola était abolie malgré la production d'anticorps dirigés contre la GP virale. Chez ces macaques, la réponse cellulaire T CD8+ était diminuée, du fait de l'immunité anti-vecteur qui empêchait l'infection naturelle de la cellule hôte par l'Ad5 et la présentation au système immunitaire. La protection croisée contre la souche Ebola Bundibugyo lors de l'inoculation de plasmides codant pour la GP d'EBOV et SUDV serait due à la réactivité croisée des cellules T et non des anticorps, démontrant ainsi qu'une immunité cellulaire robuste permet une protection croisée contre une nouvelle souche émergente. [70,249,279]

Ainsi les anticorps anti-GP virale permettraient de contenir la réplication du virus Ebola, mais la réponse cellulaire cytotoxique CD8+ serait indispensable afin d'éliminer les cellules infectées par le virus. Le taux d'anticorps anti-GP serait donc un corrélat de protection vaccinale, comme marqueur quantitatif de la totalité des réponses cellulaires et humorales nécessaires à la protection vaccinale.

L'inoculation d'autres sérotypes de vecteurs rAd, les rAd35 et rAd26, générant un taux d'anticorps anti-GP et des réponses cellulaires CD4+ et CD8+ comparables au rAd5, échouaient à protéger les macaques contre un challenge létal. L'analyse des profils cytokiniques des lymphocytes T a montré que la production simultanée de TNF α et INF γ , qui favorisaient l'activité cytolytique, était protectrice. Dans les autres sérotypes, non protecteurs, cette population de lymphocytes était sous représentée. Les différences dans la qualité de la réponse CD8+ entre les sérotypes de rAd, peut s'expliquer par le ciblage de différents récepteurs cellulaires *in vivo*.

Ainsi, lors des essais cliniques futurs, par extrapolation des résultats trouvés chez le PNH à l'homme, les indicateurs d'une protection vaccinale seront un taux élevé d'anticorps anti-GP et de lymphocytes T CD8+ à profil TNF- α /INF γ . [221]

Réponses immunitaires et efficacité protectrice des vecteurs <i>Adénovirus</i> recombinants				
Vecteur	Protection (%)	Titre d'anticorps anti GP	Réponse des lymphocytes T CD8+	
			Magnitude	Qualité
rAd5	100	Elevé	Elevé	Bonne
ChAd3	100	Elevé	Elevé	Bonne
ChAd63	25	Faible	Faible	Intermédiaire
rAd35	17	Faible	Elevé	Pauvre
rAd26	0	Faible	Elevé	Pauvre

Tableau 8. Réponses immunitaires induites par différents sérotypes de vecteurs *Adénovirus* humains (rAd) et simiens (ChAd). La protection vaccinale n'est pas corrélée au titre de la réponse CD8+ mais à la qualité du profil cytokinique orienté vers la production de TNF- α /INF γ [221].

Essais cliniques de phase I

L'innocuité du vecteur rAd5 a été démontrée lors d'essais cliniques randomisés, en double aveugle, chez 31 volontaires sains, puisqu'aucun effet secondaire sérieux n'a été notifié. Le vaccin est immunogène car tous les volontaires ont développé une réponse humorale et cellulaire spécifique anti-GP virale en 14 jours. Néanmoins, l'administration de rAd5 EBOV-GP à la dose de 2×10^9 ou 2×10^{10} s'est révélée peu immunogène chez l'homme, avec production de faibles titres d'anticorps anti-GP (300 pour environ 2000 chez le PNH). Comme vu précédemment avec le PNH, chez les personnes possédant une immunité préexistante anti-Ad5, l'efficacité vaccinale est réduite. [70,280]

Stratégies de contournement de l'immunité anti-vecteur

Présumée initialement rare, la séroprévalence à *Adénovirus* s'est révélée importante lors d'études sérologiques dans différents pays, avec 85,2% de personnes positives à l'Ad5. L'augmentation des doses vaccinales permet de surpasser cette immunité préexistante mais le vecteur adénoviral est toxique à forte dose et la sévérité des symptômes est dose-dépendante. Le changement de la voie d'administration vaccinale, par induction d'une immunité muqueuse, peut résoudre les problèmes d'immunité anti-vecteur et maximiser l'efficacité vaccinale. Ainsi, chez les souris et les cobayes préalablement immunisés à l'Ad5, l'inoculation par voie nasale du vecteur rAd5-EBOV-GP a protégé ces animaux d'un challenge léthal par le virus Ebola. [281] Chez le PNH séropositif à l'Ad5, l'administration

intranasale et intratrachéale du vecteur rAd5-ZEBOV-GP a permis de contourner l'immunité anti-rAd5 et a protégé les singes vaccinés [282]. Néanmoins, son application vaccinale chez l'homme semble difficile à mettre en pratique.

Les vecteurs adénoviraux rAd de sérotypes 26 et 35 génétiquement différents du rAd5, ont une séroprévalence plus faible chez l'homme. Chez le PNH, le statut sérologique contre le rAd5 n'affecte pas l'efficacité vaccinale des vecteurs recombinants rAd26 et rAd35 exprimant la GP virale. Néanmoins, la qualité de la réponse cellulaire CD8+ spécifique est faible comparée à celle du rAd5 (cf. tableau 8). Une seule injection de rAd26 protège partiellement les PNH d'un challenge léthal, et un rappel vaccinal avec rAd35 un mois plus tard permet la protection totale de ces animaux. [283]

Du fait de la réduction de l'efficacité vaccinale chez de nombreuses personnes préalablement immunisées contre l'*Adénovirus* humain, des études utilisant des *Adénovirus* simiens comme plateforme vaccinale ont été menées. Ainsi, chez la souris et le cobaye, l'administration d'*Adénovirus* de chimpanzé 7 (AdC7) à faible dose (5×10^9 /kg) stimule les réponses cellulaires T et B spécifiques et est complètement protectrice. Les souris pré-exposées à l'Ad5 humain sont également protégées par ce vaccin d'origine simienne. [284]

Un vecteur chimérique d'*Adénovirus* simien 21 et 22 a été administré chez la souris, et a permis la production de cellules T exprimant INF γ mais la fréquence était diminuée et l'apparition plus lente par rapport au vecteur rAd5. Une seule injection était totalement protectrice chez la souris alors que chez le macaque, la protection était partielle. [285]

7.4.8. Le vaccin ChAd3-MVA ZEBOV

Le vecteur adénoviral de chimpanzé de type 3 (ChAd3) a été retenu par sa capacité à induire le même profil immunologique que le rAd5 après vaccination, avec un titre élevé d'anticorps anti-GP, prédicteur robuste de la survie, et de cellules CD8+ à profil INF γ /TNF α . Une étude sérologique en Europe montre un faible taux d'anticorps anti-ChAd3 dans la population générale. On a donc isolé à partir d'un ganglion lymphatique d'un chimpanzé le ChAd3, de structure similaire à l'ensemble des *Adénovirus* humains mais avec des différences suffisamment importantes dans les régions hypervariables de l'hexon pour éviter une neutralisation croisée par des anticorps dirigés contre l'*Adénovirus* humain. Cet *Adénovirus* simien a été modifié génétiquement pour être utilisé comme vecteur, les régions E1 et E4 ayant été supprimées, empêchant ainsi sa répllication *in vivo*.

Une seule injection du vaccin ChAd3 déficient pour la réplication a entraîné une protection de 100% des macaques vaccinés contre un challenge létal 28 jours plus tard. Sur le long terme, la protection était partielle puisque 50% des macaques ont survécu à l'exposition au virus Ebola 1 an après la vaccination.

Afin d'améliorer l'efficacité vaccinale sur le long terme la stratégie de « prime-boost » a été réévaluée. Pour la primo-vaccination, on a sélectionné le vecteur ChAd3, par sa capacité à induire une immunité rapide en 4 semaines, importante en cas d'épidémies, contrairement à la vaccination par plasmides d'ADN qui nécessitaient de répéter les injections, la protection étant obtenue après 6 mois. Les *Poxvirus* sont connus pour stimuler les cellules CD4+ requises pour une mémoire immunitaire sur le long terme. On a donc effectué un rappel en utilisant comme vecteur le virus de la Vaccine Ankara modifié codant pour la GP virale (MVA-GP). Ce vecteur viral a généré un taux élevé d'anticorps anti-GP après le rappel vaccinal, mais celui-ci ne reflète pas la durabilité de la réponse immunitaire. C'est la qualité du profil cytokinique des cellules CD8+ induites par le MVA-GP, sécrétant simultanément de l'INF γ , de l'IL2 et du TNF α , qui va refléter le potentiel d'immunisation à long terme. Ainsi, avec la vaccination par ChAd3 puis un rappel par MVA, 100% des macaques ont été protégés d'une injection létale à virus Ebola 10 semaines plus tard. [286]

Essais cliniques de phase 1

Compte tenu de l'efficacité du vaccin ChAd3 chez le PNH, et de la faible immunité préexistante anti-ChAd3 dans les échantillons de participants Européens, des essais de phase I ont été menés chez l'homme.

Essai clinique	Date	Localisation	Nombre de participants	Type de vaccination
<i>VRC 207</i>	2 septembre 2014	Etats Unis, VRC, NIH	20	Bivalent (ChAd3 GP Ebola Zaïre et Soudan) Dose : 2×10^{10} et 2×10^{11}
<i>EBL01</i>	17 septembre 2014	Angleterre, Oxford	60	Monovalent Dose : 1×10^{10} , $2,5 \times 10^{10}$ et 5×10^{10}
<i>CVD-1000</i>	8 octobre 2014	Mali, Bamako	91	Monovalent
<i>ChAd3-EBOZ Lau</i>	31 octobre 2014	Suisse, Lausanne	120	Monovalent, Etude randomisée Dose : $2,5 \times 10^{10}$, 5×10^{10} et placebo
<i>VRC 207 2^{ème} partie</i>	31 octobre 2014	Etats Unis, UMD	20	Monovalent, Etude randomisée 1 :1 Dose : 1×10^{10} et 1×10^{11}

Tableau 9. Les différents essais cliniques de phase I pour le vecteur ChAd3

Innocuité du vaccin ChAd3 chez l'homme

En ce qui concerne l'étude américaine VRC 207, aucun évènement indésirable grave ou inattendu n'est survenu au cours de l'essai clinique. Le vaccin est réactogénique, avec comme principaux effets secondaires, une fièvre modérée les 2 premiers jours répondant bien à un traitement par antipyrétique, une neutropénie ou leucopénie légère à modérée et transitoire, s'expliquant par l'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales suite à la réaction inflammatoire déclenchée par la vaccination. La vaccination a entraîné l'induction transitoire d'anticorps anti-phospholipides asymptomatique chez 3 participants, augmentant le temps de céphaline activé *in vitro*, mais n'entraînant pas de coagulopathie chez les participants, car les phospholipides ne sont pas limités *in vivo*. Il n'y a pas de dose toxique limite, le vaccin est très bien toléré aux 2 doses administrées (2^{10} et 2^{11} particules), bien qu'un peu plus réactogénique à dose élevée, avec un profil d'effets secondaires semblable à celui observé lors des études précédentes avec les vecteurs *Adénovirus*. [287]

Les autres essais cliniques de phase 1 ont montré le même profil d'effets secondaires, soulignant l'innocuité du vaccin ChAd3. Compte tenu du rapport genevois sur l'apparition d'arthrite chez certains participants suite à l'administration du vaccin VSV-ZEBOV une surveillance toute particulière de cet effet secondaire a été effectuée. Dans l'étude anglaise et malienne, 15% et 6% respectivement de douleurs articulaires légères à modérées ont été rapportées, se rétablissant en 48h. Aucun cas d'arthrite n'a été rapporté dans l'ensemble des essais cliniques de phase 1. [288]

Immunogénicité

Pour l'étude américaine, 4 semaines après la vaccination, tous les participants ont développé une réponse immunitaire contre la GP du virus Ebola Zaïre Mayinga ou Guinéenne.

- 90% des participants ont développé des anticorps anti-GP Ebola Zaïre Mayinga à faible dose, et 100 % à forte dose.
- 90% des participants ont développé des anticorps anti-GP Ebola Zaïre Guinéenne dans les deux groupes

Le taux moyen d'anticorps anti-GP est de 2037, similaire aux taux protecteurs observés dans les études chez le PNH (de 967 à 6600) pour la même dose vaccinale de 2^{10} .

- La réponse cellulaire CD4+ spécifique anti-GP a été positive chez 3 participants sur 10 à faible dose, et 10 sur 10 à forte dose.
- La réponse cellulaire CD8+ spécifique anti-GP a été positive chez 2 participants sur 10 à faible dose et 7 sur 10 à forte dose, avec production importante de cellules CD8+ polyfonctionnelles au profil cytokinique TNF α /INF γ , associé à la protection des PNH lors des essais précliniques.
- Le rappel par le virus de la Vaccine Ankara modifié a augmenté la réponse immune.

