

50376 -
1999 -
467

N° d'ordre

UNIVERSITE DE LILLE-I

UFR de BIOLOGIE

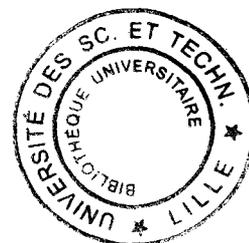
Thèse de Doctorat
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE-I

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Option: IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement par

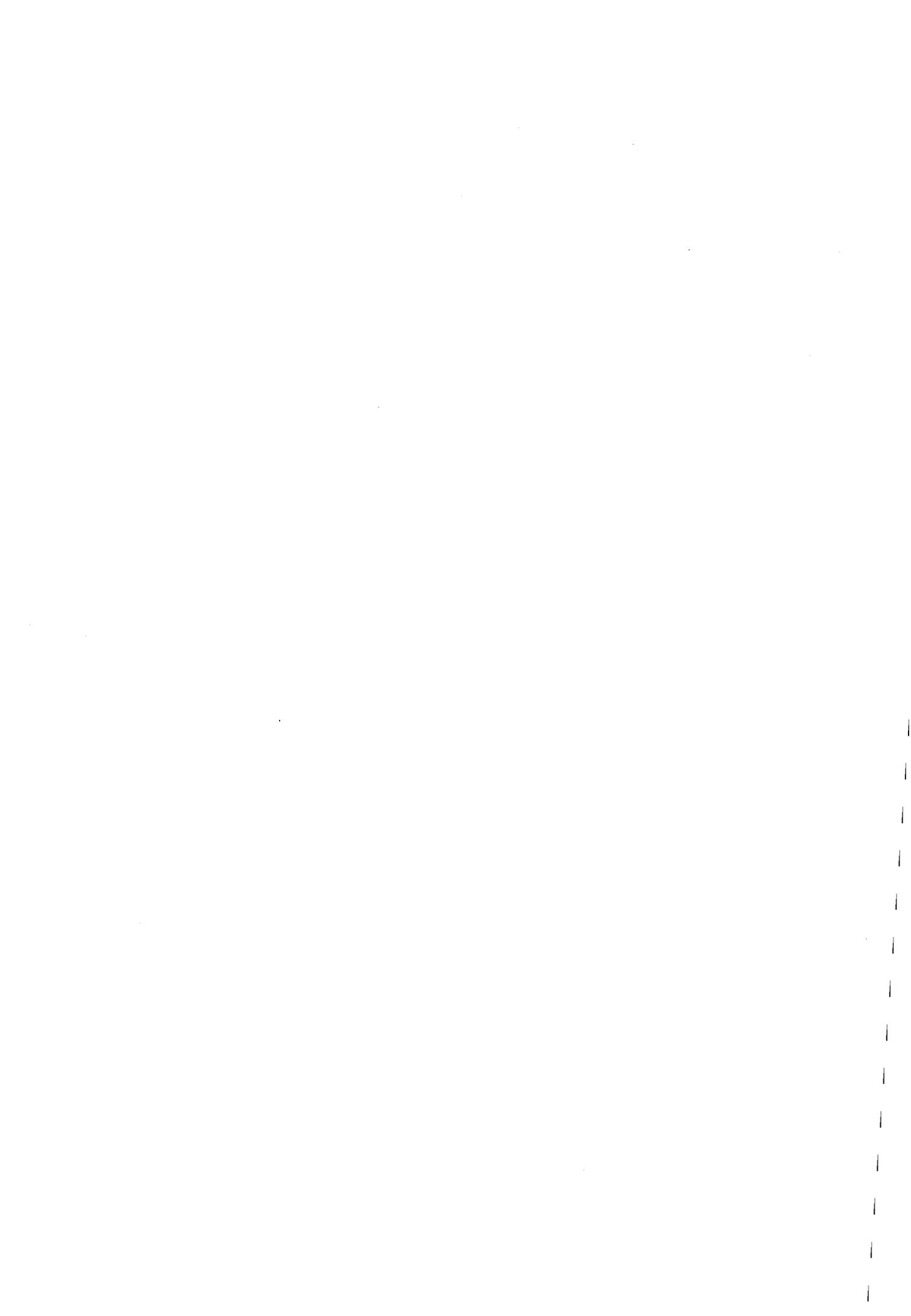
Sylvain BAIZE



**La réponse immune au cours de l'infection
humaine par le virus Ebola**

Soutenue le 21 Décembre 1999 devant la commission d'examen :

Professeur André Verbert, Président
Professeur Monique Capron, Directeur de thèse
Professeur Patrice Debré, Rapporteur
Docteur Joseph B. McCormick, Rapporteur
Professeur André Capron, Examineur
Docteur Alain J. Georges, Examineur



Ce travail de thèse a été réalisé

au **CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHES MEDICALES DE FRANCEVILLE (GABON)**

dans l'UNITE DE RECHERCHES SUR LES MALADIES EMERGENTES,

dirigée par le Docteur Joseph Lansoud-Soukate

sous la direction du Professeur Monique Capron,

CENTRE D'IMMUNOLOGIE ET DE BIOLOGIE PARASITAIRE,

INSERM U167, INSTITUT PASTEUR DE LILLE

et du Docteur Alain J. Georges

Ces travaux ont été financés par ELF-Gabon, l'état du Gabon, le Ministère de la Coopération Française et par une bourse du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (France)

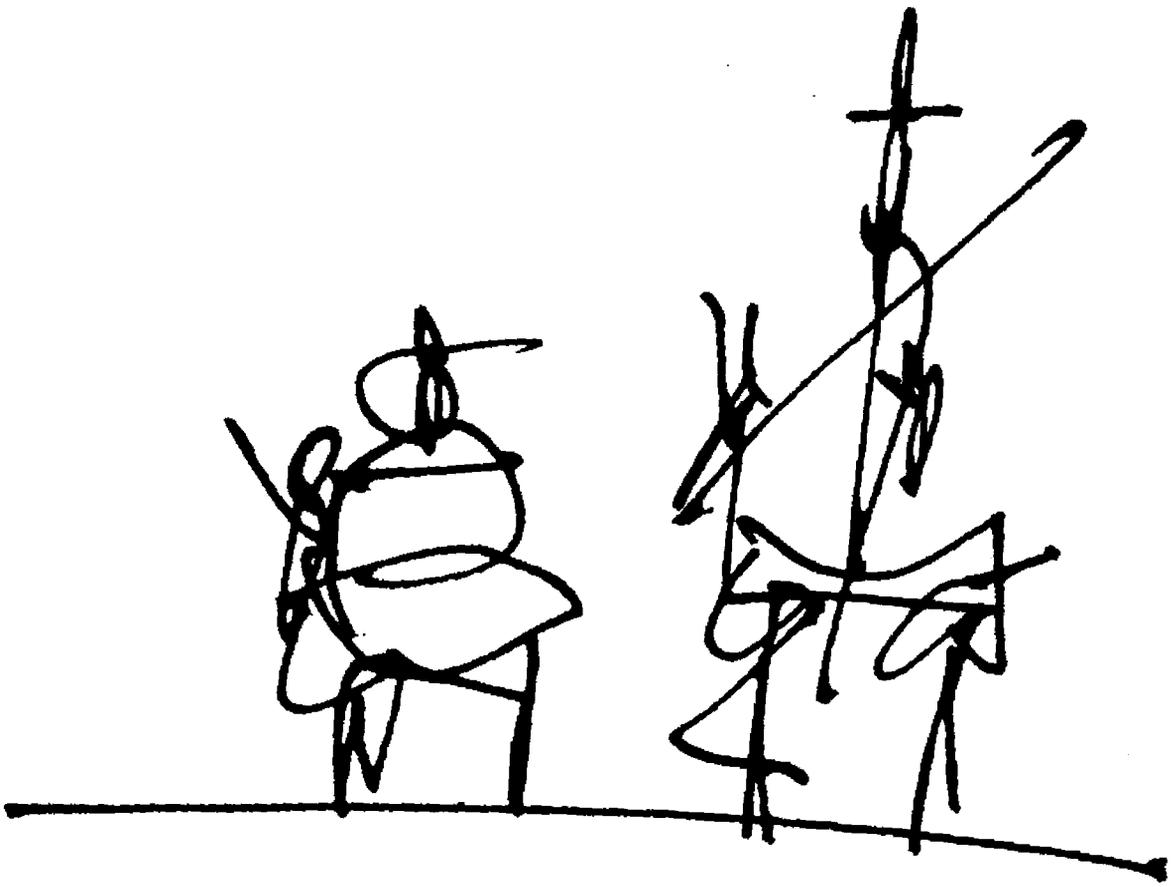


Illustration d'Antonio Saura, Le Seuil, 1997

En hommage aux survivants et à la Mémoire des nombreuses victimes de ces épidémies, pour leur courage et leur dignité face aux terribles souffrances qu'ils ont endurées, et contre lesquelles nous n'avions qu'un peu de réconfort à opposer.