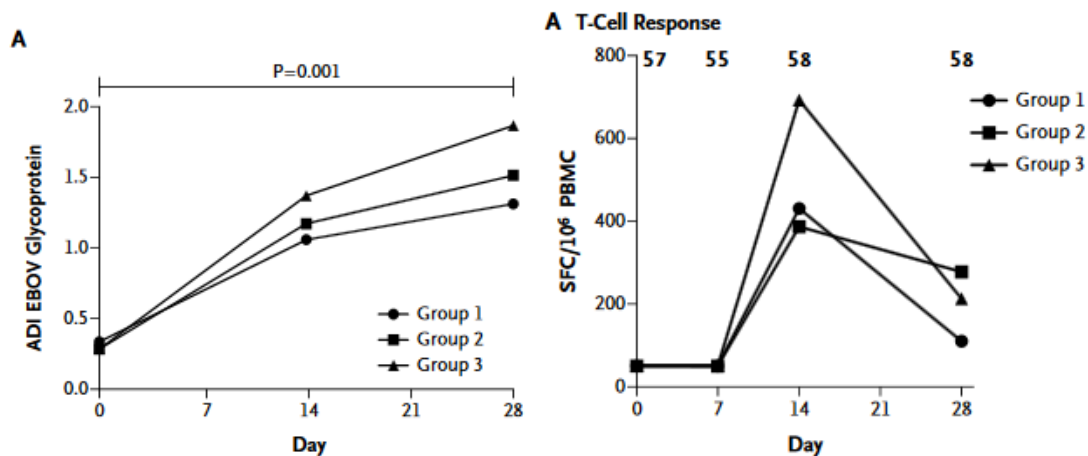


Figure 34. Réponse immunitaire suite à l'administration du vaccin ChAd3 ZEBOV dans l'étude EBL01. Le vaccin est immunogène, quelle que soit la dose administrée, (1×10^{10} particules pour le groupe 1, $2,5 \times 10^{10}$ pour le groupe 2 et 5×10^{10} pour le groupe 3) déclenchant une réponse immunitaire similaire à la réponse protectrice observée chez le PNH. Il y a une relation dose-réponse en ce qui concerne l'immunogénicité, qui est plus importante à la dose la plus élevée. [288]

Immunité anti vecteur

Avant la vaccination, les titres d'anticorps anti-ChAd3 chez les participants s'étendent de 0 à 911. Si on compare à l'immunité anti-rAd5 mesurée dans cette étude, les taux d'anticorps préexistants s'étendent de 0 à 8748. Les anticorps anti-ChAd3 ont été multipliés par 1,9 à la 4^{ème} semaine, ne portant pas atteinte à la réponse anticorps anti-GP ou cellulaire CD4+, mais une association modérément négative sur les titres de réponse CD8+ a été relevée. Reste à déterminer si le vaccin est immunogène chez la population Africaine, où le niveau d'anticorps anti-ChAd3 doit être supérieur à celui retrouvé aux Etats Unis et en Europe.

Les données concernant les essais de phase II et III n'ont pas encore été publiées.

7.4.9. Le vaccin rVSV-ZEBOV

Définition

Il s'agit d'un vaccin vivant atténué, utilisant le virus recombinant de la Stomatite Vésiculaire (rVSV) comme vecteur viral, exprimant à sa surface la glycoprotéine (GP) du virus Ebola Zaïre. Le rVSV est capable de se répliquer *in vivo*, les virus répliatifs induisant une forte réponse humorale et cellulaire chez leur hôte et nécessitant généralement une seule dose vaccinale, du fait de la synthèse intracellulaire d'antigènes spécifiques en concentration élevée et sur une période prolongée. Néanmoins, la capacité répliative du rVSV a été suffisamment atténuée pour empêcher sa diffusion *in vivo*.

Production

La technique de production du rVSV répliatif par génie génétique, à partir d'un brin d'ADN complémentaire a été développée il y a plus d'une dizaine d'années. L'ARN polymérase d'un bactériophage va transcrire cet ADN en ARN, qui une fois transfecté dans des cultures cellulaires, permettra la synthèse de protéines virales qui s'assembleront en un virus répliatif.

Des études d'innocuité avaient montré une neurotoxicité du vecteur rVSV lors de l'administration intra-thalamique chez la souris et le PNH, cette neurovirulence était directement liée à la GP du VSV. Un vecteur rVSV Δ G a été développé ayant subi la délétion du gène de la GP du VSV, permettant ainsi l'atténuation de sa virulence et l'addition du gène de la GP du virus d'intérêt vaccinal. Ce vecteur a montré son innocuité et son efficacité lors des essais de vaccination contre le virus Influenza et le VIH.

Pour produire ce virus recombinant permettant une immunisation contre le virus Ebola, on isole dans le génome du virus Ebola le gène codant pour la GP virale, que l'on insère dans le génome du virus VSV sauvage après délétion de sa GP virale. Le gène de la souche Ebola Zaïre, souche la plus mortelle, a été sélectionné. On obtient ainsi un vecteur viral chimérique, le rVSV exprimant en surface la GP du virus Ebola. [289]

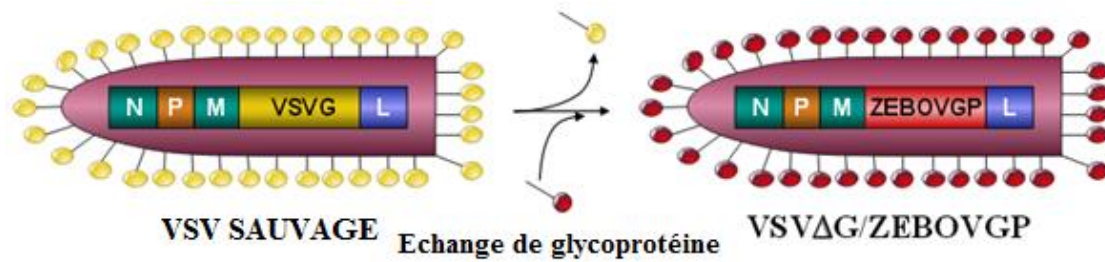


Figure 35. Le virus recombinant de la Stomatite Vésiculaire exprimant la glycoprotéine (GP) du virus Ebola (VSVΔG/ZEBOVGP). La GP du virus de la stomatite vésiculaire sauvage est remplacée par celle du virus Ebola Zaïre pour former un vecteur viral recombinant exprimant à sa surface l'antigène d'intérêt vaccinal. Sa production s'effectue par génie génétique, par délétion du gène de la GP du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG), et addition de celui de la GP du virus Ebola Zaïre (ZEBOVGP). [290]

Le virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)

Le VSV est un membre prototype de la famille des *Rhabdovirus* et son génome est constitué d'ARN simple brin de polarité négative codant pour ses 5 protéines structurales. Ce virus est à l'origine d'épizooties. La contamination s'effectue par contact direct entre les animaux mais également par l'intermédiaire d'un vecteur phlébotome. Les symptômes sont l'apparition de vésicules sur la langue, les lèvres, les muqueuses buccales, les trayons de l'animal et l'évolution est généralement bénigne. La transmission à l'homme est rare et la maladie reste généralement asymptomatique ou provoque un syndrome grippal léger. La prévalence chez l'homme est faible, mis à part quelques régions endémiques en Amérique du Nord ou au Panama.

Intérêt d'utiliser le VSV comme vecteur vaccinal

L'utilisation du rVSV atténué comme vecteur viral est relativement sécuritaire, dans la situation où le virus pourrait réacquérir sa virulence d'origine, du fait de la faible pathogénicité du VSV sauvage chez l'homme.

Le second avantage est la faible séroprévalence à VSV chez l'homme, contrairement à l'*Adénovirus* pour laquelle on avait une perte d'efficacité vaccinale due à l'immunité anti-vecteur, chez les personnes qui avaient été naturellement infectées par le virus.

La flexibilité génétique du VSV a permis le développement de rVSV qui exprime des gènes de protéines virales étrangères à des niveaux élevés. Le génome à ARN simple brin de VSV ne subit pas de réarrangement et ne peut donc pas subir de changements génétiques *in*

vivo. En outre, VSV se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées et ne subit pas de recombinaison génétique avec le génome de l'hôte.

Le VSV provoque une forte réponse humorale et cellulaire *in vivo*, et est capable de provoquer à la fois une immunité systémique et muqueuse, d'où la possibilité de vacciner par voie orale ou voie inhalée. Il se développe à des titres très élevés dans de nombreuses lignées cellulaires *in vitro* et peut être propagé dans presque toutes les cellules de mammifères.

Le VSV était déjà très utilisé comme vecteur dans la recherche expérimentale, et plusieurs études chez l'animal pour son utilisation potentielle comme vecteur vaccinal pour le VIH, le virus Influenza ou l'hépatite C, ont montré une efficacité vaccinale et l'absence d'effets secondaires. Son innocuité reste à valider mais son utilisation potentielle dans la création rapide de nouveau vaccin est un espoir pour les épidémies virales à venir, du fait de la possible réutilisation du vecteur rVSVΔG comme plateforme vaccinale. En effet, lors de l'inoculation du rVSVΔG, il n'y a pas de développement d'immunité anti-vecteur, puisqu'aucun anticorps neutralisant n'a été détecté lors des études chez l'animal. [290]

Développement du vaccin VSV-ZEBOV

Le vaccin VSV-EBOV a été développé par des chercheurs du laboratoire national de microbiologie du Canada et mis au point par l'Agence de la santé publique du Canada. La licence a ensuite été donnée à NewLink Genetics, ce vaccin étant exploité par Merck et Co.

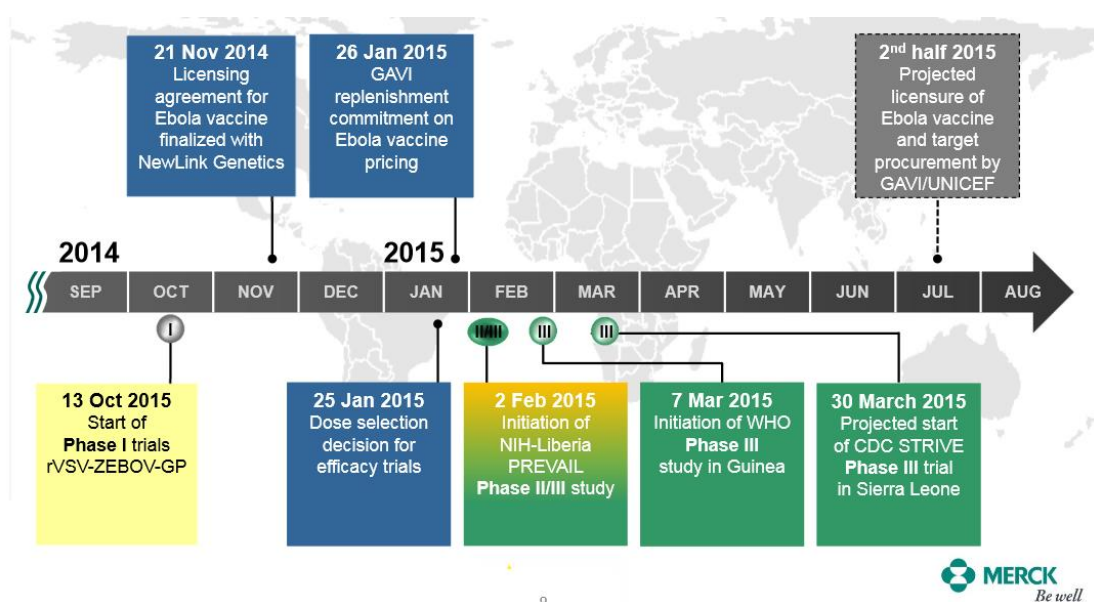


Figure 36. Accélération des essais cliniques du rVSV-ZEBOV en vue de l'obtention de l'AMM. (D'après MERCK®)

Etudes pré-cliniques

➤ Efficacité vaccinale chez les modèles animaux

En prophylaxie

Chez la souris BALB/C : Une injection unique du vaccin VSV-ZEBOV contenant la GP du virus Ebola Zaïre souche Mayinga, administré à des doses variant de 2 plaque forming-units (PFU) à 2×10^4 PFU a montré pour chaque dose, une protection complète des souris BALB/c immunisées contre une injection létale 28 jours plus tard, du virus Ebola Zaïre dérivée de cette même souche et adaptée à la souris, démontrant ainsi son efficacité à faible dose. Une protection complète a été obtenue quelle que soit la voie d'administration vaccinale (nasale, orale ou intra-péritonéale) montrant ainsi la capacité de ce vaccin à induire une immunité muqueuse. Le vaccin est capable d'induire une immunité stérile avec absence de signes cliniques de maladie à virus Ebola et de réplication virale chez les souris vaccinées. L'étude clinique a également montré que la protection vaccinale était rapide et durable, avec une protection complète des souris vaccinées 7 jours avant le challenge léthal et un maintien de cette protection vaccinale 9 mois plus tard, lors d'une nouvelle injection létale. [291]

Chez le PNH : Le vaccin VSV ZEBOV-GP a également montré une protection complète après l'administration d'une dose unique de 10^7 PFU, quelle que soit la voie d'administration (orale, nasale, parentérale), contre une dose létale du virus Ebola Zaïre administrée 28 jours plus tard sous forme intramusculaire ou d'aérosol. Il s'agit du premier vecteur vaccinal réplicatif à montrer une efficacité chez le PNH. On a par ailleurs pu montrer que les macaques étaient encore complètement protégés de l'infection, avec de robustes réponses humorale et cellulaire spécifiques, 6 mois après le challenge par Ebola Zaïre. De même, l'inoculation d'une dose létale du virus Marburg environ 14 mois après une immunisation par VSV-MARV-GP a été totalement protectrice, avec présence d'IgG anti-GP pendant toute la période pré-défi, montrant ainsi la durabilité de la protection immunitaire induite par cette plateforme vaccinale. [292-295]

En traitement post exposition

Chez la souris et le cobaye : Le vaccin a été testé comme potentiel traitement post-exposition au virus Ebola. Chez la souris et le cobaye, l'administration du rVSV-ZEBOV protégeait respectivement 100% et 50% des animaux d'une injection létale du virus Ebola Zaïre administré au plus tard dans les 24h. [296]

Chez le macaque rhesus : L'administration sur quatre sites différents à la dose de 2×10^7 de rVSV comprenant respectivement les GP d'EBOV, SUDV ou MARV, 20 à 30 min après une injection létale de leur souche virale homologue, a montré une protection totale pour les vaccins VSV-MARV et VSV-SUDV, mais celle-ci était partielle pour le VSV-ZEBOV, avec seulement 4 singes protégés sur 8 (50%). Pour SUDV, bien que les macaques aient été protégés, ils ont tous été virémiques et un singe a développé les signes cliniques de la maladie à virus Ebola. Ces différences peuvent s'expliquer par l'évolution clinique plus ou moins rapide entre les différentes espèces, EBOV évoluant plus rapidement. L'intérêt de cette étude est le développement possible d'un traitement post-exposition, après une contamination accidentelle par du personnel de laboratoire ou personnel de santé au contact d'un patient. Il a également un intérêt thérapeutique contre les *Filovirus* moins pathogènes, pour lesquels la maladie progresse plus lentement, comme TAFV ou BDBV. Pour le virus Marburg, l'essai a été renouvelé avec l'administration de VSV-MARV 24h après l'exposition virale qui a protégé 5 singes sur 6 de la maladie. Si on l'administrait 48 heures après, 2 singes sur 6 étaient protégés. [296-298]

Protection croisée

Entre les différentes souches : Compte tenu de la faible diversité génétique (environ 3%) entre les différentes souches du virus Ebola Zaïre, on peut raisonnablement penser que le vaccin sera efficace sur les différentes souches de cette espèce. Le vaccin VSV-EBOV dont la GP immunogène est issue de la souche Ebola Zaïre Kikwit, a été testé en avril 2015, sur la souche responsable de l'épidémie de 2014-2015 en Afrique de l'Ouest, Ebola Zaïre Makona, pour évaluer si les mutations acquises au cours de l'épidémie réduisaient l'efficacité vaccinale. Le temps nécessaire à l'obtention d'une immunité protectrice a également été évalué. 15 macaques cynomolgus ont été immunisés avec la dose maximale utilisée lors des précédents essais, de 5×10^7 PFU de VSV-ZEBOV, administrée 28, 21, 14, 7 ou 3 jours avant l'injection létale de 1000 PFU d'EBOV-Makona. Là encore, l'immunité protectrice a été obtenue rapidement puisque tous les singes ayant été vaccinés au moins 7 jours avant l'injection létale ont été complètement protégés, avec absence de signes cliniques de la maladie à virus Ebola et de répllication virale. La protection vaccinale était partielle chez les singes vaccinés 3 jours avant le challenge léthal puisque l'un d'eux est décédé alors que les autres ont développé des symptômes modérés de la maladie et ont survécu. Les survivants présentaient toujours des taux élevés d'anticorps neutralisants 42 jours après l'injection létale. Seuls les singes ayant été vaccinés au moins 14 jours avant l'injection létale, présentaient au

moment de l'injection un titre d'IgG spécifiques EBOV-GP $>10^4$, corrélé à la protection vaccinale, comme montré précédemment avec le vaccin rAd5-EBOV, et des titres similaires d'anticorps neutralisants dirigés contre les différentes souches EBOV Kikwit, EBOV Makona et EBOV Mayinga, démontrant ainsi que la protection croisée contre les différentes souches d'une même espèce du virus Ebola est possible. [299]

Pour le virus Marburg, une vaccination par rVSV-GP MARV souche Musoke a permis la synthèse d'IgG et d'anticorps neutralisants induisant une protection croisée contre un challenge léthal avec les souches Marburg Angola, Popp et même Ravn, la plus éloignée phylogénétiquement.

Entre les différentes espèces : Concernant le virus Ebola, chez la souris, l'administration de rVSV contenant la GP d'une espèce du virus Ebola permet l'induction d'une protection croisée contre les différentes espèces. Chez le cobaye et le PNH, l'administration unique de la GP comme protéine immunogène ne semble pas suffisante pour induire une protection croisée entre les différentes espèces virales. Ainsi, le rVSV-GP SUDV ne protège pas d'un challenge léthal par EBOV et inversement [300]. Alors que TAFV n'a pas protégé d'une infection léthale à BDBV, une seule injection de VSV-GP ZEBOV a montré une protection partielle de 75% contre BDBV. Or, chez ces animaux, la protection croisée est possible puisque les survivants à l'infection à TAFV ont survécu à un challenge léthal par SUDV et EBOV [301]. Elle peut être obtenue en augmentant la réponse immune par des stratégies « prime-boost » ou par l'inoculation de multiples immunogènes. Ainsi, chez le cobaye, l'administration de 2 doses de rVSV contenant à chaque fois 2 immunogènes, la GP et la NP de SUDV protège 5 cobayes sur 6 d'une injection à EBOV [302]. De même, chez le singe, une stratégie « prime-boost » hétérologue avec SUDV puis EBOV a montré une protection des macaques vaccinés contre BDBV [293]. La création d'un vaccin « pan-Filovirus » contenant en quantité égale un mélange de rVSV-GP de SUDV, EBOV, et MARV a permis une protection des singes vaccinés contre une injection léthale de ces différentes espèces et contre l'espèce TAFV [303].

Innocuité du vaccin

La sécurité vaccinale a été évaluée chez des souris immunodéprimées, compte tenu de la forte prévalence du VIH dans les régions d'Afrique où sévissent l'épidémie, constituant ainsi une forte population d'immunodéprimées. Des souris immunodéficientes ayant reçu une dose dix fois supérieure à la dose vaccinale maximale (2×10^5 PFU) n'ont pas développé de

signes cliniques de maladie vaccinale et aucun signe de réplication du vecteur vaccinal n'a été détecté [291].

Aucune toxicité n'a été constatée chez le PNH après inoculation intranasale de VSV sauvage, rVSV et de 2 vaccins rVSV-VIH, avec absence de détection du vecteur viral dans le sang et de diffusion dans les tissus cérébraux. [304] Une étude chez 21 macaques cynomolgus visant à déterminer la neurovirulence du VSV a montré des signes neurologiques importants chez 2 singes sur 3 après administration intrathalamique de rVSV sauvage et des lésions neuronales importantes, qui n'étaient pas retrouvés avec rVSV-ZEBOV ou rVSV-MARV, démontrant ainsi que la délétion du gène de la GP du VSV permet de supprimer cette neurovirulence. [305] A ce jour aucune toxicité n'a été relevée chez plus de 80 singes vaccinés par rVSV-ZEBOV ou rVSV-MARV. Le VSV-ZEBOV était détectable dans le sang uniquement au 2^{ème} jour après la vaccination, le système immunitaire inné permettant une clairance rapide du virus. La sécurité vaccinale a été testée chez une population de primates immunodéprimés. Sur les 6 singes vaccinés infectés par le virus de l'immunodéficience humaine simien, aucun n'a déclenché de signes de maladie associée à la vaccination. Le vaccin a protégé 4 des 6 macaques immunodéprimés suite à l'injection d'une dose mortelle du virus Ebola. Les animaux qui ont succombé avaient les taux de CD4+ les plus bas, ce qui suggère que ces cellules ont un rôle de médiation dans la protection contre le virus Ebola. [306]

Corrélat immunitaire de protection vaccinale

Plusieurs études ont montré que la protection vaccinale du vaccin rVSV-ZEBOV dépendait de la réponse humorale. Ainsi, on a pu montrer chez les modèles animaux que le taux de survie était corrélé à la concentration en anticorps IgG anti-GP virale. L'immunité cellulaire ne semble pas nécessaire. Chez la souris, la déplétion de cellules CD8+ au moment du challenge léthal ne compromettait pas la protection vaccinale, alors que le transfert passif de sérum de souris préalablement immunisées, entraîne une protection de 80 % des souris naïves, montrant ainsi le rôle important des anticorps dans la protection vaccinale. De plus, chez le PNH, la déplétion de cellules T CD8+ au moment de la vaccination n'empêche pas la survie de l'animal. La déplétion de cellules T CD4+ au moment de la vaccination, réduit la survie alors que cette déplétion au moment du challenge léthal n'empêche pas la survie de l'animal, les lymphocytes T auxiliaires intervenant ainsi dans la synthèse d'anticorps spécifiques et non

dans le déclenchement d'une réponse cellulaire cytotoxique via les LT CD8+. Le taux d'IgG spécifiques doit être supérieur ou égal à 10^4 pour être protecteur. [307]

Plusieurs études récentes ont montré que l'immunité innée participait à la protection vaccinale, en plus de l'immunité humorale. Dans l'étude utilisant la souche du virus Ebola responsable de l'épidémie de 2014-2015, la vaccination des singes 3 jours avant le challenge létal, avait montré une protection partielle de ces animaux, malgré une absence d'IgM et d'IgG anti-GP virale. Le VSV-ZEBOV a permis l'activation des macrophages, qui ont activé les cellules *Natural Killer* par production d'IFN de type I (non antagonisé par les protéines virales VP24 et VP35 non présentes dans le vaccin) et d'IL15 permettant d'établir une immunité innée antivirale précoce. Ceci va permettre de limiter la réplication virale, le temps nécessaire à la mise en place de l'immunité adaptative spécifique, et plus particulièrement la réponse humorale. [299]

Essais de phase 1

Les essais cliniques de phase 1 ont démarré aux Etats Unis en octobre 2014, par une étude en double aveugle sur 52 volontaires divisés en 2 centres de recherche différents comprenant chacun 26 volontaires, eux même subdivisés en 2 groupes comprenant 3 personnes recevant un placebo, 10 personnes recevant soit la dose de 3 millions de PFU ou la dose de 20 millions de PFU du VSV-ZEBOV. De novembre à décembre 2015, un essai de phase 1 a également eu lieu chez 158 patients sains en Europe (à Genève en Suisse et à Hambourg en Allemagne) ainsi qu'en Afrique (Lambaréné au Gabon et Kilifi au Kenya), recevant une dose de vaccin de 300 000 à 50 millions de PFU. L'objectif principal de cet essai de phase 1 est de déterminer l'innocuité, les effets secondaires potentiels et l'immunogénicité chez un petit nombre de volontaires sains, le vaccin n'ayant pas encore été testé chez l'homme.

a) Tolérance vaccinale

Dans l'étude américaine, les effets secondaires les plus courants étaient la douleur au point d'injection, des myalgies et l'asthénie. Il n'y a pas d'association entre la dose vaccinale et la fréquence ou la sévérité des effets secondaires rapportés.

Les résultats de l'étude Européo-africaine n'ont montré aucun effet secondaire grave lié à la vaccination. La réactogénicité était précoce et transitoire avec plusieurs réactions locales légères au point d'injection, une fièvre chez 35% des patients vaccinés. De faibles taux d'ARN du rVSV-ZEBOV ont été détectés au 3^{ème} jour après l'injection chez 94% des

participants, mais seul huit échantillons contenaient toujours une virémie positive au 7^{ème} jour. Le virus n'a jamais été détecté dans la salive et l'urine des patients. Des cas d'arthrite ont été signalés environ 11 jours après l'injection, chez près de 22% des patients à Genève, dont 3 participants ayant développé également une légère éruption maculopapulaire et des vésicules sur les doigts et les orteils, soulignant ainsi la réplication virale périphérique. Le fait que la virémie soit positive transitoirement chez la majorité des participants les jours suivant l'immunisation, suggère que la réponse antivirale innée par l'IFN de type I va limiter la réplication virale assez rapidement. La présence du VSV au niveau des articulations et de la peau chez certains participants prouve néanmoins que cette réponse innée n'est pas toujours suffisante pour contrôler la dissémination et la réplication virale, pouvant persister 2 à 3 semaines après l'immunisation, limitée aux tissus permissifs, résistants à l'IFN de type I. Les vésicules retrouvées chez les animaux infectés naturellement par le VSV ont la même localisation que celles retrouvées dans cette étude. L'arthrite, non retrouvée lors d'une infection naturelle par le VSV, semble être due au vaccin chimérique VSV-ZEBOV. Le mécanisme évoqué semblerait être un effet lytique direct du virus sur les cellules synoviales, puisqu'on détecte l'ARN viral au niveau du liquide synovial, même si on ne peut exclure une possible déposition de complexes immuns. Une réaction auto-immune semble peu probable, compte tenu de l'apparition précoce de l'arthrite (< 2 semaines) et de la faible capacité vaccinale à produire des anticorps pathogènes. L'atteinte épidermique et articulaire transitoire doit être comparée au bénéfice apporté par un vaccin efficace sur l'enrayement de l'épidémie meurtrière en Afrique.

b) Immunogénicité

Dans l'étude américaine, au 28^{ème} jour post-vaccination, tous les participants ont développé des anticorps IgG anti-GP détectés par test ELISA. Un effet dose réponse a été rapporté, les titres d'IgG anti-GP et anticorps neutralisants sont plus élevés après l'administration de 20 millions de PFU qu'après 3 millions de PFU du VSV-ZEBOV, recommandant ainsi l'utilisation de 20 millions de PFU comme dose vaccinale dans les essais de phase 2 et 3. Dans l'étude euro-africaine, bien que les titres d'anticorps anti-GP spécifiques du virus Ebola Zaïre soient similaires chez tous les participants, quelle que soit la dose administrée, de 300 000 à 50 millions de PFU, un effet dose réponse a été observé pour les anticorps neutralisants, avec des titres plus élevés pour des doses vaccinales importantes. [308,309]

Essais de phase 2

Essai clinique PREVAIL au Libéria (Monrovia)

Le 2 février 2015 débute à Monrovia, une étude randomisée en double aveugle comprenant 600 volontaires sains qui reçoivent soit une injection du vaccin ChAd3, soit le rVSV, soit un placebo. On va ainsi évaluer l'innocuité et l'efficacité du vaccin dans la population cible, à risque d'infection à virus Ebola. Les autorités espéraient que l'essai clinique de phase 3 au Libéria regrouperait ainsi 27000 volontaires sains, mais l'essai a été arrêté prématurément du fait du déclin du virus Ebola et du nombre insuffisant de participants.

Essai de phase 3

Essai en Sierra Leone

L'essai clinique a pour objectif d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de ce vaccin et est conduit à Freetown, dans les districts ruraux de l'ouest et certaines parties des districts de Bombali, de Port Loko et de Tonkolili qui ont tous été fortement touchés par l'épidémie. 6000 personnes vaccinées sont des professionnels de santé volontaires.