*A mes parents,
pour l'éducation qu'ils m'ont donnée.*

*A Adeline,
pour tout ce que nous avons vécu depuis bientôt quatre ans,
pour tout ce que nous sommes en train de construire,
pour tout ce que tu as supporté.*

A Monsieur le Professeur Verbert, pour son riche enseignement pendant mes années de Biochimie, pour son précieux soutien depuis de nombreuses années, qui a beaucoup contribué à la réalisation de ce travail, et pour l'honneur qu'il m'a fait de présider cette thèse.

A Monsieur le Professeur Capron. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre prestigieux laboratoire, il y a maintenant sept ans, et permis de connaître cette expérience humaine et scientifique unique. Que vous ayez accepté d'examiner ce travail est pour moi une grande satisfaction et un honneur.

A Madame le Professeur Capron. Votre enthousiasme, votre patience, et votre disponibilité ont eu raison de la distance. Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail et de m'avoir toujours soutenu.

A Monsieur le Docteur Georges. Votre dynamisme, votre clairvoyance scientifique et votre volonté sans faille ont permis d'initier cette aventure, pour laquelle j'ai toujours pu bénéficier de conditions matérielles exceptionnelles et d'un environnement scientifique stimulant. Votre intelligence, votre culture, et la philosophie qui vous anime, m'ont beaucoup appris. Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail et vous exprime ma profonde reconnaissance et mon admiration.

Monsieur le Professeur Debré. Je vous remercie pour le soutien et l'intérêt que vous avez toujours manifesté pour ce travail, et également d'avoir accepté d'être mon rapporteur, ce qui est pour moi un immense honneur.

Monsieur le Docteur McCormick. Votre expertise, votre disponibilité, ainsi que les nombreuses discussions que nous avons eues sur les fièvres hémorragiques ont beaucoup contribué à ce travail et à mes connaissances. Je vous remercie également d'avoir accepté d'être mon rapporteur, sans oublier votre hospitalité et votre accueil chaleureux à chacune de mes visites Lyonnaises.

Monsieur le Docteur Lansoud-Soukate. Pour votre implication cruciale dans le domaine des fièvres hémorragiques, tant sur le terrain lors des épidémies, dans la sensibilisation des personnels de santé, que dans l'initiation et le soutien des recherches sur les maladies émergentes, et enfin pour l'intérêt que vous avez toujours manifesté pour ce travail, je vous exprime ma grande reconnaissance.

Madame le Docteur Fisher-Hoch. Votre expertise des fièvres hémorragiques et votre enthousiasme ont contribué à faire de ce travail ce qu'il est aujourd'hui. Je vous remercie pour l'aide inestimable que vous m'avez apportée et pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé.

Monsieur le Docteur Mavoungou. Tes compétences scientifiques, ta gentillesse, ta sagesse, ta force paisible et ta personnalité sont autant de qualités qui m'inspirent un profond respect et qui font que travailler avec toi est un plaisir. Je te suis également reconnaissant pour ton aide dans la rédaction de ce document. Mon seul souhait est que nous puissions continuer cette aventure.

Madame le Docteur Georges-Courbot. Le soutien, l'enthousiasme et l'ambiance chaleureuse dont j'ai bénéficié dans votre service, ainsi que votre gentillesse et votre attention m'ont beaucoup aidé, je vous en suis reconnaissant.

Je remercie les Docteurs Pendy et Obiang pour nous avoir facilité l'accès aux patients et pour leur amicale et fructueuse collaboration.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Pambo et Richard Heffernan, pour leur précieuse collaboration, leur enthousiasme, l'accueil privilégié dont nous avons toujours bénéficié à Makokou, et les nombreux projets et discussions que nous avons eus ces dernières années.

Je remercie également Pierre E. Rollin, Thomas G. Ksiazek et Antony Sanchez (Special Pathogen Branch, Center for Disease Control, Atlanta), ainsi que Viktor E. Volchkov (Marburg, Allemagne) pour nous avoir généreusement fourni de précieux réactifs spécifiques, permettant ainsi l'initiation de ces travaux, et pour l'aide importante qu'ils nous ont apportée.

Eric. Tout le chemin que nous avons fait ensemble depuis ces six années, les interminables discussions et spéculations scientifiques, mais aussi tous les moments que nous avons partagés, au cours de nos multiples périples, ont forgé une amitié solide. Je te remercie et souhaite que cette aventure scientifique continue.

Je souhaite remercier tout particulièrement les membres de l'Unité de Recherches sur les Maladies Emergentes, M^{me} Sall Aïcha, M^r Yaba Philippe, M^r Mbou-Moutsimbi Roger, M^r Délicat André et M^{me} Mandeme Yvette pour leur précieuse aide tant sur le terrain qu'au laboratoire, mais aussi pour les agréables moments passés ensemble pendant toutes ces années.

Issa Bedjabaga, tu as guidé nos premiers pas dans le 'p4', tu nous as transmis ta grande expérience de ce type de travail et apporté une aide très précieuse par ton efficacité et ton savoir-faire, tant sur le terrain qu'au cours des longues heures passées dans le labo. Je te remercie également pour ta bonne humeur, tes conseils et ton amitié fraternelle depuis tant d'années. Je remercie également Paul Ngari, dont nous avons souvent sollicité les compétences techniques.

Je tiens à remercier Paul Tshipamba pour son grand savoir-faire lors des prélèvements des malades, et également pour avoir agrémenté la plupart des missions de son humour et de sa perpétuelle bonne humeur. Un grand merci aussi à Blaise Kambiri, pour sa maîtrise et l'ambiance chaleureuse qui a toujours régné pendant ces missions pourtant difficiles.

Docteur Tevi-Benissan. Pour ta contribution au travail de terrain, où tu as su conjuguer avec talent médecine et diplomatie, et surtout pour l'amitié sincère qui s'est très rapidement instaurée entre nous, je te remercie.

J'exprime ma reconnaissance au Docteur Renaut, qui par son énorme travail épidémiologique lors des deux premières épidémies, a beaucoup contribué à ces recherches. Merci également au Docteur Nabias pour son aide et son amicale collaboration.

Simone, pour tout ce que tu m'as appris lorsque nous travaillions ensemble sur les filaires, mais également pour les innombrables heures de discussion, les fêtes et autres sorties, ton hospitalité, et ta générosité, merci.

A mes amis ex-'thésards' et 'thésards', Benjamin, Fousseyni, Richard, Landry, pour tous les moments difficiles ou, au contraire, joyeux, que nous avons partagés, pour leur amitié, les discussions passionnées, le soutien quotidien que nous nous sommes mutuellement apportés tout ce temps, et bien sûr pour les nombreuses nuits de cristallisation.

Un grand merci également à Maggy Blampain, pour l'inlassable combat qu'il mène avec brio contre l'inévitable entropie qui frappe le matériel électronique, mais aussi pour son humour, sa sympathie, sa perpétuelle et inaltérable bonne humeur, et enfin pour sa précieuse contribution dans la mise en place du laboratoire de haute sécurité.

Merci à Blaise Villanova, Delphin Bakwene, et tous les intervenants qui ont contribué à la construction et à l'amélioration de ce laboratoire, et qui ont su faire preuve de beaucoup d'ingéniosité et de talent.