Essai clinique lancé par l'OMS en Guinée

Dès mars 2015, les professionnels de santé de première ligne dans les centres de traitement d'Ebola en Guinée ont été vaccinés, sans être inclus dans l'essai clinique de phase 3, atteignant ainsi 800 volontaires vaccinés en juin 2015. L'essai clinique « *Ebola ça suffit* » qui s'est déroulé d'avril à juillet 2015 en Guinée dans les communautés touchées par la maladie à virus Ebola, avait pour objectif principal d'évaluer l'efficacité du VSV-ZEBOV chez la population cible, la preuve de l'efficacité vaccinale n'ayant pas encore été apportée chez l'homme. Une stratégie de vaccination en ceinture a été adoptée, comme celle utilisée précédemment pour l'éradication de la variole. On va donc vacciner un groupe d'individus particulièrement à risque de développer la maladie, du fait de leur lien social ou géographique étroit avec la personne infectée. Il s'agit d'une étude ouverte, où dès la confirmation du diagnostic d'un nouveau cas, on définit un groupe comprenant tous les cas contacts au malade et contacts de ces contacts, puis on va leur assigner de manière randomisée 1/1, s'ils seront vaccinés immédiatement ou 3 semaines plus tard, l'utilisation d'un placebo n'étant pas éthique dans cette situation. L'étude comprend 4394 participants répartis en 90 groupes dont 48 groupes (2014 personnes) ont été assignés de manière randomisée à la vaccination immédiate et 42 groupes (2380 personnes) ont été assignés à la vaccination différée. La

vaccination est effectuée par une injection intramusculaire unique dans le deltoïde de 20 millions de PFU de VSV-ZEBOV.

a) Efficacité vaccinale

Aucune maladie à virus Ebola n'a été diagnostiquée 10 jours après la vaccination, chez le groupe de personnes vaccinées immédiatement, contrairement aux personnes qui devaient être vaccinées ultérieurement, où 16 cas de maladie à virus Ebola dans 7 groupes différents ont été diagnostiqués, démontrant ainsi que l'efficacité vaccinale du VSV-ZEBOV est de 100%. Il n'y a pas d'apparition de nouveau cas chez les personnes vaccinées, à partir du 6^{ème} jour post-vaccination, qu'elle ait lieu immédiatement ou de manière différée, démontrant ainsi que l'immunité se met rapidement en place, dès la première semaine. Néanmoins, il demeure des incertitudes quant à l'interprétation statistique des résultats : valeur de p qui n'atteint pas le seuil nécessaire pour conclure à une efficacité vaccinale, plusieurs biais dans l'étude. Des analyses supplémentaires seront disponibles dans un rapport final.

b) Tolérance vaccinale

Seul un épisode de fièvre importante chez un participant masculin sans aucune séquelle, relié à la vaccination, a été signalé comme effet secondaire sérieux. [12]

8. Mécanismes immunitaires impliqués dans la protection vaccinale

Bien que le mécanisme précis de protection immunitaire contre une infection à virus Ebola est complexe et semble impliquer différents effecteurs de l'immunité selon l'approche vaccinale, l'établissement d'un corrélat immunitaire unique relié à la protection vaccinale serait capital pour le développement et la commercialisation de futurs vaccins, et pour le suivi biologique des patients infectés par le virus Ebola.

La plupart des essais vaccinaux protecteurs ont ainsi pu démontrer que l'induction d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre la GP virale est à la fois nécessaire et suffisante pour protéger contre une infection à virus Ebola, malgré la production virale d'une protéine soluble non structural sGP partageant des épitopes communs avec la GP virale, qui va détourner la réponse humorale et peut entraîner une subversion de la réponse immunitaire adaptative, si le vaccin n'induit pas rapidement une immunité stérile.

La production d'anticorps anti-GP virale semble être importante dans la protection contre la maladie à virus Ebola. Ainsi, chez la souris et le cobaye, la transfusion d'anticorps monoclonaux avant ou après l'exposition au virus Ebola, a permis la protection de ces animaux. Chez le PNH, quelques études biaisées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux d'origine humaine (comme KZ52) ou humanisé n'ont pas été concluantes. Une étude plus récente chez le PNH a montré que le transfert passif d'IgG purifié à partir de sérum de PNH convalescents les a protégés d'un challenge léthal à virus Ebola, cette protection étant attribuée aux anticorps non neutralisants. Néanmoins, la relative importance entre ces deux types d'anticorps, neutralisants et non neutralisants qui protègent par d'autres mécanismes (cytotoxicité induite par les anticorps et par activation du complément, ou par mécanisme dépendant de Fc) semble peu claire. Le cocktail d'anticorps monoclonaux Zmapp qui a montré son efficacité chez le PNH, comprend une combinaison d'anticorps qui ciblent différentes fonctions effectrices de l'immunité humorale.

Ainsi pour le vecteur vaccinal VSV-ZEBOV, une corrélation a été établie entre la survie et le taux d'IgG totaux anti-GP. Néanmoins, les anticorps neutralisants n'étaient pas détectables après l'immunisation, soulignant là encore leur faible valeur prédictive de la survie de l'animal. Comme vu précédemment, la réponse cellulaire ne semble pas corrélée à la protection vaccinale induite par le VSV. Ce vaccin semble néanmoins protecteur, avant la synthèse d'IgG spécifiques, démontrant ainsi que la réponse innée via les cellules NK qui vont synthétiser précocement l'IFN γ , contribuent à cette protection vaccinale. Pour les

vecteurs Adénovirus, bien que la réponse humorale soit corrélée à la survie, la réponse cellulaire CD8+ effectrice synthétisant de l'IFN γ et du TNF α semble jouer un rôle prépondérant dans la protection contre le PNH. De même, l'activation des réponses T CD8+ mémoires synthétisant IL-2, IFN γ et TNF α semble importante pour la durabilité de cette protection. Une étude récente a d'ailleurs montré que le transfert passif de cellules T cytotoxiques dirigés contre des antigènes du virus Ebola protège les souris d'une infection létale. Le vaccin par particules pseudo-virales nécessite quant à lui la présence d'anticorps et de cellules T CD8+ spécifiques dirigés contre la GP virale pour être protecteur. [238,278,307]

On peut raisonnablement penser que lorsque l'une des réponses, humorale ou cellulaire, est présente en concentration élevée, elle peut protéger à elle seule de l'infection à virus Ebola alors que les deux types de réponses cellulaire et humorale sont nécessaires lorsque les niveaux de chaque réponse sont insuffisants. Néanmoins, la réponse humorale, notamment les IgG spécifiques anti-GP virale semble jouer un rôle prépondérant dans la protection contre le virus Ebola, l'immunité cellulaire ayant un rôle de support, devenant plus prééminent lorsque le niveau d'anticorps induit par la vaccination est suboptimal. [220,223,277]

THESE SOUTENUE PAR : Alexandra HOUOT

TITRE : LE VIRUS EBOLA, DE SA DECOUVERTE AU DEVELOPPEMENT D'UNE VACCINATION EFFICACE

CONCLUSION

Les maladies émergentes ont explosé ces dernières années, avec notamment le virus de l'Immunodéficience Humaine, le Coronavirus (virus MERS), le virus de la Grippe Aviaire H5N1. Ces zoonoses ont émergé chez l'homme du fait de perturbations écologiques (déforestations, élevages intensifs), et de l'accroissement démographique (urbanisation, concentration des populations). L'exploitation des forêts tropicales africaines, a permis d'établir un contact rapproché entre l'espèce réservoir, dont la niche écologique était jusque-là fermée, avec l'Homme.

Lors de la découverte du virus Ebola, responsable d'épidémies meurtrières en Centre Afrique décimant des villages entiers, et pour lequel on ne disposait d'aucun traitement ou vaccin efficace, il s'est révélé être une menace majeure pour la Santé Publique. L'homme qui s'est retrouvé démuné, a su contrôler les épidémies sporadiques par les traditionnelles méthodes de quarantaine au sein des villages, et du fait de la faible contagiosité du virus Ebola, les épidémies se sont éteintes d'elles-mêmes.

Les chercheurs se sont heurtés à la difficulté de produire un vaccin efficace par les traditionnelles méthodes vaccinales. Puis, les avancées scientifiques majeures ces dernières années, notamment en s'appuyant sur le génie génétique, ont permis de créer des vaccins de 3^{ème} génération. Ces vaccins utilisent le gène codant pour la protéine d'intérêt vaccinal ; celle-ci sera exprimée *in vivo* afin d'être présentée au système immunitaire, grâce à l'utilisation de vecteurs viraux. Ils se sont révélés prometteurs dans le développement de vaccins vis-à-vis des maladies pour lesquelles on échouait à obtenir une immunisation efficace.

Face à la catastrophe humanitaire de l'épidémie à virus Ebola de 2014-2015 faisant plus de 11 000 morts, il est important de tirer bénéfice des enseignements appris de cette épidémie, afin de se préparer à la prochaine menace à virus Ebola ou à tout autre virus émergent. Se préparer à l'épidémie est crucial, il s'agit de contenir l'expansion virale en diagnostiquant rapidement et en traçant précocement les chaînes de transmission. L'Afrique de l'Ouest qui n'était pas préparée a vu l'épidémie s'accroître rapidement. Il faut donc former les pays d'Afrique à la reconnaissance des symptômes cliniques de la maladie à virus Ebola,

et aux mesures de prévention adaptées, ainsi qu'à l'usage par le personnel soignant d'équipement de protection individuel pour tout acte de soins.

L'Organisation Mondiale de la Santé, qui a réagi tardivement à l'épidémie, a établi un plan de riposte, qui se révèle un outil précieux face à une nouvelle menace épidémique.

La surveillance de la faune sauvage, hébergeant de nombreux virus, pourrait prédire une éventuelle épidémie humaine, car ces animaux représentent de fréquents vecteurs de la maladie. La vaccination de masse des populations de grands singes réduirait le risque de transmission virale à l'homme et les protégerait également d'un déclin catastrophique de leur population.

Le vaccin basé sur le virus recombinant de la stomatite vésiculeuse (VSV) a permis de montrer que la création de plateformes vaccinales constituées de vecteurs viraux réutilisables exprimant un gène d'intérêt vaccinal, constitue un outil majeur, protecteur vis-à-vis de toute nouvelle épidémie à virus émergent, pour établir une vaccination rapide.

Demeure néanmoins la question éthique, de la volonté de commercialiser un vaccin « rentable », nécessitant d'attendre l'expansion d'une maladie virale pour développer un vaccin s'adressant à un grand nombre de patients. Pour le virus Ebola, malgré l'accumulation des études scientifiques ces vingt dernières années, il aura fallu attendre l'épidémie de 2014-2015 pour une mise en place rapide des essais cliniques, avec le risque majeur de développement d'une pandémie virale.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 6/6/2016

LE DOYEN


Pour la Présidente
et par déléguation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Pr. Michel SEVE

LE PRESIDENT DE LA THESE



Docteur Emmanuel DROUET

BIBLIOGRAPHIE

- [1]: Martini, G.A. (1971). Marburg virus disease, Clinical syndrome (pp. 1-9), *Springer Berlin Heidelberg*
- [2]: Peters, C.J., Peters, J.W. (1999). An introduction to Ebola: the virus and the disease, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 9-16.
- [3]: Johnson, K.M., Lange, J.V., Webb, P.A., Murphy, F.A. (1977). Isolation and partial characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire, *The Lancet*, 309(8011), 569-571.
- [4]: Hayes, C.G., Burans, J.P., Ksiazek, T.G., Del Rosario, R.A., Miranda, M.E., Manaloto, C.R., *et al.* (1992). Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 46(6), 664-671.
- [5]: Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., *et al.* (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus, *Nature*, 438(7068), 575-576.
- [6]: Leroy, E.M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.P., Muyembe-Tamfum, J.J., *et al.* (2009). Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007, *Vector-borne and zoonotic diseases*, 9(6), 723-728.
- [7]: Basler, C.F., Amarasinghe, G.K. (2009). Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(9), 511-520.
- [8]: Villinger, F., Rollin, P.E., Brar, S.S., Chikkala, N.F., Winter, J., Sundstrom, J.B., *et al.* (1999). Markedly elevated levels of interferon (IFN)- γ , IFN- α , interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor- α associated with fatal Ebola virus infection, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 188-191.
- [9]: Wang, Y., Liu, Z., Dai, Q. (2014). A highly immunogenic fragment derived from Zaire Ebola virus glycoprotein elicits effective neutralizing antibody, *Virus research*, 189, 254-261.
- [10]: Sullivan, N.J., Geisbert, T.W., Geisbert, J.B., Shedlock, D.J., Xu, L., Lamoreaux, L., *et al.* (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs, *PLoS Medicine*, 3(6), e177.
- [11]: Jones, S.M., Feldmann, H., Ströher, U., Geisbert, J.B., Fernando, L., Grolla, A., *et al.* (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses, *Nature medicine*, 11(7), 786-790.
- [12]: Henao-Restrepo, A.M., Longini, I.M., Egger, M., Dean, N.E., Edmunds, W.J., Camacho, A., *et al.* (2015). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial, *The Lancet*, 386(9996), 857-866.
- [13]: Gear, J.S., Cassel, G.A., Gear, A.J., Trappler, B., Clausen, L., Meyers, A.M., *et al.* (1975). Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg, *British Medical Journal*, 4(5995), 489-493.

- [14]: Smith, D.H., Isaacson, M., Johnson, K.M., Bagshawe, A., Johnson, B.K., Swanapoel, R., *et al.* (1982). Marburg-virus disease in Kenya, *The Lancet*, 319(8276), 816-820.
- [15]: Johnson, E.D., Johnson, B.K., Silverstein, D., Tukei, P., Geisbert, T.W., Sanchez, A.N., *et al.* (1996). Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya (pp. 101-114), *Springer Vienna*.
- [16]: Colebunders, R., Tshomba, A., Van Kerkhove, M.D., Bausch, D.G., Campbell, P., Libande, M., *et al.* (2007). Marburg haemorrhagic fever in Durba and Watsa, Democratic Republic of the Congo: clinical documentation, features of illness, and treatment, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 148-153.
- [17]: Centers for Disease Control and Prevention (2005). Outbreak of Marburg virus hemorrhagic fever-Angola, October 1, 2004-March 29, 2005, *Morbidity and mortality weekly report*, 54(12), 308.
- [18]: Johnson, K.M. (1978). Ebola hemorrhagic fever in Zaire, 1976, *Bulletin of the World Health Organization*, 56(2), 271-293.
- [19]: Smith, D.I.H. (1978) Ebola hemorrhagic fever in Sudan, 1976, *Bulletin of the World Health Organization*, 56(2), 247-270
- [20]: Feldmann, H., Geisbert, T.W. (2011) Ebola haemorrhagic fever, *The Lancet*, 377(9768), 849-862
- [21]: Heymann, D.L., Weisfeld, J.S., Webb, P.A., Johnson, K.M., Cairns, T., Berquist, H. (1980). Ebola Hemorrhagic Fever: Tandala, Zaire, 1977-1978 (1980), *Journal of Infectious Disease*, 142(3), 372-376.
- [22]: Baron, R.C., Mc Cormick, J.B., Zubeir, O.A. (1983) Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread, *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 997-1003.
- [23]: Jahrling, P.B., Geisbert T.W., Dalgard D.W., Johnson E.D., *et al.* (1990) Preliminary Report: Isolation of Ebola Virus from Monkeys Imported to USA, *Lancet*, 335(3), 502-505
- [24]: Miranda, M.E.G., Miranda, N.L.J. (2011). Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: a review, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 757-760.
- [25]: Marsh, G.A., Haining, J., Robinson, R., Foord, A., *et al.* (2011). Ebola Reston Virus Infection of Pigs: Clinical Significance and Transmission Potential, *Journal of Infectious Disease*, 204(3), 804-809
- [26]: Formenty, P., Boesch, C., Wyers, M., Steiner, C. (1999). Ebola Virus Outbreak among Wild Chimpanzees Living in a Rain Forest of Côte d'Ivoire, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 120-126.
- [27]: Formenty, P., Hatz, C., Le Guenno, B., Stoll, A. (1999). Human Infection Due to Ebola Virus, Subtype Côte d'Ivoire: Clinical and Biologic Presentation, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 48-53.
- [28]: Khan, A.S., Kweteminga Tshioko, F., Heymann, D.L., Le Guenno, B. (1999). The Reemergence of Ebola Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo, 1995, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 76-86.

- [29]: Georges, A.J., Leroy, E.M., Renaut, A.A., Tevi Benissan, C., *et al.* (1999). Ebola Hemorrhagic Fever Outbreaks in Gabon, 1994–1997: Epidemiologic and Health Control Issues, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 65-75.
- [30]: Leroy, E.M., Souquière, S., Rouquet, P., Drevet, D. (2002). Re-emergence of ebola haemorrhagic fever in Gabon, *Lancet*, 359(9307), 712-723
- [31]: Pourrut, X., Kumulungui, B., Wittmann, T., Moussavou, G., *et al.* (2005). The natural history of Ebola virus in Africa, *Microbes and Infection*, 7(7-8), 1005-1014.
- [32]: World Health Organization (2001). Outbreak of Ebola Hemorrhagic Fever -Uganda, August 2000-January 2001 *Weekly Epidemiological*, 76, 41-48
- [33]: Roddy, P., Howard, N., Van Kerkhove, M.D., Lutwama, J. (2012). Clinical Manifestations and Case Management of Ebola Haemorrhagic Fever Caused by a Newly Identified Virus Strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008, *PLoS One*, 7(12): e52986
- [34]: Shoemaker, T., MacNeil, A., Balinandi, S., Campbell, S., Reemerging Sudan Ebola Virus Disease in Uganda, 2011 (2012), *Emerging Infectious Disease*, 18(9)
- [35]: Albarino, C.G., Shoemaker, T., Khristova, M.L., Wamala, J.F., Muyembe, J.J., Balinandi, S., *et al.* (2013). Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012, *Virology*, 442(2), 97-100.
- [36]: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Outbreaks chronology: Ebola virus disease: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html>.
- [37]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2015). Guinée : le virus Ebola montre sa ténacité : <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/guinea/fr/>
- [38]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2015). Le Libéria: un pays, et sa capitale, submergés par les cas d'Ebola : <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/liberia/fr/>
- [39]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2015). Sierra Leone: une flambée initialement modérée qui s'est finalement révélée être la plus fulgurante : <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/sierra-leone/fr/>
- [40]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2015). Rapport de situation sur la flambée de maladie à virus Ebola au 6 janvier 2015 : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149396/1/roadmapupdate7jan15_fre.pdf?ua=1
- [41]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2016). Rapport de situation sur la flambée de maladie à virus Ebola au 30 mars 2016 : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205012/1/ebolasitrep_30Mar2016_fre.pdf
- [42]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2015). Les facteurs qui ont contribué à la propagation cachée du virus Ebola et empêché son confinement rapide : <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/factors/fr/>
- [43]: Marty, A.M., Jahrling, P.B., Geisbert, T.W. (2006). Viral Hemorrhagic Fevers, *Clinics in Laboratory Medicine*, 26(2), 345-386

- [44]: Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2016). Fièvres hémorragiques virales : http://www.who.int/topics/haemorrhagic_fever_viral/fr/
- [45]: Geisbert, T.W., Jahrling, P.B. (1999). Differentiation of filoviruses by electron microscopy, *Virus Research*, 39(2-3), 129-150
- [46]: Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F. (2011). Discovery of an Ebola virus-Like Filovirus in Europe, *PLOS Pathogens*, 7(10), e1002304
- [47]: Carroll, S.A., Towner, J.S., Sealy, T.K., McMullan, L.K., Khristova, M.L., Burt, F.J., *et al.* (2013). Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *Journal of Virology*, 87(5), 2608–2616.
- [48]: Feldmann, H., Nichol, S.T., Klenk, H.D., Peters, C.J., Sanchez, A. (1994). Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein, *Virology*, 199(2), 469-473.
- [49]: Bukreyev A.A., Chandran, K., Dolnik, O., Dye, J.M., Ebihara, H., Leroy, E.M., *et al.* (2014). Discussions and decisions of the 2012–2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012–June 2013, *Archives of Virology*, 159(4), 821-830
- [50]: Center for Disease Control (CDC), Goldsmith, C., Public Health Image Library #1832.
- [51]: Viralzone, Génome d'Ebola virus : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/207.html
- [52]: 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(3), 215-240.
- [53]: Elliott, L.H., Kiley, M.P., McCormick, J.B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins, *Virology*, 147(1), 169-176.
- [54]: Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A., Klenk, H.D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5762-5767.
- [55]: Lee, J.E., Fusco, M.L., Hessel, A.J., Oswald, W.B., Burton, D.R., Saphire, E.O. (2008). Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor, *Nature*, 454(7201), 177-182.
- [56]: Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K.H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1998). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain, *Molecular Cell*, 2(5), 605-616.
- [57]: Moller-Tank, S., Maury, W. (2015). Ebola Virus Entry: A curious and Complex Series of Events, *PLoS Pathogens*, 11(4), e1004731
- [58]: Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Dolnik, O., Feldmann, H., Klenk, H.D. (2005). Polymorphism of filovirus glycoproteins, *Advances in virus research*, 64, 359-381.
- [59]: Sanchez, A., Trappier, S.G., Mahy, B.W., 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3602-3607.

- [60]: 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, *Journal of virology*, 72(8), 6442-6447.
- [61]: Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muñiz, O., Corbí, A.L., Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans, *Journal of virology*, 76(13), 6841-6844.
- [62]: Feldmann, H., Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Ströher, U., Klenk, H.D. (2001). Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins, *Journal of General Virology*, 82(12), 2839-2848.
- [63]: Yang, Z.Y., Duckers, H.J., Sullivan, N.J., Sanchez, A., Nabel, E.G., Nabel, G.J. (2000). Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury, *Nature Medicine*, 6(8), 886-889.
- [64]: Groseth, A., Marzi, A., Hoenen, T., Herwig, A., Gardner, D., Becker, S., Feldmann, H. (2012). The Ebola virus glycoprotein contributes to but is not sufficient for virulence in vivo, *PLoS pathogens*, 8(8), e1002847.
- [65]: Chan, S.Y., Ma, M.C., Goldsmith, M.A. (2000). Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses, *Journal of General Virology*, 81(9), 2155-2159.
- [66]: Sullivan, N. J., Peterson, M., Yang, Z. Y., Kong, W. P., Duckers, H., Nabel, E., Nabel, G. J. (2005). Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway. *Journal of Virology*, 79(1), 547-553.
- [67]: Alazard-Dany, N., Volchkova, V., Reynard, O., Carbonnelle, C., Dolnik, O., Ottmann, M., Volchkov, V.E. (2006). Ebola virus glycoprotein GP is not cytotoxic when expressed constitutively at a moderate level, *Journal of General virology*, 87(5), 1247-1257.
- [68]: Dolnik, O., Volchkova, V.A., Escudero-Perez, B., Lawrence, P., Klenk, H.D., Volchkov, V.E. (2015). Shedding of Ebola virus surface glycoprotein is a mechanism of self-regulation of cellular cytotoxicity and has a direct effect on virus infectivity, *Journal of Infectious Diseases*, jiv268.
- [69]: 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 medicine*, 4(1), 37-42.
- [70]: Ledgerwood, J.E., Costner, P., Desai, N., Holman, L., Enama, M.E., Yamshchikov, G. *et al.* (2010). A replication defective recombinant Ad5 vaccine expressing Ebola virus GP is safe and immunogenic in healthy adults, *Vaccine*, 29(2), 304-313.
- [71]: Garbutt, M., Liebscher, R., Wahl-Jensen, V., Jones, S., Möller, P., Wagner, R., *et al.* (2004). Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses, *Journal of virology*, 78(10), 5458-5465.
- [72]: Reynard, O., Borowiak, M., Volchkova, V.A., Delpeut, S., Mateo, M., Volchkov, V.E. (2009). Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins, *Journal of virology*, 83(18), 9596-9601.
- [73]: Yaddanapudi, K., Palacios, G., Towner, J.S., Chen, I., Sariol, C.A., Nichol, S.T., Lipkin, W.I. (2006). Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis

of Ebola and Marburg viruses, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), 2519-2530.

[74]: Ito, H., Watanabe, S., Takada, A., Kawaoka, Y. (2001). Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies, *Journal of virology*, 75(3), 1576-1580.

[75]: Mohan, G.S., Li, W., Ye, L., Compans, R.W., Yang, C. (2012). Antigenic subversion: a novel mechanism of host immune evasion by Ebola virus, *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003065.

[76]: De La Vega, M.A., Wong, G., Kobinger, G.P., Qiu, X. (2015). The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis, *Viral Immunology*, 28(1), 3-9.

[77]: Wahl-Jensen, V.M., Afanasieva, T.A., Seebach, J., Ströher, U., Feldmann, H., Schnittler, H.J. (2005). Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function, *Journal of Virology*, 79(16), 10442-10450.

[78]: Iwasa, A., Shimojima, M., Kawaoka, Y. (2011). sGP serves as a structural protein in Ebola virus infection, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 897-903.

[79]: Sui, J., Marasco, W.A. (2002). Evidence against Ebola virus sGP binding to human neutrophils by a specific receptor, *Virology*, 303(1), 9-14.

[80]: Olejnik, J., Alonso, J., Schmidt, K.M., Yan, Z., Wang, W., Marzi, A., *et al.* (2013). Ebola virus does not block apoptotic signaling pathways, *Journal of Virology*, 87(10), 5384-5396.

[81]: De La Vega, M.A., Stein, D., Kobinger, G.P. (2015). Ebolavirus evolution: past and present, *PLoS Pathogens*, 11(11), e1005221.

[82]: Ebihara, H., Takada, A., Kobasa, D., Jones, S., Neumann, G., Theriault, S., Kawaoka, Y. (2006). Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice, *PLoS Pathogen*, 2(7), e73.

[83]: Basler, C.F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., *et al.* (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12289-12294.

[84] : Mateo, M., Carbonnelle, C., Reynard, O., Kolesnikova, L., Nemirov, K., Page, A., *et al.* (2011). VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1011-1020.

[85]: Althaus, C.L. (2014). Estimating the reproduction number of Ebola virus (EBOV) during the 2014 outbreak in West Africa, *PLoS currents*, 6.

[86]: Côté, M., Cunningham, J.M. (2012). L'entrée du virus Ébola et Marburg : interaction entre la glycoprotéine virale et les facteurs cellulaires, *John Libbey Eurotext*, 16(3), 168-177.

[87]: Wool-Levis, R.J., Bates, P. (1998). Characterization of Ebola Virus Entry by Using Pseudotyped Viruses: Identification of Receptor-Deficient Cell Lines, *Journal of Virology*, 72(4), 3155-3160

[88]: Martines, R.B., Ng, L.D., Greer, P.W., Rollin, P.E., *et al.* (2015). Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses, *Journal of Pathology*, 235(2), 153-174

- [89]: Simmons, G., Reeves, J.D., Grogan, C.C., Vandenberg, L.H., *et al.* (2003) DC-SIGN and DC-SIGNR Bind Ebola Glycoproteins and Enhance Infection of Macrophages and Endothelial Cells, *Virology*, 305(1), 115-123
- [90]: Shimajima, M., Takada, A., Ebihara, H., Neumann, G. (2006). Tyro3 Family-Mediated Cell Entry of Ebola and Marburg Viruses, *Journal of Virology*, 80(20), 10109-10116
- [91]: Chan, S.Y., Empig, C.J., Welte, F.J., Roberto, F., *et al.* (2001) Folate Receptor- α Is a Cofactor for Cellular Entry by Marburg and Ebola Viruses, *Cell*, 106(1), 117-126
- [92]: Bhattacharyya, S., Warfield, K.L., Ruthel, G., Bavari, S. (2010) Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway, *Virology*, 401 (1), 18-28
- [93]: Empig, C.J., Goldsmith, M.A. (2002). Association of the Caveola Vesicular System with Cellular Entry by Filoviruses, *Journal of Virology*, 76(10), 5266-5270
- [94]: Nanbo, A., Imai, M., Watanabe, S., Noda, T., Takahashi, K., Neumann, G., *et al.* (2010). Ebola Virus Is Internalized into Host Cells via Macropinocytosis in a Viral Glycoprotein-Dependent Manner, *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001121.
- [95]: Nanbo, A., Masaki, I., Watanabe, S., Noda, T., *et al.* (2010). Cellular Entry of Ebola Virus Involves Uptake by a Macropinocytosis-Like Mechanism and Subsequent Trafficking through Early and Late Endosomes, *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001121
- [96]: Saeed, M.F., Kolokoltsov, A.A., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R., Davey, R.A. (2008). Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus, *PLoS Pathogens*, 4, e1000141.
- [97]: Brindley, M.A., Hunt, C.L., Kondratowicz, A.S., Bowman, J., Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein (2011), *Virology*, 415(2), 83-94.
- [98]: Moller-Tank, S., Kondratowicz, A.S., Davey, R.A., Rennert, P.D., Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry (2013), *Journal of Virology*, 87(15), 8327-8341
- [99]: Schornberg, K., Matsuyama, S., Kabsch, K., Delos, S., *et al.* (2006). Role of Endosomal Cathepsins in Entry Mediated by the Ebola Virus Glycoprotein, *Journal of Virology*, 80(8), 4174-4178
- [100]: Chandran, K., Sullivan, N.J., Felber, U., Whelan, S.P., *et al.* (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection, *Science*, 308(5728), 1643-1645
- [101]: Brecher, M., Schornberg, K.L., Delos, S.E., Fusco, M.L., Saphire, E.O., White, J.M. (2012). Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change, *Journal of Virology*, 86(1), 364-372.
- [102]: Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., *et al.* (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1, *Nature*, 477(7364), 340-343.