Je remercie Brice Okogo et Innocent Assomo pour l'aide efficace qu'ils m'ont toujours apportée en matière d'informatique, et bien sûr pour tous les moments d'amitié et de fête que nous avons vécus par ailleurs.

A toutes les autres personnes du CIRMF, que je ne peux nommer, avec qui j'ai passé des moments formidables et inoubliables, et qui font de ce centre un endroit particulièrement chaleureux et motivant, mais aussi à tous les amis que j'ai connus et qui m'ont tant apporté pendant toutes ces années de vie africaine.

Je suis très reconnaissant au Docteur Grzych, à Sophia Lafitte, Josette Fontaine, Sylvie Vermersch, Anne-Marie Schacht et Jean-Loup Neyrinck pour ce qu'ils m'ont appris au cours de mon DEA et pour l'accueil qu'ils me réservent à chacune de mes venues à l'Institut Pasteur de Lille. Merci aussi à Franck Remoué pour les nombreuses discussions que nous avons eues, les idées partagées et son aide amicale.

Sophie. Je pense souvent à toi, à la profonde amitié et l'intimité qui nous lient depuis ces années, à tous les moments de joie et de peine que nous avons connus et qui ont rendu cette année de DEA inoubliable. Tu comptes beaucoup pour moi. Merci également pour l'inestimable aide que tu m'as toujours apportée.

Monica. Pour ton amitié fidèle, ta personnalité, ta volonté, et ta patience ; pour tous les moments que nous avons partagés et les heures de parlotte, que ce soit à Lille, Porto, ou au Gabon, et enfin pour le plaisir que j'ai à te retrouver à chacun de mes brefs retours et ton aide précieuse, merci.

Gilles. Je garde un grand souvenir de nos débats passionnés à chaque film visionné ou chaque disque auditionné. Tu m'as fait découvrir la musique contemporaine, quel cadeau ! Tu m'as également donné, en me racontant tes souvenirs de Centrafrique, le goût de partir en coopération. Pour ton intelligence, ton humour sarcastique et ta vision de la vie, Merci.

Un grand merci à Charlotte Hémar pour sa patience et son aide inestimable à résoudre les nombreux tracas liés à la distance et aux problèmes de communications.

Ce travail a donné lieu ou a contribué aux publications et communications suivantes:

PUBLICATIONS.

-*Georges-Courbot M-C, Lu CY, Lansoud-Soukate J, Leroy EM & S Baize*. 1997. Isolation and partial molecular characterisation of a strain of Ebola virus during a recent epidemic of viral haemorrhagic fever in Gabon. *Lancet* 349 : 181 (voir Annexes)

-*Georges-Courbot M-C, Sanchez A, Lu CY, Baize S, Leroy EM, Lansoud-Soukate J, Tevi-Benissan C, Georges AJ, Trappier SG, Zaki SR, Swanepoel R, Leman PA, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST & TG Ksiazek*. 1997. Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. *Emerg. Inf. Dis.* 3 : 59-62

-*Georges AJ, Baize S, Leroy EM & M-C Georges-Courbot*. 1998. Virus Ebola : l'essentiel pour le praticien. *Méd. Trop.* 58 : 177-186 (article sollicité)

-*Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, Tevi Benissan C, Nabias RJ, Trinh Ngoc M, Obiang PI, Lepage JPM, Bertherat EJ, Bénoni DD, Wickings FJ, Amblard JP, Lansoud-Soukate J, Milleliri JM, Baize S & M-C Georges-Courbot*. 1999. Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I) : 65-75

-*Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot M-C, Capron M, Lansoud-Soukate J, Debré P, Fisher-Hoch SP, McCormick JB & AJ Georges*. 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nature Med.* 5 : 423-426 (voir Annexes)

-*Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot M-C, Capron M, Lansoud-Soukate J & AJ Georges*. 1999. Réponse immune précoce et le contrôle de l'infection par le virus Ebola. *Méd. Sci.* 15, n° 10, pp (voir Annexes, article sollicité)

-*Baize S, Leroy EM, Mavoungou E & SP Fisher-Hoch*. 1999. Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system ? *Apoptosis*, sous presse (voir Annexes, article sollicité)

-*Leroy EM, Baize S, Lu CY, McCormick JB, Georges AJ, Georges-Courbot M-C, Lansoud-Soukate J & SP Fisher-Hoch*. 1999. Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *J. Med. Virol.*, sous presse

-*Leroy EM, Baize S, Volchkov VE, Fisher-Hoch SP, Georges-Courbot M-C, Lansoud-Soukate J, Capron M, Debré P, McCormick JB & AJ Georges*. 1999. Human asymptomatic Ebola infection exists and is associated with a robust inflammatory response. *soumis*

-*Baize S, Leroy EM, Georges AJ, Capron M, Mavoungou E & J Lansoud-Soukate*. Early inflammatory responses are associated with the control of Ebola virus infection in human. *En préparation*

-*Leroy EM, Baize S, Mavoungou E, Debré P, McCormick JB, Lansoud-Soukate J & SP Fisher-Hoch*. 1999. T cell responses during human asymptomatic Ebola infection. *En préparation*

COMMUNICATIONS.

-Georges AJ, Renaut A, Bertherat E, Baize S, Leroy EM, et al. Recent Ebola virus outbreaks in Gabon from 1994 to 1996: epidemiologic and control issues. *Proceedings of the International Colloquium on Ebola Virus Research*. 1996. 4-7 Sept, Antwerp, Belgium.

-Georges-Courbot M-C, Baize S, Leroy EM, Renaut A, Gonzales J-P & AJ Georges. Viral haemorrhagic fevers in Gabon: a review of the position after fifteen years of experience. *première conférence internationale de virologie et de microbiologie*. 1996. 17-23 Nov, Yaoundé, Cameroun.

-Georges AJ, Baize S, Leroy EM & M-C Georges-Courbot. Eléments de réponses immunes et de pathogénie des évolutions fatales chez les sujets infectés par le virus Ebola. *6^{ème} actualités du Pharo, journées annuelles de pathologie et de santé publique tropicales*. 1999. 3-4 Sept, Marseille, France, CY04, p41.

-Georges-Courbot M-C, Leroy EM, Baize S & AJ Georges. Valeur de la RT-PCR Ebola dans le diagnostic précoce de la maladie: son intérêt dans un contexte d'épidémie de fièvre hémorragique virale. *6^{ème} actualités du Pharo, journées annuelles de pathologie et de santé publique tropicales*. 1999. 3-4 Sept, Marseille, France, CY05, p41.

PUBLICATIONS DANS D'AUTRES MALADIES TRANSMISSIBLES.

-Baize S, Wahl G, Soboslay PT, Egwang TG & AJ Georges. 1997. T helper responsiveness in human *Loa loa* infection ; defective specific proliferation and cytokine production by CD4+ T cells from microfilaraemic subjects compared with amicrofilaraemics. *Clin. Exp. Immunol.* 108, 272-278

-Leroy EM, Baize S, Wahl G, Egwang TG & AJ Georges. 1997. Experimental infection of a non-human primate with *Loa loa* induces transient strong immune activation followed by peripheral unresponsiveness of helper T cells. *Infect. Immun.* 65, 1876-1882

COMMENTAIRES RELATIFS A L'ARTICLE DE NATURE MEDICINE.

-Nabel GJ. Surviving Ebola virus infection. NEWS & VIEWS. *Nature Med.* 5, 373-374 (voir Annexes)

-Hilts PJ. Balanced Immune Response May Fight Ebola. *New York Times*, 30 Mars 1999

-Faber C. Ebola. La réponse immune précoce détermine l'issue de l'infection. *Le Quotidien du Médecin*, 30 Mars 1999, p11

-John JF. Surviving Ebola virus. ABSTRACT & COMMENTARY. *Infect. Dis. Alert* 15, 131-133 (voir Annexes)

TABLE DES MATIERES

Introduction	25
I. LES FIEVRES HEMORRAGIQUES A FILOVIRUS, UN PROBLEME CROISSANT DE SANTE PUBLIQUE.	27
1. Historique des épidémies de fièvres hémorragiques à filovirus.	27
2. Une gradation dans la pathogénicité en fonction des sous-types viraux.	29
3. Histoire naturelle des filovirus.	30
<i>Les filovirus et leur écosystème.</i>	30
<i>Un réservoir naturel inconnu.</i>	31
<i>Les primates non-humains, des intermédiaires entre le réservoir et l'homme.</i>	31
<i>La transmission des filovirus.</i>	32
4. Le diagnostic des infections filovirales.	33
<i>Des prélèvements biologiques à hauts risques.</i>	33
<i>Un tableau clinique peu spécifique.</i>	34
<i>L'isolement viral.</i>	34
<i>La détection des filovirus sur des coupes de tissus.</i>	35
<i>La détection des antigènes circulants.</i>	35
<i>La détection de l'ARN viral dans le sang par RT-PCR.</i>	36
<i>Le diagnostic sérologique.</i>	36
<i>L'immunofluorescence sur lames.</i>	36
<i>La détection des IgM et IgG.</i>	37
5. Une absence de traitement et de prophylaxie, un contrôle difficile des épidémies.	37
<i>Des traitements symptomatiques.</i>	37
<i>L'isolement des patients, seul moyen de contrôle des épidémies.</i>	38

<i>Des difficultés liées à l'enclavement des zones touchées.</i>	39
6. Les filovirus, un risque majeur pour l'avenir.	39
II. LES FILOVIRUS.	41
1. Morphologie et structure des filovirus.	41
2. Phylogénie des filovirus.	42
3. Stabilité génétique des filovirus.	43
4. Le génome filoviral.	44
5. Réplication virale et synthèse des protéines.	46
<i>Le complexe ribonucléoprotéique.</i>	46
<i>Les protéines associées à la membrane, la VP24 et la VP40.</i>	47
<i>La glycoprotéine membranaire et les glycoprotéines solubles (GPs).</i>	47
6. Un récepteur cellulaire inconnu.	52
III. PHYSIOPATHOLOGIE DES FIEVRES HEMORRAGIQUES A FILOVIRUS.	54
1. Tableau clinique des fièvres hémorragiques à filovirus.	54
<i>La période d'incubation.</i>	54
<i>Une évolution biphasique.</i>	54
<i>La convalescence.</i>	56
<i>Les modèles primates d'infection par les filovirus, un tableau clinique similaire à celui de l'Homme.</i>	57
2. Physiopathogenèse des fièvres hémorragiques à filovirus.	58
<i>Paramètres virologiques au cours de l'infection de l'homme et des primates non-humains par les filovirus.</i>	58
<i>Virémie et antigénémie.</i>	58
<i>Charge virale tissulaire.</i>	60
<i>Le monocyte/macrophage, première et principale cible virale.</i>	60
<i>Un tropisme évolutif.</i>	61
<i>Modifications physiopathologiques au cours des fièvres hémorragiques à filovirus.</i>	63
<i>Les modifications de la formule sanguine.</i>	63
<i>La moelle osseuse.</i>	64

Les altérations des vaisseaux sanguins.	64
La rate et les ganglions lymphatiques, ou la destruction des organes lymphoïdes.	65
Une atteinte hépatique sévère.	67
Les dysfonctionnements rénaux.	69
Les glandes surrénales.	70
Les poumons.	71
Le système digestif.	72
Les organes de reproduction.	72
Le cœur.	72
Le système nerveux.	73
<i>Les troubles de l'hémostase, des éléments majeurs de la physiopathogénèse.</i>	73
La coagulation intravasculaire disséminée.	73
Un dysfonctionnement des plaquettes.	75
Les hémorragies généralisées.	75
<i>Les infections filovirales non-fatales.</i>	77
3. L'adaptation virale dans les modèles d'infection de rongeurs.	77
IV. LA REPONSE IMMUNE AU COURS DES INFECTIONS FILOVIRALES.	80
1. Infection fatale et effondrement du système immunitaire.	80
<i>Une absence de réponse inflammatoire dans les tissus infectés.</i>	80
<i>Une suppression de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique en réponse aux mitogènes.</i>	81
<i>Une activation cellulaire non-spécifique potentiellement pathogène.</i>	81
<i>Une réponse humorale inexistante.</i>	82
<i>Implication de certaines protéines virales dans l'effondrement du système immunitaire.</i>	83
<i>Implication du tropisme des filovirus dans la réponse immune défectueuse.</i>	84
2. La réponse immune au cours de l'infection non-fatale par les filovirus.	86

<i>Une réaction inflammatoire granulomateuse est associée au contrôle des infections filovirales chez le cobaye.</i>	86
<i>Une réponse humorale spécifique importante et durable.</i>	87
V. PERSPECTIVES VACCINALES ET THERAPEUTIQUES.	89
1. De nombreuses études vaccinales dans les modèles expérimentaux.	89
<i>Protection acquise après une première infection filovirale.</i>	89
<i>Immunisation par des Ag ou des préparations virales inactivées.</i>	90
<i>L'utilisation de vecteurs vivants et les vaccins à ADN.</i>	91
<i>L'immunopathogénèse et la vaccination.</i>	92
2. Les perspectives thérapeutiques.	93
<i>L'immunothérapie, des résultats mitigés.</i>	93
<i>Les molécules anti-virales, des résultats prometteurs.</i>	95
Résultats	97
AVANT-PROPOS	99
I. LES EPIDEMIES DE FHV A VIRUS EBO-Z DE MAYIBOUT ET BOOUE (GABON, 1996).	103
1. Description des épidémies.	103
<i>Mayibout, février 1996.</i>	103
<i>Booué, octobre 1996.</i>	105
2. Le diagnostic.	108
II. PARAMETRES VIROLOGIQUES AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z (SOUCHE GABON).	110
1. L'antigénémie circulante, similitudes entre les patients au début de la phase symptomatique et corrélation à la phase clinique de la maladie.	110
2. Détection de l'ARN viral dans les PBMC de patients.	111

3. Phylogénie et comparaison des différentes souches Gabonaises de virus Ebola.	112
III. LA REPONSE HUMORALE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z.	114
1. Une réponse humorale déficiente au cours de l'infection fatale.	114
<i>Analyse des réponses IgM et IgG spécifiques par ELISA.</i>	114
<i>Confirmation de l'absence d'IgG spécifiques du virus Ebo-Z par western blot.</i>	115
2. Une réponse humorale précoce associée à la guérison.	116
<i>Analyse des réponses IgM et IgG spécifiques par ELISA.</i>	116
<i>Analyse des isotypes d'IgG spécifiques par ELISA.</i>	117
<i>Analyse des Ag reconnus par les IgG par western blot.</i>	118
IV. LA REPONSE INFLAMMATOIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z.	120
1. Une réponse inflammatoire déficiente associée à l'infection fatale.	120
<i>Dosage de cytokines pro-inflammatoires, de leurs antagonistes et récepteurs solubles.</i>	120
<i>Détection de chemokines au cours de l'infection fatale.</i>	121
<i>Dosage des dérivés du monoxyde d'azote, de la néoptérine et d'une protéine de phase aiguë.</i>	122
<i>Une production élevée de molécules anti-inflammatoires.</i>	122
2. Réponse inflammatoire précoce et contrôle de l'infection.	123
<i>Une synthèse précoce de cytokines pro-inflammatoires.</i>	123
<i>Une production précoce de chemokines.</i>	124
<i>Dosage du monoxyde d'azote, de la néoptérine et de la SAA au cours de l'infection non-fatale par le virus Ebo-Z.</i>	125
<i>Les molécules anti-inflammatoires au cours de l'infection non-fatale.</i>	126
V. LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T AU COURS DES FHV A VIRUS EBO-Z.	127