- [103]: Côté, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C. M., *et al.* (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection, *Nature*, 477(7364), 344-348.
- [104]: Jae, L.T., Raaben, M., Herbert, A.S., Kuehne, A.I., Wirchnianski, A.S., Soh, T.K., *et al.* (2014). Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch, *Science*, 344(6191), 1506-1510.
- [105]: Gregory, S.M., Harada, E., Liang, B., Delos, S.E., *et al.* (2011). Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 108(27), 11211-11216
- [106]: Biedenkopf, N., Hartlieb, B., Hoenen, T., Becker, S. (2013). Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication, *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 11165–11174
- [107]: Bieniasz, P.D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release, *Virology*, 344(1), 55-63.
- [108]: Martin-Serrano, J., Zang, T., Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress, *Nature medicine*, 7(12), 1313-1319.
- [109]: Noda, T., Ebihara, H., Muramoto, Y., Fujii, K., Takada, A., Sagara, H., *et al.* (2006). Assembly and budding of Ebolavirus, *PLoS Pathogens*, 2(9), e99.
- [110]: Noda, T., Sagara, H., Suzuki, E., Takada, A., Kida, H., Kawaoka, Y. (2002). Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP, *Journal of virology*, 76(10), 4855-4865.
- [111]: Adu-Gyamfi, E., Soni, S.P., Xue, Y., Digman, M.A., Gratton, E., Stahelin, R.V. (2013). The Ebola virus matrix protein penetrates into the plasma membrane a key step in viral protein 40 (VP40) oligomerization and viral egress, *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5779-5789.
- [112]: Bavari, S., Bosio, C.M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A.B., Geisbert, T.W. *et al.* (2002). Lipid raft microdomains a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses, *The Journal of experimental medicine*, 195(5), 593-602.
- [113]: Timmins, J., Schoehn, G., Ricard-Blum, S., Scianimanico, S., Vernet, T., Ruigrok, R.W., Weissenhorn, W. (2003). Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4, *Journal of molecular biology*, 326(2), 493-502.
- [114]: Adu-Gyamfi, E., Digman, M.A., Gratton, E., Stahelin, R.V. (2012). Single-particle tracking demonstrates that actin coordinates the movement of the Ebola virus matrix protein, *Biophysical journal*, 103(9), 41-43.
- [115]: World Health Organization. (2014). Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation, *Ebola strategies*.
- [116]: Towner, J.S., Pourrut, X., Albariño, C.G., Nkogue, C.N., Bird, B.H., Grard, G., *et al.* (2007). Marburg virus infection detected in a common African bat, *PloS one*, 2(8), e764.

- [117]: Towner, J.S., Amman, B.R., Sealy, T.K., Carroll, S.A.R., Comer, J.A., Kemp, A., *et al.* (2009). Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats, *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000536.
- [118]: Morvan, J. M., Nakouné, E., Deubel, V., Colyn, M. (2000). Ecosystèmes forestiers et virus Ebola. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 93(3), 172-175.
- [119]: Biek, R., Walsh, P. D., Leroy, E. M., & Real, L. A. (2006). Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathogens*, 2(10).
- [120]: Morvan, J.M., Deubel, V., Gounon, P., Nakouné, E., Barrière, P., Murri, S., *et al.* (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(14), 1193-1201.
- [121]: Klenerman, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1997). A non-retroviral RNA virus persists in DNA form, *Nature*, 390(6657), 298-301.
- [122]: Taylor, D. J., Leach, R. W., & Bruenn, J. (2010). Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes, *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 193.
- [123]: Leroy, É., Pourrut, X., Gonzalez, J.P. (2006). Les chauves-souris, réservoirs du virus Ebola: Le mystère se dissipe, *M/S: médecine sciences*, 22(1), 78-79.
- [124]: Allela, L., Boury, O., Pouillot, R., Délicat, A., Yaba, P., Kumulungui, B., *et al.* (2005). Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk, *Emerging Infectious Disease*, 11(3), 385-90.
- [125]: Bausch, D.G., Towner, J.S., Dowell, S.F., Kaducu, F., Lukwiya, M., Sanchez, A., *et al.* (2007). Assessment of the risk of Ebola virus transmission from bodily fluids and fomites, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 142-147.
- [126]: Richards, P., Amara, J., Ferme, M.C., Kamara, P., Mokuwa, E., Sheriff, A. *et al.* (2015). Social pathways for Ebola virus disease in rural Sierra Leone, and some implications for containment, *PLoS Neglected Tropical Disease*, 9(4), e0003567.
- [127]: Rogstad, K.E., Tunbridge, A. (2015). Ebola virus as a sexually transmitted infection, *Current opinion in infectious diseases*, 28(1), 83-85.
- [128]: Deen, G.F., Knust, B., Broutet, N., Sesay, F.R., Formenty, P., Ross, C., *et al.* (2015). Ebola RNA persistence in semen of Ebola virus disease survivors—preliminary report, *New England Journal of Medicine*.
- [129]: Varkey, J.B., Shantha, J.G., Crozier, I., Kraft, C.S., Lyon, G.M., Mehta, A.K., *et al.* (2015). Persistence of Ebola virus in ocular fluid during convalescence, *New England Journal of Medicine*, 372(25), 2423-2427.
- [130]: Turell, M.J., Bressler, D.S., Rossi, C.A. (1996). Short report: lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 55(1), 89-90.
- [131]: Jaax, N., Jahrling, P., Geisbert, T., Geisbert, J., Steele, K., McKee, K., *et al.* (1995). Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory, *The Lancet*, 346(8991), 1669-1671.

- [132]: Johnson, E., Jaax, N., White, J., Jahrling, P. (1995). Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus, *International journal of experimental pathology*, 76(4), 227.
- [133]: Center for Disease Control, Ebola hemorrhagic fever, Ecologie des Ebolavirus: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/resources/virus-ecology-fr.html>
- [134]: Suzuki, Y., Gojobori, T. (1997). The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses, *Molecular Biology and Evolution*, 14(8), 800-806.
- [135]: Li, Y.H., Chen, S.P. (2014). Evolutionary history of Ebola virus, *Epidemiology and infection*, 142(06), 1138-1145.
- [136]: Rodriguez LL, De Roo a, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez a, et al. (1999) Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995, *Journal of Infectious Disease*, 179, 170-176.
- [137]: Gire, S.K., Goba, A., Andersen, K.G., Sealfon, R. S., Park, D.J., Kanneh, L., et al. Wohl, S. (2014). Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, 345(6202), 1369-1372.
- [138]: Kortepeter, M.G., Bausch, D.G., Bray, M. (2011). Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 810-816.
- [139]: Chertow, D.S., Kleine, C., Edwards, J.K., Scaini, R., Giuliani, R., Sprecher, A. (2014). Ebola virus disease in West Africa—clinical manifestations and management, *New England Journal of Medicine*, 371(22), 2054-2057.
- [140]: Bwaka, M.A., Bonnet, M.J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., et al. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 1-7.
- [141]: Bray, M., Geisbert, T.W. (2005). Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(8), 1560-1566.
- [142]: Geisbert, T. W., Hensley, L.E., Larsen, T., Young, H.A., Reed, D.S., Geisbert, J.B., et al. (2003). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection, *The American journal of pathology*, 163(6), 2347-2370.
- [143]: Escudero-Pérez, B., Volchkova, V. A., Dolnik, O., Lawrence, P., Volchkov, V. E. (2014). Shed GP of Ebola virus triggers immune activation and increased vascular permeability, *PLoS Pathogens*, 10(11), e1004509.
- [144]: Falasca, L., Agrati, C., Petrosillo, N., Di Caro, A., Capobianchi, M.R., Ippolito, G., Piacentini, M. (2015). Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: focus on cell death, *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1250-1259.
- [145]: Mahanty, S., Bray, M. (2004). Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers, *The Lancet infectious diseases*, 4(8), 487-498.

- [146]: Messaoudi, I., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2015). Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus, *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 663-676.
- [147]: Wauquier, N., Becquart, P., Padilla, C., Baize, S., Leroy, E.M. (2010). Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis, *PLoS Negl Trop Dis*, 4(10), e837
- [148]: Bray, M., Chertow, D.S., Hirsch, M.S., Mitty, J. (2015). Epidemiology and pathogenesis of Ebola virus disease.
- [149]: Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling PB, Davis KJ, Larsen T, Kagan E, Hensley L.E. (2003). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells, *American Journal of Pathology*, 163(6):2371.
- [150]: Center for Disease Control, Diagnostic: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/diagnosis>
- [151]: Leroy, E.M., Baize, S., Lu, C.Y., McCormick, J.B., Georges, A.J., Georges-Courbot, M.C., *et al.* (2000). Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting, *Journal of medical virology*, 60(4), 463-467.
- [152]: Yang, Y., Bai, L., Hu, K.X., Yang, Z.H., Hu, J.P., Wang, J. (2012). Multiplex real-time PCR method for rapid detection of Marburg virus and Ebola virus, *Chinese journal of experimental and clinical virology*, 26(4), 313-315.
- [153]: Towner, J.S., Rollin, P.E., Bausch, D.G., Sanchez, A., Crary, S.M., Vincent, M., *et al.* (2004). Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome, *Journal of virology*, 78(8), 4330-4341.
- [154]: Lucht, A., Grunow, R., Otterbein, C., Möller, P., Feldmann, H., Becker, S. (2004). Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein GP of Ebola virus, *Medical microbiology and immunology*, 193(4), 181-187.
- [155]: Bray, M., Chertow, D.S., Hirsch, M.S., Mitty, J. Clinical manifestations and diagnosis of Ebola virus disease.
- [156]: 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, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 192-198.
- [157]: Diagnostic rapide d'Ebola, le test Ezyscreen fait ses preuves sur le terrain: <http://www.inserm.fr/espace-journalistes/diagnostic-rapide-d-ebola-le-test-ezyscreen-r-fait-ses-preuves-sur-le-terrain>
- [158]: Broadhurst, M. J., Kelly, J. D., Miller, A., Semper, A., Bailey, D., Gropelli, E., *et al.* (2015). ReEBOV Antigen Rapid Test kit for point-of-care and laboratory-based testing for Ebola virus disease: a field validation study, *The Lancet*, 386(9996), 867-874.
- [159]: Kurosaki, Y., Takada, A., Ebihara, H., Grolla, A., Kamo, N., Feldmann, H., *et al.* Yasuda, J. (2007). Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, *Journal of virological methods*, 141(1), 78-83.

- [160]: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015) Epidemiologic risk factors to consider when evaluating a person for exposure to Ebola virus: <http://www.cdc.gov/vhf/Ebola/exposure/risk-factors-when-evaluating-person-for-exposure.html>
- [161]: World Health Organization, Ebola Strategy. (2014). Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation.
- [162]: World Health Organization. (2014). Interim infection prevention and control guidance for care of patients with suspected or confirmed filovirus haemorrhagic fever in health-care settings, with focus on Ebola.
- [163]: Bray, M., Chertow, D. S., Hirsch, M. S., Mitty, J. Treatment and prevention of Ebola virus disease.
- [164]: Emond, R.T., Evans, B., Bowen, E.T., Llyod, G., (1977) A case of Ebola virus infection, *Br Med J*, 2(6086), 541-544
- [165]: Mupapa, K., Massamba, M., Kibadi, K., (1999) Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients, International Scientific and Technical Committee, *Journal of Infectious Disease*, 179 (1), 18-23
- [166]: Sadek, R.F., Khan, A.S., Stevens, G., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., (1999) Ebola Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo, 1995: Determinants of Survival, *Journal of Infectious Disease*, 179 (1), 24-27
- [167]: Jahrling, P.B., Geisbert, J.B., Swearengen, J.R., Larsen, T., Geisbert, T.W., (2007) Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in non-human primates, *Journal of Infectious disease*, 196 (2), 400-403
- [168]: Van Griensven, J., Edwards, T., De Lamballerie, X., *et al.* (2016) Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea, *New Journal England of Medicine*, 374(1), 33-42
- [169]: Baize, S., Leroy, E.M., Georges-Courbot, M.C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., *et al.* (1999). Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients, *Nature Medicine*, 5(4), 423-426
- [170]: Ksiazek T.G., Rollin P.E., Williams A.J., Bressler D.S., Martin M.L., *et al.* (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, *Journal of Infectious disease*, 179(1), 177-187
- [171]: Borisevich, I.V., Mickhailov, V.V., Krasnianskii, V.P., *et al.* (1995). Development and study of the properties of immunoglobulin against Ebola fever, *Voprosy Virusologii*, 40(6), 270-273
- [172]: Jahrling, P.B., Geisbert, J., Swearengen, J.R., *et al.* (1996). Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses, *Archives of virology*, 11(2), 135-140
- [173]: Kudoyarova-Zubavichene, N.M., Sergeev, N.N., Chepurnov, A.A., Netesov, S.V. (1999). Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of ebola virus infection, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 218-223

- [174]: Dye, J.M., Herbert, A.S., Khuene, A.I., *et al.* (2012), Post exposure antibody prophylaxis protects nonhuman primates from filovirus disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 5034-5039
- [175]: Parren, P.W., Geisbert, T.W., Maruyama, T., Jahrling, P.B., Burton, D.R., (2002), Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody, *Journal of Virology*, 76, 6408-6412
- [176]: Oswald, W.B., Geisbert, T.W., Davis, K.J., *et al.* (2007). Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys, *PLoS Pathogens*, 3(1)
- [177]: Qui, X., Audet, J., Wong, G., *et al.* (2012). Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies, *Science Translational Medicine*, 4(138), 138ra81
- [178]: Qiu, X., Audet, J., Wong, G., Fernando, L., Bello, A., Pillet, S., *et al.* (2013). Sustained protection against Ebola virus infection following treatment of infected nonhuman primates with ZMAb, *Scientific reports*, 3.
- [179]: Qui, X., Wong, G., Fernando, L. (2013) Monoclonal antibodies combined with adenovirus-vectored interferon significantly extend the treatment window in Ebola virus-infected guinea pigs, *Journal of Virology*. 87(13), 7754-7757
- [180]: Olinger, G.G.Jr., Pettitt, J., Kim, D., *et al.* (2012). Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 18030-18035
- [181]: Pettitt, J., Zeitlin, L., Kim, D.H., Working, C., Johnson, J.C., Bohorov, O., *et al.* (2013). Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail, *Science translational medicine*, 5(199), 199ra113-199ra113.
- [182]: Qiu, X., Wong, G., Audet, J., *et al.* (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with Zmapp, *Nature*, 514(7520), 47-53
- [183]: YunFang, Z., DaPeng, L., Xia, J., Zhong, H., (2014). Fighting Ebola with ZMapp: spotlight on plant-made antibody, *Science China Life Sciences*, 57(10), 987-988
- [184]: Murin, C.D., Fusco, M.L., Bornholdt, Z.A., Qiu, X., *et al.* (2014). Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus, *Current Issue*, 111(48), 17182-17187
- [185]: Furuta, Y., Gowen, B.B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D.F., Barnard, D.L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor, *Antiviral research*, 100(2), 446-454.
- [186]: Richardson, J.S., Wong, G., Pillet, S., Schindle, S., Ennis, J., Turner, J., *et al.* (2011). Evaluation of different strategies for post-exposure treatment of Ebola virus infection in rodents, *Journal of bioterrorism & biodefense*.
- [187]: Oestereich, L., Lüdtke, A., Wurr, S., Rieger, T., Muñoz-Fontela, C., Günther, S. (2014). Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model, *Antiviral research*, 105, 17-21.

- [188]: Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, *et al.* (2016). Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea, *PLoS Med*, 13:e1001967.
- [189]: Warren, T.K., Wells, J., Panchal, R.G., *et al.* (2014). Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430 (2014) *Nature*, 508(7496), 402-405
- [190]: Florescu, D.F., Keck, M.A., (2014). Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(10), 1171-1178
- [191]: Geisbert, T.W., Hensley, L.E., Kagan, E., *et al.* (2007). Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference, *Journal of Infectious Disease*, 193, 1650-1657
- [192]: Geisbert, T.W., Lee, A.C., Robbins, M., *et al.* (2010). Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study, *Lancet*, 375, 1896-1905
- [193]: Warfield, K.L., Swenson, D.L., Wells, J., *et al.* (2006). Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers, *PLoS Pathogens*, 2(1) e1
- [194]: Warren, T.K., Warfield, K.L., Wells, J., *et al.* (2010) Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections. *Nature Medicine*, 16(9), 991-994
- [195]: Iversen, P.L., Warren, T.K., Wells, J.B., *et al.* (2012). Discovery and Early Development of AVI-7537 and AVI-7288 for the Treatment of Ebola Virus and Marburg Virus Infections, *Viruses*, 4(11), 2806-2830
- [196]: Johansen, L.M., Brannan, J.M., Delos, S.E., *et al.* (2013). FDA-Approved Selective Estrogen Receptor Modulators Inhibit Ebola Virus Infection, *Science Translational Medicine*, 5(190), 190ra79
- [197]: Geisbert, T.W., Hensley, L.E., Jahring, P.B., *et al.* (2003). Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VII/tissue factor: a study in rhesus monkeys, *Lancet*, 362, 1953-1958
- [198]: Hensley, L.E., Stevens, E.L., Yan, S.B., *et al.* (2007). Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever, *Journal of Infectious Disease*, 196 (2), 390-399
- [199] : Misasi, J., Sullivan, N. J. (2014). Camouflage and misdirection: the full-on assault of Ebola virus disease, *Cell*, 159(3), 477-486.
- [200]: Cárdenas, W.B., Loo, Y.M., Gale, M., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R., Martínez-Sobrido, L., *et al.* (2006). Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling, *Journal of virology*, 80(11), 5168-5178.
- [201]: Basler, C.F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Mühlberger, E., Bray, M., *et al.* (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3, *Journal of virology*, 77(14), 7945-7956.

- [202]: Leung, L.W., Hartman, A.L., Martinez, O., Shaw, M.L., Carbonnelle, C., Volchkov, V. E., et al. (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin $\alpha 1$ and blocks STAT1 nuclear accumulation, *Journal of virology*, 80(11), 5156-5167.
- [203]: Haasnoot, J., De Vries, W., Geutjes, E. J., Prins, M., De Haan, P., & Berkhout, B. (2007). The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing, *PLoS Pathogens*, 3(6), e86.
- [204]: Feng, Z., Cervený, M., Yan, Z., He, B. (2007). The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR, *Journal of virology*, 81(1), 182-192.
- [205]: Kaletsky, R.L., Francica, J.R., Agrawal-Gamse, C., Bates, P. (2009). Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2886-2891.
- [206]: Kühl, A., Banning, C., Marzi, A., Votteler, J., Steffen, I., Bertram, S., et al. (2011). The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 850-860.
- [207]: Bosio, C. M., Aman, M. J., Grogan, C., Hogan, R., Ruthel, G., Negley, D., et al. (2003). Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation, *Journal of Infectious Diseases*, 188(11), 1630-1638.
- [208]: Lubaki, N.M., Ilinykh, P., Pietzsch, C., Tigabu, B., Freiberg, A.N., Koup, R.A., Bukreyev, A. (2013). The lack of maturation of Ebola virus-infected dendritic cells results from the cooperative effect of at least two viral domains, *Journal of Virology*, 87(13), 7471-7485.
- [209]: Baize, S., Leroy, E.M., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Georges, A.J. (1999). Réponse immune précoce et contrôle de l'infection par le virus Ebola.
- [210]: Warfield, K.L., Perkins, J.G., Swenson, D.L., Deal, E.M., Bosio, C.M., Aman, M.J., et al. (2004). Role of natural killer cells in innate protection against lethal ebola virus infection, *The Journal of experimental medicine*, 200(2), 169-179.
- [211]: Mandl, J.N., Feinberg, M.B. (2015). Robust and sustained immune activation in human Ebola virus infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), 4518-4519.
- [212]: McElroy, A.K., Akondy, R.S., Davis, C.W., Ellebedy, A.H., Mehta, A.K., Kraft, C.S., et al. (2015). Human Ebola virus infection results in substantial immune activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), 4719-4724.
- [213]: Zhang, L., Wang, H., Zhang, Y.Q. (2015). Against Ebola: type I interferon guard risk and mesenchymal stromal cell combat sepsis, *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 16(1), 1-9.
- [214]: Wauquier, N., Becquart, P., Padilla, C., Baize, S., Leroy, E.M. (2010). Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e837.

- [215]: Leroy, E.M., Baize, S., Volchkov, V.E., Fisher-Hoch, S.P., Georges-Courbot, M.C., Lansoud-Soukate, J., et al. (2000). Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response, *The Lancet*, 355(9222), 2210-2215.
- [216]: Rasmussen, A.L., Okumura, A., Ferris, M.T., Green, R., Feldmann, F., Kelly, S.M., et al. (2014). Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance, *Science*, 346(6212), 987-991.
- [217]: Courcoux, G. (2010). Une immunité naturelle contre Ebola?, *Actualité scientifique*, 337(2).
- [218]: Geisbert, T.W., Feldmann, H. (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1075-1081.
- [219]: Garon, J.R., Orenstein, W.A. (2015). Understanding the host-pathogen interaction saves lives: lessons from vaccines and vaccinations, *Current opinion in immunology*, 36, 8-13.
- [220]: Ye, L., Yang, C. (2015). Development of vaccines for prevention of Ebola virus infection, *Microbes and Infection*, 17(2), 98-108.
- [221]: Zhou, Y., Sullivan, N.J. (2015). Immunology and evolution of the adenovirus prime, MVA boost Ebola virus vaccine, *Current Opinion in Immunology*, 35, 131-136.
- [222]: Hevey, M., Negley, D., Geisbert, J., Jahrling, P., Schmaljohn, A. (1997). Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants, *Virology*, 239(1), 206-216.
- [223]: Krause, P.R., Bryant, P.R., Clark, T., Dempsey, W., Henchal, E., Michael, N.L., et al. (2015). Immunology of protection from Ebola virus infection, *Science translational medicine*, 7(286), 286ps11-286ps11.
- [224]: Wu, X.X., Yao, H.P., Wu, N.P., Gao, H.N., Wu, H.B., Jin, C.Z., et al. (2015). Ebola virus Vaccines: Progress in the Fight Against Ebola Virus Disease, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(5), 1641-1658.
- [225]: Halfmann, P., Kim, J.H., Ebihara, H., Noda, T., Neumann, G., Feldmann, H., et al. (2008). Generation of biologically contained Ebola viruses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(4), 1129-1133.
- [226]: Halfmann, P., Ebihara, H., Marzi, A., Hatta, Y., Watanabe, S., Suresh, M., et al. (2009). Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate, *Journal of virology*, 83(8), 3810-3815.
- [227]: Marzi, A., Halfmann, P., Hill-Batorski, L., Feldmann, F., Shupert, W.L., Neumann, G., et al. (2015). An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates, *Science*, 348(6233), 439-442.
- [228]: Lupton, H., Lambert, R., Bumgardner, D., Moe, J., Eddy, G. (1980). Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model, *The Lancet*, 316(8207), 1294-1295.

- [229]: Chupurnov, A.A., Chernukhin, I.V., Ternovoï, V.A., Kudoiarova, N.M., Makhova, N.M., Azaev, M., et al. (1994). Attempts to develop a vaccine against Ebola fever, *Voprosy virusologii*, 40(6), 257-260.
- [230]: Geisbert, T.W., Pushko, P., Anderson, K., Smith, J., Davis, K.J., Jahrling, P.B. (2002). Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. (Perspectives), *Emerging infectious diseases*, 8(5), 503-508.
- [231]: Warfield, K.L., Swenson, D.L., Olinger, G.G., Kalina, W.V., Viard, M., Aitichou, M., et al. (2007). Ebola virus inactivation with preservation of antigenic and structural integrity by a photoinducible alkylating agent, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 276-283.
- [232]: Mellquist-Riemenschneider, J.L., Garrison, A.R., Geisbert, J.B., Saikh, K.U., Heidebrink, K.D., Jahrling, P.B., et al. (2003). Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs, *Virus research*, 92(2), 187-193.
- [233]: Konduru, K., Bradfute, S.B., Jacques, J., Manangeeswaran, M., Nakamura, S., Morshed, S., et al. (2011). Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice, *Vaccine*, 29(16), 2968-2977.
- [234]: Noad, R., Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens, *Trends in microbiology*, 11(9), 438-444.
- [235]: Noda, T., Sagara, H., Suzuki, E., Takada, A., Kida, H., Kawaoka, Y. (2002). Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP, *Journal of virology*, 76(10), 4855-4865.
- [236]: Warfield, K.L., Bosio, C.M., Welcher, B.C., Deal, E.M., Mohamadzadeh, M., Schmaljohn, A., et al. (2003). Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15889-15894.
- [237]: Ye, L., Lin, J., Sun, Y., Bennouna, S., Lo, M., Wu, Q., et al. (2006). Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies, *Virology*, 351(2), 260-270.
- [238]: Warfield, K.L., Olinger, G., Deal, E.M., Swenson, D.L., Bailey, M., Negley, D.L., et al. (2005). Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection, *The Journal of Immunology*, 175(2), 1184-1191.
- [239]: Warfield, K.L., Swenson, D.L., Demmin, G., Bavari, S. (2005). Filovirus-like particles as vaccines and discovery tools, *Expert review of vaccines*, 4(3), 429-440.
- [240]: Swenson, D.L., Warfield, K.L., Negley, D.L., Schmaljohn, A., Aman, M.J., Bavari, S. (2005). Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections, *Vaccine*, 23(23), 3033-3042.
- [241]: Warfield, K.L., Swenson, D.L., Olinger, G.G., Kalina, W.V., Aman, M.J., Bavari, S. (2007). Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 430-437.
- [242]: Warfield, K.L., Posten, N.A., Swenson, D.L., Olinger, G.G., Esposito, D., Gillette, W. K., et al. (2007). Filovirus-like particles produced in insect cells: immunogenicity and protection in rodents *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 421-429.

- [243]: Vaccins, A.D.N. (2007). L'apport des nouvelles technologies en vaccinologie, *médecine/sciences*, 23, 386-90.
- [244]: Tang, D.C., DeVit, M., Johnston, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature*, 356(6365), 152-154.
- [245]: Lowe, D. B., Shearer, M. H., & Kennedy, R. C. (2006). DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease, *Journal of cellular biochemistry*, 98(2), 235-242.
- [246]: Collective, E. 10 Vaccins recombinants vivants multivalents et vaccins ADN.
- [247]: Vanderzanden, L., Bray, M., Fuller, D., Roberts, T., Custer, D., Spik, K., et al. (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge, *Virology*, 246(1), 134-144.
- [248]: 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(6812), 605-609.
- [249]: Hensley, L.E., Mulangu, S., Asiedu, C., Johnson, J., Honko, A.N., Stanley, D., et al. (2010). Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species, *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000904.
- [250]: Martin, J.E., Sullivan, N.J., Enama, M.E., Gordon, I.J., Roederer, M., Koup, R.A., et al. (2006). A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(11), 1267-1277.
- [251]: Kibuuka, H., Berkowitz, N.M., Millard, M., Enama, M.E., Tindikahwa, A., Sekiziyivu, A.B., et al. (2015). Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *The Lancet*, 385(9977), 1545-1554.
- [252]: Bertagnoli, S., Pignolet, B., Biacchesi, S., Eloit, M., Klonjowski, B., Richardson, J., Brémont, M. (2008). Les vecteurs viraux: outils modernes de vaccination, *INRA Productions Animales*, 21(1), 127-126.
- [253]: Choi, Y., & Chang, J. (2013). Viral vectors for vaccine applications, *Clinical and experimental vaccine research*, 2(2), 97-105.
- [254]: Olinger, G.G., Bailey, M.A., Dye, J.M., Bakken, R., Kuehne, A., Kondig, J., et al. (2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins, *Journal of virology*, 79(22), 14189-14196.
- [255]: Pushko, P., Bray, M., Ludwig, G.V., Parker, M., Schmaljohn, A., Sanchez, A., et al. (2000). Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus, *Vaccine*, 19(1), 142-153.
- [256]: Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., Schmaljohn, A. (1998). Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates, *Virology*, 251(1), 28-37.
- [257]: Herbert, A.S., Kuehne, A.I., Barth, J.F., Ortiz, R.A., Nichols, D.K., Zak, S.E., et al. (2013). Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle vaccine protects nonhuman

primates from intramuscular and aerosol challenge with ebolavirus, *Journal of virology*, 87(9), 4952-4964.