1. Activation précoce de cellules cytotoxiques et apoptose intravasculaire massive sont associées à l'infection fatale.	127
<i>Analyse de cytokines dédiées aux lymphocytes T, une production élevée d'IFNγ.</i>	127
<i>Analyse de marqueurs d'activation associés à la réponse lymphocytaire T.</i>	128
<i>Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC.</i>	129
<i>Analyse du répertoire Vβ du récepteur des lymphocytes T par RT-PCR.</i>	130
<i>Mise en évidence de mort cellulaire intravasculaire par apoptose.</i>	130
2. L'activation de lymphocytes T cytotoxiques est corrélée à la disparition de l'antigénémie chez les patients survivants.	132
<i>Détection de cytokines dédiées aux lymphocytes T.</i>	132
<i>Analyse de marqueurs d'activation associés à la réponse lymphocytaire T.</i>	133
<i>Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC.</i>	134
<i>Etude du répertoire Vβ par RT-PCR dans les PBMC de survivants.</i>	134
<i>Stimulation in vitro de PBMC de convalescents par des Ag Ebo-Z.</i>	135
Expression de cytokines en réponse à la stimulation.	135
Expression de marqueurs d'activation en réponse à la stimulation.	137
Discussion	139
<i>Les fièvres hémorragiques à virus Ebo-Z (souche Gabon).</i>	141
<i>La RT-PCR du gène L d'Ebo-Z, un puissant outil de diagnostic.</i>	142
<i>Le virus Ebo-Z (souche Gabon).</i>	144
<i>Des paramètres viraux similaires au début de la phase symptomatique.</i>	146
<i>La réponse humorale et l'issue des FHV à virus Ebo-Z.</i>	147
<i>Une réponse inflammatoire défectueuse caractérise l'infection fatale.</i>	151
<i>Réponse inflammatoire précoce et contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z.</i>	156
<i>Activation précoce de cellules cytotoxiques, apoptose intravasculaire massive et pathogenèse de l'infection fatale.</i>	161
<i>Activation de lymphocytes T cytotoxiques 'protecteurs' au cours de l'infection non-fatale.</i>	168

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
Surveillance épidémiologique des fièvres hémorragiques virales.	172
Pathogenèse de l'infection fatale par Ebo-Z et réponses immunes défectueuses.	173
La réponse immune et le contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z.	174
Matériel et Méthodes	175
<i>Le laboratoire et les équipements de protection.</i>	177
<i>Les prélèvements sanguins et le transport des échantillons.</i>	177
2. Détection des Ag circulants d'Ebo-Z.	178
3. Isolement viral.	178
4. Amplification d'un fragment du gène L d'Ebo-Z.	179
<i>Transcription inverse.</i>	179
<i>Amplification par PCR du fragment du gène L.</i>	180
<i>'Nested'-PCR du gène L d'Ebo-Z.</i>	180
5. Immuno-capture des IgM spécifiques d'Ebo-Z.	180
6. Détection des IgG spécifiques d'Ebo-Z par ELISA.	181
<i>Détection des IgG spécifiques totales.</i>	181
<i>Détection des isotypes d'IgG spécifiques d'Ebo-Z.</i>	181
7. Analyse par western blot de la réponse IgG spécifique.	181
8. Dosages immuno-enzymatiques (ELISA).	182
9. Détection dans les PBMC d'ARNm spécifiques de marqueurs d'activation par RT-PCR.	183
10. Détection de la fragmentation de l'ADN des leucocytes circulants.	184
11. Stimulation <i>in vitro</i> de PBMC de survivants.	185
Annexes	187
Bibliographie	217

Abréviations

Ac	Anticorps	LDH	Lactate déshydrogénase
AcMc	Anticorps monoclonal	MALT	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante d'Ac	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
ADNc	ADN complémentaire	MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
Ag	Antigène	NK	Cellule tueuse naturelle (Natural Killer)
AICD	Mort cellulaire induite par l'activation (activation-induced cell-death)	NMP	Protéine de matrice nucléaire
ALT	Alanine transaminase	NP	Nucléoprotéine
ARNdb	ARN double-brin	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ARNm	ARN messenger	pb	Paires de bases
AST	Aspartate transaminase	PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells)
CDC	Center for disease Control, Atlanta, USA	PMA	Phorbol myristate acétate
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée	PNH	Primates non-humains
CMH I/II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II	PKR	Protéine-kinase activée par l'ARN double-brin
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes	RDC	République Démocratique du Congo
CTL	Lymphocyte T cytotoxique	RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
DFO	Desferrioxamine	RT-PCR	Transcription inverse-réaction d'amplification en chaîne
dNTP	désoxynucléotides triphosphates	SAA	Sérum amyloid A
DO	Densité optique	SAB	Sérum albumine bovine
Ebo-CI	Ebola-Côte d'Ivoire	sFasL	Fas/CD95 ligand soluble
Ebo-R	Ebola-Reston	sIL-6R	Récepteur soluble à l'IL-6
Ebo-S	Ebola-Soudan	SIV	Virus de l'immunodéficience simienne
Ebo-Z	Ebola-Zaïre	sTNF-RI/II	Récepteur soluble I/II au TNF
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	SVF	Sérum de veau fœtal
ET	Ecart type	TCR	Récepteur à l'antigène des cellules T
FHV	Fièvre hémorragique virale	Th	T helper (lymphocytes)
GC	Glucocorticoïdes	TNF	Tumor necrosis factor
GP(s)	Glycoprotéine (soluble)	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
HRP	Peroxydase (horse-raddish)	VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	VP	Protéine de structure du virion
IFN	Interféron	2'-5'-(A) _N	2'-5'-oligoadénylate synthétase
IgG	Immunoglobuline G		
IgM	Immunoglobuline M		
IL-	Interleukine-		
IL-1RA	IL-1 receptor antagonist		
kDa	Kilo-Dalton		
LCMV	Virus de la méningite chorio-lymphocytaire		

Introduction



I. LES FIEVRES HEMORRAGIQUES A FILOVIRUS, UN PROBLEME CROISSANT DE SANTE PUBLIQUE.

1. Historique des épidémies de fièvres hémorragiques à filovirus.

Les fièvres hémorragiques virales (FHV) sont causées par des virus appartenant aux familles des *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* et *Filoviridae*. La fièvre de Lassa, due à un *Arenaviridae* (1), est endémique en Afrique de l'Ouest, causant plusieurs centaines d'infections graves par an avec une mortalité d'environ 15%, et des dizaines de milliers de cas asymptomatiques ou peu malades avec une mortalité totale d'1 ou 2% (2). La fièvre de Crimée-Congo, causée par un *Bunyaviridae*, sévit en Afrique, en Asie et en Europe de l'Est (3, 4). La fièvre de la Vallée du Rift, également liée à un bunyavirus, est observée en Afrique et à Madagascar, et a fait récemment près de 500 morts en Afrique de l'Est (5). La dengue et la fièvre jaune, 2 autres FHV, sont induites par des *Flaviviridae*. Enfin, les filovirus, seul genre de la famille des *Filoviridae*, sont quant à eux responsables des plus sévères formes de FHV, avec un taux de mortalité de 30 à 80%.

Les filovirus sont des virus à ARN négatif non segmenté et enveloppé appartenant à l'Ordre des Mononégavirales. Il en existe 2 espèces, le virus de Marburg, pour lequel on ne connaît pas de sous-type, et le virus Ebola, dont il existe à ce jour 4 sous-types: Zaïre, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Les filovirus ont été décrits pour la première fois en 1967 lors de 'mini-épidémies' de fièvre avec hémorragies survenues simultanément en Allemagne (Marburg et Francfort) et en Yougoslavie (Belgrade). Les malades étaient des personnels de laboratoire contaminés par des vervets (*Cercopithecus aethiops*) importés d'Ouganda. Trente et une personnes furent ainsi infectées (le filovirus incriminé sera ensuite appelé Marburg) avec une évolution fatale pour 7 d'entre elles (6). Le virus de Marburg est ensuite réapparu en 1975 en Afrique du Sud (7) et en 1980 au Kenya (8). Le virus Ebola (photo 1) a

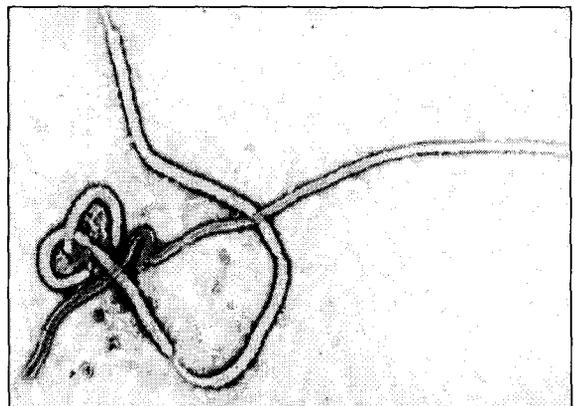


Photo 1. Le virus Ebola.