[258]: Reynard, O., Mokhonov, V., Mokhonova, E., Leung, J., Page, A., Mateo, M., et al. (2011). Kunjin virus replicon-based vaccines expressing Ebola virus glycoprotein GP protect the guinea pig against lethal Ebola virus infection, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1060-1065.

[259]: Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S.R., Shieh, W.J., Rollin, P.E., Murphy, B. R., et al. (2006). A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge, *Journal of virology*, 80(5), 2267-2279.

[260]: Bukreyev, A., Rollin, P.E., Tate, M.K., Yang, L., Zaki, S.R., Shieh, W.J., et al. (2007). Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus, *Journal of virology*, 81(12), 6379-6388.

[261]: Bukreyev, A., Marzi, A., Feldmann, F., Zhang, L., Yang, L., Ward, J. M., et al. (2009). Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge, *Virology*, 383(2), 348-361.

[262]: Bukreyev, A., DiNapoli, J.M., Yang, L., Murphy, B.R., Collins, P.L. (2010). Mucosal parainfluenza virus-vectored vaccine against Ebola virus replicates in the respiratory tract of vector-immune monkeys and is immunogenic, *Virology*, 399(2), 290-298.

[263]: DiNapoli, J. M., Yang, L., Samal, S. K., Murphy, B. R., Collins, P. L., & Bukreyev, A. (2010). Respiratory tract immunization of non-human primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine candidate against Ebola virus elicits a neutralizing antibody response, *Vaccine*, 29(1), 17-25.

[264]: Blaney, J.E., Wirblich, C., Papaneri, A.B., Johnson, R.F., Myers, C.J., Juelich, T. L., et al. (2011). Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses, *Journal of virology*, 85(20), 10605-10616.

[265]: Blaney, J.E., Marzi, A., Willet, M., Papaneri, A.B., Wirblich, C., Feldmann, F., et al. (2013). Antibody quality and protection from lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates immunized with rabies virus based bivalent vaccine, *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003389.

[266]: Chepurnov AA, Ternovoi VA, Dadayeva AA, Dmitriyev IP, Sizikova LP, Volchkov VY, Kudoyarova NM, Rudzevich TN, Netesov SV: Study of immunobiological properties of Ebola virus VP24 protein expressed by recombinant vaccinia virus, *Voprosy Virusologii* 1997;42,115-120.

[267]: Tsuda, Y., Caposio, P., Parkins, C. J., Botto, S., Messaoudi, I., Cicin-Sain, L., et al. (2011). A replicating cytomegalovirus-based vaccine encoding a single Ebola virus nucleoprotein CTL epitope confers protection against Ebola virus, *PLoS Negl Trop Dis*, 5(8), e1275.

[268]: Tsuda, Y., Parkins, C.J., Caposio, P., Feldmann, F., Botto, S., Ball, S., et al. (2015). A cytomegalovirus-based vaccine provides long-lasting protection against lethal Ebola virus challenge after a single dose, *Vaccine*, 33(19), 2261-2266.

- [269]: Marzi, A., Murphy, A.A., Feldmann, F., Parkins, C.J., Haddock, E., Hanley, P. W., et al. (2016). Cytomegalovirus-based vaccine expressing Ebola virus glycoprotein protects nonhuman primates from Ebola virus infection, *Scientific reports*, 6.
- [270]: Tatsis, N., Ertl, H.C. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors, *Molecular Therapy*, 10(4), 616-629.
- [271]: Sullivan, N.J., Geisbert, T.W., Geisbert, J.B., Xu, L., Yang, Z.Y., Roederer, M., et al. (2003). Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates, *Nature*, 424(6949), 681-684.
- [272]: Pratt, W.D., Wang, D., Nichols, D.K., Luo, M., Woraratanadharm, J., Dye, J.M., et al. (2010). Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector, *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(4), 572-581.
- [273]: Swenson, D.L., Wang, D., Luo, M., Warfield, K.L., Woraratanadharm, J., Holman, D.H., et al. (2008). Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections, *Clinical and vaccine immunology*, 15(3), 460-467.
- [274]: Santra, S., Seaman, M.S., Xu, L., Barouch, D.H., Lord, C.I., Lifton, M.A., et al. (2005). Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates, *Journal of virology*, 79(10), 6516-6522.
- [275]: Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., Carey, K.D., Finegold, M., Ng, P. (2004). Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates, *Human gene therapy*, 15(1), 35-46.
- [276]: Sheets, R.L., Stein, J., Bailer, R.T., Koup, R.A., Andrews, C., Nason, M., et al. (2008). Biodistribution and toxicological safety of adenovirus type 5 and type 35 vectored vaccines against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), Ebola, or Marburg are similar despite differing adenovirus serotype vector, manufacturer's construct, or gene inserts, *Journal of immunotoxicology*, 5(3), 315-335.
- [277]: Wong, G., Richardson, J.S., Pillet, S., Patel, A., Qiu, X., Alimonti, J., et al., (2012). Immune parameters correlate with protection against ebola virus infection in rodents and nonhuman primates, *Science translational medicine*, 4(158), 158ra146
- [278]: Sullivan, N.J., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, T.W., Stanley, D., Johnson, J., et al. (2011). CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates, *Nature medicine*, 17(9), 1128-1131.
- [279]: McCoy, K., Tatsis, N., Koriath-Schmitz, B., Lasaro, M.O., Hensley, S.E., Lin, S. W., et al. (2007). Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human-or chimpanzee-derived adenovirus vectors, *Journal of virology*, 81(12), 6594-6604.
- [280]: Zhu, F.C., Hou, L.H., Li, J.X., Wu, S.P., Liu, P., Zhang, G. R., et al. (2015). Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial, *The Lancet*, 385(9984), 2272-2279.

- [281]: Patel, A., Zhang, Y., Croyle, M., Tran, K., Gray, M., Strong, J., et al. (2007). Mucosal delivery of adenovirus-based vaccine protects against Ebola virus infection in mice, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 413-420.
- [282]: Richardson, J.S., Pillet, S., Bello, A.J., Kobinger, G.P. (2013). Airway delivery of an adenovirus-based Ebola virus vaccine bypasses existing immunity to homologous adenovirus in nonhuman primates, *Journal of virology*, 87(7), 3668-3677.
- [283]: Geisbert, T.W., Bailey, M., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, J., Stanley, D., et al. (2011). Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge, *Journal of Virology*, 85(9), 4222-4233.
- [284]: Kobinger, G.P., Feldmann, H., Zhi, Y., Schumer, G., Gao, G., Feldmann, F., et al. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus, *Virology*, 346(2), 394-401.
- [285]: Roy, S., Zhi, Y., Kobinger, G.P., Figueredo, J., Calcedo, R., Miller, J.R., et al. (2006). Generation of an adenoviral vaccine vector based on simian adenovirus 21, *Journal of general Virology*, 87(9), 2477-2485.
- [286]: Stanley, D.A., Honko, A.N., Asiedu, C., Trefry, J.C., Lau-Kilby, A.W., Johnson, J.C., et al. (2014). Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge, *Nature medicine*.
- [287]: Zhang, Q., Seto, D. (2015). Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine—preliminary report, *The New England journal of medicine*, 373(8), 775-776.
- [288]: Rampling, T., Ewer, K., Bowyer, G., Wright, D., Imoukhuede, E. B., Payne, R., et al. (2015). A monovalent chimpanzee adenovirus Ebola vaccine—preliminary report, *The New England Journal of Medicine*.
- [289]: Marzi, A., Feldmann, H., Geisbert, T.W., Falzarano, D. (2011). Vesicular stomatitis virus-based vaccines for prophylaxis and treatment of filovirus infections, *Journal of bioterrorism & biodefense*, (4).
- [290]: Geisbert, T.W., Feldmann, H. (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1075-1081.
- [291]: Jones, S.M., Ströher, U., Fernando, L., Qiu, X., Alimonti, J., Melito, P., et al. (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 404-412.
- [292]: Jones, S.M., Feldmann, H., Ströher, U., Geisbert, J.B., Fernando, L., Grolla, A., et al. (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses, *Nature medicine*, 11(7), 786-790.
- [293]: Geisbert, T.W., Daddario-DiCaprio, K.M., Geisbert, J.B., Reed, D.S., Feldmann, F., Grolla, A., et al. (2008). Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses, *Vaccine*, 26(52), 6894-6900.

- [294]: Qiu, X., Fernando, L., Alimonti, J.B., Melito, P.L., Feldmann, F., Dick, D., et al. (2009). Mucosal Immunization of Cynomolgus Macaques with the VSV Δ G/Z EBOVGP Vaccine Stimulates Strong Ebola GP-Specific Immune Responses, *PloS one*, 4(5), e5547.
- [295]: Mire, C.E., Geisbert, J.B., Agans, K.N., Satterfield, B.A., Versteeg, K.M., Fritz, E.A., et al. (2014). Durability of a vesicular stomatitis virus-based marburg virus vaccine in nonhuman primates, *PloS one*, 9(4), e94355.
- [296]: Feldmann, H., Jones, S.M., Daddario-DiCaprio, K.M., Geisbert, J.B., Ströher, U., Grolla, A., et al. (2007). Effective post-exposure treatment of Ebola infection, *PLoS Pathogens*, 3(1), e2.
- [297]: Geisbert, T.W., Daddario-DiCaprio, K.M., Williams, K.J., Geisbert, J.B., Leung, A., Feldmann, F., et al. (2008). Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates, *Journal of virology*, 82(11), 5664-5668.
- [298]: Daddario-DiCaprio, K.M., Geisbert, T.W., Ströher, U., Geisbert, J.B., Grolla, A., Fritz, E.A., et al. (2006). Postexposure protection against Marburg haemorrhagic fever with recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates: an efficacy assessment, *The Lancet*, 367(9520), 1399-1404.
- [299]: Marzi, A., Robertson, S.J., Haddock, E., Feldmann, F., Hanley, P. W., Scott, D. P., et al. (2015). VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain, *Science*, 349(6249), 739-742.
- [300]: Geisbert, T.W., Bausch, D.G., Feldmann, H. (2010). Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Reviews in medical virology*, 20(6), 344-357.
- [301]: Falzarano, D., Feldmann, F., Grolla, A., Leung, A., Ebihara, H., Strong, J.E., et al. (2011). Single Immunization With a Monovalent Vesicular Stomatitis Virus–Based Vaccine Protects Nonhuman Primates Against Heterologous Challenge With Bundibugyo ebolavirus. *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1082-1089.
- [302]: Marzi, A., Ebihara, H., Callison, J., Groseth, A., Williams, K.J., Geisbert, T.W., Feldmann, H. (2011). Vesicular stomatitis virus–based Ebola vaccines with improved cross-protective efficacy, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1066-1074.
- [303]: Geisbert, T.W., Geisbert, J.B., Leung, A., Daddario-DiCaprio, K.M., Hensley, L.E., Grolla, A., Feldmann, H. (2009). Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus, *Journal of virology*, 83(14), 7296-7304.
- [304]: Johnson, J.E., Nasar, F., Coleman, J.W., Price, R.E., Javadian, A., Draper, K., et al. (2007). Neurovirulence properties of recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates, *Virology*, 360(1), 36-49.
- [305]: Mire, C.E., Miller, A.D., Carville, A., Westmoreland, S.V., Geisbert, J.B., Mansfield, K.G., et al. (2012). Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates, *PLoS Neglected Tropical Disease*, 6(3), e1567.

[306]: Geisbert, T.W., Daddario-DiCaprio, K.M., Lewis, M.G., Geisbert, J.B., Grolla, A., Leung, A., et al. (2008). Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates, *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000225.

[307]: Marzi, A., Engelmann, F., Feldmann, F., Haberthur, K., Shupert, W.L., Brining, D., et al. (2013). Antibodies are necessary for rVSV/ZEBOV-GP-mediated protection against lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1893-1898.

[308] : Agnandji, S.T., Huttner, A., Zinser, M.E., Njuguna, P., Dahlke, C., Fernandes, J.F., et al. (2015). Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe—preliminary report, *New England Journal of Medicine*.

[309]: Regules, J. A., Beigel, J. H., Paolino, K. M., Voell, J., Castellano, A. R., Muñoz, P., et al. (2015). A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine—preliminary report, *New England Journal of Medicine*.

Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

HOUOT ALEXANDRA

**LE VIRUS EBOLA, DE SA DECOUVERTE AU DEVELOPPEMENT D'UNE
VACCINATION EFFICACE**

RESUME

Le virus Ebola appartient à la famille des *Filovirus*, qui regroupe les virus à la morphologie filamenteuse unique dans le monde de la virologie. La maladie à virus Ebola, dont les épidémies humaines successives très meurtrières intéressent l'Afrique, est une maladie émergente, bien que les *Filovirus* soient des virus très anciens. Cette zoonose a pour espèce réservoir, la chauve-souris frugivore, qui va contaminer l'Homme directement ou par l'intermédiaire des populations de grands singes et petits animaux de brousse, lors de la chasse notamment. Le virus se transmet par contact direct avec les fluides corporels d'un animal ou d'une personne infectés. La virulence du virus Ebola, l'absence de traitement ou vaccin efficaces, et son utilisation potentielle comme arme biologique, font de ce virus une menace majeure pour la Santé Publique et une priorité en termes de recherche scientifique. Le virus va déréguler les réponses immunitaires innée et adaptative, via un défaut de maturation de la cellule dendritique. La glycoprotéine virale, responsable de l'entrée du virus dans la cellule-hôte et directement accessible aux anticorps neutralisants, constitue l'antigène-clé pour la vaccination anti-Ebola. Le développement de vecteurs viraux recombinants a permis d'obtenir une réelle efficacité vaccinale chez les modèles animaux, avec une seule injection. Le virus recombinant de la Stomatite Vésiculeuse ainsi que l'*Adenovirus* recombinant de chimpanzé de type 3 contenant le gène de la glycoprotéine du virus Ebola constituent les deux candidats vaccinaux majeurs et ont fait l'objet d'essais cliniques de phase III au cours de l'épidémie de 2014-2015 en Afrique de l'Ouest.

LES MOTS CLES : *Filovirus*, fièvre hémorragique, maladie émergente, zoonose, immunosuppression, glycoprotéine virale, vecteurs vaccinaux

ADRESSE : [Données à caractère personnel]

FILIERE : OFFICINE