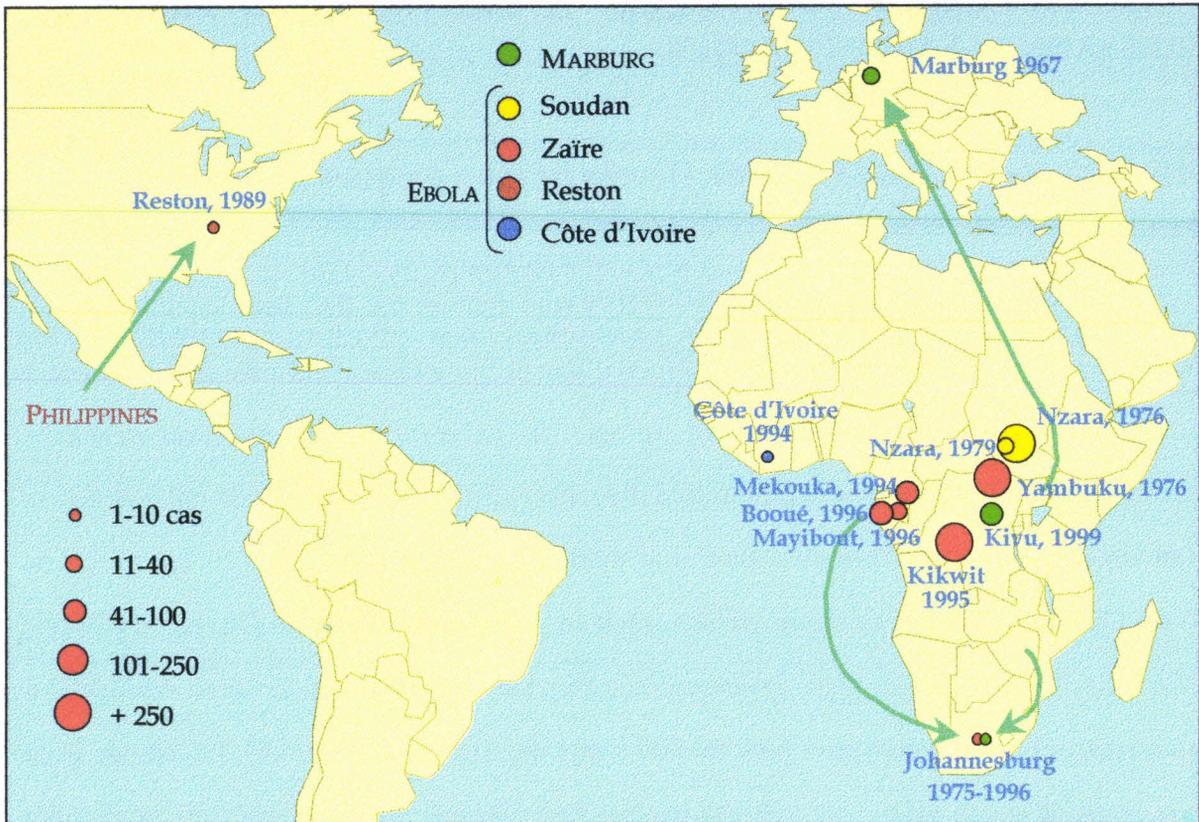


Figure 1. Les épidémies de fièvres hémorragiques à filovirus depuis leur première description en 1967

été décrit pour la première fois lors de 2 épidémies survenues en Afrique Centrale en 1976, l'une au Zaïre (aujourd'hui République Démocratique du Congo, RDC) dans la bourgade de Yambuku et dans quelques villages bordant la rivière Ebola (9, 10), l'autre au Soudan à quelques centaines de kilomètres à l'Est, dans la ville de Nzara (11) (figure 1). Ces deux épidémies, liées au virus Ebola sous-type Zaïre (Ebo-Z) pour Yambuku et sous-type Soudan (Ebo-S) pour Nzara, furent beaucoup plus meurtrières, puisque respectivement 88% des 318 et 53% des 284 personnes infectées ont succombé. Trois ans plus tard dans la même ville (Nzara), 34 personnes (mortalité 65%) seront à nouveau atteintes par le virus Ebo-S (12). En 1989, l'importation à Reston (Virginie, USA) de singes cynomolgus (provenant des Philippines) infectés par un nouveau sous-type de virus Ebola, le sous-type Reston (Ebo-R), est à l'origine de plusieurs séroconversions humaines et d'épidémies de FHV dans différents élevages de primates non-humains (PNH) aux Etats-Unis, puis en Italie en 1991 et encore aux USA (Texas) en 1996 (13, 14). Un 4^{ème} sous-type de virus Ebola, Ebola Côte d'Ivoire (Ebo-CI) a été isolé chez une éthologiste travaillant dans la forêt de Tai (Côte d'Ivoire) en 1994 et chez un réfugié Libérien en 1995 (15). Après un silence épidémiologique de près de 20 ans, le

virus Ebo-Z est réapparu à 3 reprises au Gabon (Mekouka, 1994, Mayibout, 1995 & Booué, 1996) ainsi qu'en RDC (Kikwit, 1995), où 461 personnes au total furent infectées avec une mortalité supérieure à 70% (16-18). Un patient contaminé durant l'épidémie de Booué (Gabon) a été à l'origine de l'introduction d'Ebo-Z en Afrique du Sud, en transmettant le virus à une infirmière lors de son hospitalisation à Johannesburg. Enfin, le virus de Marburg a probablement réémergé en 1999 dans le Kivu (RDC), mais très peu d'informations sont disponibles concernant cette épidémie.

Filovirus	Lieu	Année	Nbre de cas	Mortal %
<i>Marburg</i>	Marburg, Francfort & Belgrade	1967	31	22,6
	Zimbabwe & Afrique du Sud	1975	3	33,3
	Kenya	1980	1	0
	Kivu, RDC	1999	?	?
<i>Ebo-S</i>	Nzara, Soudan	1976	284	53
	Nzara, Soudan	1979	34	65
<i>Ebo-Z</i>	Yambuku, RDC	1976	318	88
	Tandala, RDC	1977	1	100
	Mekouka, Gabon	1994	49	59
	Kikwit, RDC	1995	316	81
	Mayibout, Gabon	1996	35	68
	Booué, Gabon	1996	60	75
<i>Ebo-R</i>	Reston, USA	1989	PNH	
	Italie	1991	PNH	
	Texas, USA	1996	PNH	
<i>Ebo-CI</i>	Forêt de Tai, Côte d'Ivoire	1994	1	0
	Côte d'Ivoire	1995	1	0

Tableau I. **Historique des épidémies de FHV à filovirus.** Le type de filovirus, le lieu de l'épidémie, l'année, le nombre de cas ainsi que la mortalité sont indiqués

2. Une gradation dans la pathogénicité en fonction des sous-types viraux.

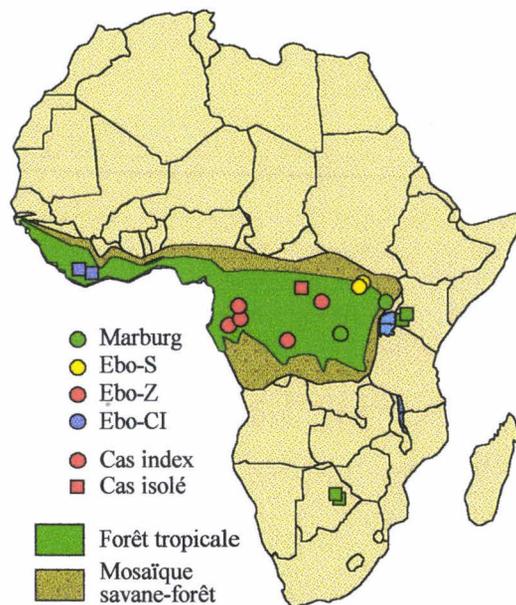
Bien que les filovirus induisent les FHV les plus sévères et s'illustrent par un tableau clinique similaire chez les PNH et l'homme, il existe une gradation dans la pathogénicité de ces différents virus. Les 4 uniques personnes infectées de façon documentée au contact de singes malades en 1989-90 à Reston (USA) sont demeurées asymptomatiques (19). Bien qu'Ebo-R induise une FHV sévère chez les PNH, la morbidité et la mortalité sont inférieures

à celles observées avec Ebo-Z ou Ebo-S (20). Les 2 seuls cas répertoriés de FHV liées à Ebo-CI ont survécu à l'épisode aigu (15), mais ce virus a néanmoins induit une pathologie sévère chez ces patients et est létal chez le chimpanzé (*Pan p. troglodytes*) (21). Avec une mortalité d'environ 25%, le virus de Marburg est d'une grande pathogénicité pour l'homme (6). Ebo-S, et particulièrement Ebo-Z, sont sans doute parmi les plus dangereux pathogènes connus de l'homme, plus de 60 et de 80%, respectivement, des patients succombant une semaine environ après l'apparition des symptômes (9, 11, 12, 18). Ainsi, il existe chez l'homme une gradation dans la pathogénicité en fonction des sous-types viraux.

3. Histoire naturelle des filovirus.

Les filovirus et leur écosystème.

L'étude des lieux de contamination probable des cas index des nombreuses épidémies de FHV à filovirus et de cas isolés confirmés – Ebo-Z a été isolé chez une personne décédée à Tandala (RDC) en 1977 (22), et quatre cas sporadiques d'infection humaine non-fatale par Marburg ont été décrits au Kenya et au Zimbabwe (8, 23) – permet d'avoir une idée précise du biotope dans lequel évolue les filovirus (figure 2). Ainsi, le virus de Marburg semble circuler dans des écosystèmes distincts comme la forêt tropicale humide (Kivu), la mosaïque savane-forêt (Ouganda et Kenya) et la savane sèche (Zimbabwe). En revanche, la transmission du virus Ebola est restreinte aux zones de forêt tropicale humide (RDC et Gabon pour Ebo-Z, Sud-Soudan pour Ebo-S, Côte d'Ivoire pour Ebo-CI, et Philippines pour Ebo-R) et survient le plus souvent pendant la saison des pluies (24).



Un réservoir naturel inconnu.

Le réservoir naturel des filovirus demeure à ce jour une énigme. Les divergences génétiques parfois importantes entre les sous-types de virus Ebola et particulièrement entre Ebola et Marburg suggèrent que ces virus pourraient être hébergés par des hôtes distincts. Parmi les candidats potentiels, on peut citer les arthropodes hématophages (moustiques, tiques) par analogie avec d'autres FHV comme la dengue, la fièvre jaune ou la fièvre de Crimée-Congo (25). Des échantillons d'arthropodes prélevés sur les lieux de contamination de certains patients n'ont cependant pas permis l'isolement d'un filovirus (26, 27), tandis que des infections expérimentales de moustiques (*Culex* et *Aedes*) et de tiques (*Ornithodoros*) par Ebo-R ont été tentées sans résultat (28). Certains mammifères comme les rongeurs pourraient également constituer un réservoir, mais aucun isolement viral n'a pu être obtenu à partir de nombreux mammifères capturés sur différents sites d'infection (26, 29-31). Des chauves-souris ont néanmoins été retrouvées à proximité du lieu de contamination de cas index d'infections par Marburg et Ebo-S (11, 24), et par ailleurs, l'infection expérimentale de chauves-souris frugivores et insectivores par le virus Ebola conduit à des virémies importantes pendant parfois plusieurs semaines sans mortalité (32), faisant des chiroptères un candidat possible de réservoir naturel pour les filovirus.

Enfin, l'historique des épidémies de FHV à virus Ebola en Afrique suggère une transmission cyclique de ce dernier, qui pourrait dépendre de variations climatiques ou d'une périodicité du réservoir. En effet, depuis la découverte du virus Ebola en 1976 à Yambuku (RDC), la plupart des épidémies, tant chez l'homme que chez les PNH, se sont déroulées sur 2 périodes très courtes, les années 1976-77 en RDC et au Sud-Soudan et 1994-96 au Gabon, en RDC et en Côte d'Ivoire.

Les primates non-humains, des intermédiaires entre le réservoir et l'homme.

Bien que trop sensibles aux infections par les filovirus pour constituer un réservoir viral, les PNH sont à l'origine de nombreuses épidémies humaines. Les épisodes de Marburg (1967) et de Reston (1989) résultent de l'importation de vervets et de macaques respectivement infectés par Marburg et Ebo-R. De même, l'infection d'une éthologiste par Ebo-CI en Côte d'Ivoire résulte de l'autopsie d'un chimpanzé infecté, tandis que l'épidémie

de Mayibout (Gabon, 1996) a pour cause la manipulation d'un chimpanzé trouvé mort. Les épisodes de Mekouka (1994) et Booué (1996) pourraient eux aussi être en relation avec l'infection de grands singes (16). Il semble d'ailleurs que les épidémies de FHV parmi les populations de grands singes soient relativement fréquentes (33, 34), et précèdent souvent la transmission du virus à l'homme (16). En dépit de l'intense activité humaine en forêt tropicale, la transmission à l'homme des filovirus est tout de même assez rare. Il semble donc que le contact avec le réservoir soit difficile (ou que la transmission du virus du réservoir à l'homme soit peu efficace) et que les PNH jouent un rôle important d'hôte intermédiaire dans l'histoire naturelle des filovirus.

La transmission des filovirus.

Bien que les filovirus soient des pathogènes extrêmement contagieux, leur transmission nécessite des contacts étroits avec le sujet (ou l'animal) infecté. Il est probable que les PNH se contaminent au contact du réservoir (manipulation de cadavres, ingestion de petits mammifères infectés) ou de ses excréta. De plus, les filovirus gardent plusieurs jours leur infectivité en dehors de l'organisme (35). Par la suite, la transmission entre PNH s'opère par contact entre individus. L'infection de l'homme à partir du réservoir naturel, pourtant à l'origine de certaines épidémies (Soudan, 1976 & 79 (24), Kikwit, 1995 (18)), n'a jamais pu être décrite, le cas index étant le plus souvent déjà mort lors des enquêtes épidémiologiques. Par contre, la contamination de personnes à partir de PNH résulte de contacts avec le sang ou les tissus de l'animal lors d'autopsies ou d'expérimentation animale (Reston, Côte d'Ivoire) (15) ou bien, comme cela a été observé lors de l'épidémie de Mayibout (Gabon, 1996), du dépeçage et de la préparation culinaire d'un chimpanzé trouvé mort (16).

La contamination inter-humaine nécessite elle aussi un contact entre les muqueuses ou même la peau d'un individu sain et les fluides biologiques – sang, vomissures, urines, salive, larme, sperme ou sueur – d'une personne infectée et en phase symptomatique. La transmission expérimentale d'Ebola par aérosol a été obtenue – en utilisant cependant des doses très élevées – chez le singe rhésus (36, 37) et semble être survenue chez des singes rhésus témoins se trouvant dans la même animalerie que ceux infectés par Ebo-Z (38). Cependant, il a été démontré à plusieurs reprises que cette voie de contamination n'était pas

impliquée dans la transmission virale lors des épidémies, toutes les infections documentées relevant d'un contact direct avec un malade et les personnes vivant à proximité de patients sans avoir de contact n'étant pas infectées (39).

La transmission nosocomiale a joué un rôle amplificateur dans plusieurs épidémies, telles Yambuku (RDC, 1976), où la ré-utilisation de seringues et d'aiguilles est à l'origine de la plupart des cas (9), et Kikwit (RDC, 1995), où plusieurs personnels de santé se sont contaminés en donnant des soins (projections de gouttelettes de sang, interventions chirurgicales, contacts avec des malades) et l'épidémie s'est répandue de manière dramatique dans l'hôpital (18, 40). Par ailleurs, le mode de transmission des filovirus favorise la contamination familiale et de proche en proche comme cela a pu être observé dès 1976 à Nzara (Soudan), où 3 cas index ont entraîné l'infection de 47 parents et proches occupés à leurs soins (11). De même à Yambuku, après la fermeture de l'hôpital, 110 cas secondaires liés à des soins et à des rites funéraires ont été enregistrés (9). Enfin, à Kikwit (RDC, 1995), de nombreux parents de malades ayant eu des contacts dans la vie quotidienne, lors de soins ou de rites funéraires ont été contaminés (39) ; ainsi qu'à Mayibout et Booué, (Gabon, 1996), où le virus s'est répandu de la même manière (16).

4. Le diagnostic des infections filovirales.

Des prélèvements biologiques à hauts risques.

Les patients atteints de FHV sont extrêmement contagieux et un certain nombre de précautions comme le port de gants, d'un masque respiratoire, de bottes, d'une combinaison et de lunettes de protection, doivent impérativement être prises avant tout soin ou prélèvement sanguin à un malade. En effet, bien que la transmission inter-humaine par aérosol ne soit pas décrite, la projection de micro-gouttes de sang (les FHV induisent parfois des saignements spontanés aux points de piqûres) et même de vomissures représentent par contre un grand risque infectieux.

De plus, les filovirus, présents en grande quantité dans le sang et les tissus, gardent leur infectivité en dehors de l'organisme plusieurs jours à 20°C (35) et résistent à deux cycles de congélation-décongélation. Ils sont néanmoins détruits par la chaleur (60°C, 1h), les ultra-

violet, les rayons gamma (1 million Rad), les solvants des lipides, les fixateurs (formaldéhyde, β -propiolactone), les désinfectants à base de phénol et l'eau de Javel (41-43). Ainsi, tant que les prélèvements biologiques ne sont pas inactivés par l'une ou l'autre de ces méthodes, ils possèdent un grand pouvoir infectieux et doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique de niveau maximal (BSL-4).

Un tableau clinique peu spécifique.

Bien que les FHV à filovirus induisent à des stades avancés certains symptômes très caractéristiques et évocateurs comme les signes hémorragiques, le diagnostic clinique de ces FHV est délicat sur le terrain. En effet, les symptômes caractérisant les premiers jours de la maladie – fièvre, vomissements, diarrhées, douleurs – sont peu spécifiques et communs à d'autres pathologies plus fréquentes comme le paludisme, les pathologies gastro-intestinales et certaines infections bactériennes. De plus, le syndrome hémorragique caractéristique des FHV à filovirus peut également être attribué à d'autres FHV possédant des zones d'endémies voisines comme les fièvres de Lassa, de Crimée-Congo, de la Vallée du Rift et la fièvre jaune ou même à des dysenteries microbiennes comme les amibiases, les shigelloses et salmonelloses (44). Le diagnostic clinique est cependant très utile dans le cadre du contrôle des épidémies lorsque l'agent étiologique est déjà connu.

L'isolement viral.

Ces manipulations doivent être effectuées dans un BSL-4 en raison du grand risque infectieux résultant de la culture virale. C'est la méthode de référence pour identifier avec certitude un filovirus et surtout caractériser le sous-type impliqué. Elle consiste à inoculer des produits biologiques (sérums de la phase aiguë, tissus prélevés *post-mortem*) provenant d'un malade suspect de FHV sur cultures de cellules Véro E6, avec 'passages aveugles' systématiques sur de nouvelles cultures si la réplication virale n'est pas détectée lors de la première inoculation (45). Les cellules MA 104 sont quant à elles plus appropriées pour l'isolement d'Ebo-R et de la plupart des virus de FHV simienne (13). Dans un délai variable de 2 à 5-6 jours apparaissent des effets cytopathogènes (ballonnets, lyse cellulaire) caractéristiques de la réplication virale. Des 'passages aveugles' sur des cobayes avant

l'inoculation des cellules peuvent permettre de résoudre les problèmes de contamination des prélèvements biologiques. L'identification du virus isolé repose sur l'utilisation d'anti-sérums de référence et de l'immunofluorescence (46).

La détection des filovirus sur des coupes de tissus.

Les filovirus peuvent être détectés par des techniques immuno-enzymatiques sur des coupes de tissus (peau, foie, rate) fixées et incluses en paraffine (photo 2) (47). Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter de BSL-4 (le virus étant inactivé par la fixation des coupes) et est utilisée pour les diagnostics différés et *post-mortem* chez les PNH ou l'homme (21, 48).

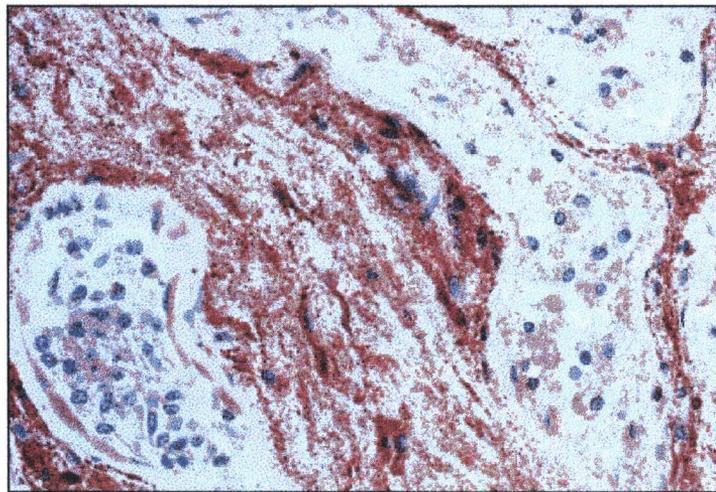


Photo 2. Distribution des Ag Ebo-Z dans une biopsie de peau (tissu conjonctif et glandes sudoripares). D'après S.R. Zaki *et al*, réf 48

La détection des antigènes circulants.

Cette technique, relativement récente, consiste à quantifier les antigènes (Ag) viraux circulants dans le sérum des patients à l'aide d'un test immuno-enzymatique (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) de type sandwich (47, 49). Elle est également applicable chez les PNH et des anti-sérums spécifiques sont disponibles pour Ebo-Z, Ebo-S et Ebo-R. Après inactivation du sérum par chauffage à 60°C pendant 1 h, le test peut être réalisé sans risque infectieux et est applicable sur le terrain sans équipement particulier. Cependant, les Ag circulants étant détectables dans le sang uniquement pendant la phase symptomatique de la

maladie (49), cette méthode ne permet pas le dépistage des patients en période d'incubation ni le diagnostic rétrospectif chez les survivants.

La détection de l'ARN viral dans le sang par RT-PCR.

Cette technique très sensible, déjà validée pour le diagnostic de la fièvre de Lassa et de West Nile (50-52) nécessite un laboratoire, un minimum d'équipement et une grande vigilance par rapport aux contaminations induisant des résultats faussement positifs. Cet outil – pas encore validé comme outil de diagnostic – possède néanmoins plusieurs avantages comme la rapidité et la facilité de mise en œuvre, le faible coût, l'absence d'utilisation de réactifs 'spécifiques', et surtout la possibilité, avec quelques couples d'amorces, de dépister un grand nombre de FHV différentes en très peu de temps. La RT-PCR permet également la caractérisation du virus identifié par séquençage des fragments amplifiés (53). Cette technique a été mise en œuvre lors de l'épidémie de Kikwit, (RDC, 1995) (54), et sa grande sensibilité comparativement à l'isolement viral ou la détection d'Ag permet l'amplification d'ARN d'Ebo-Z dans le sperme de survivants 3 mois après l'apparition des symptômes (55), mais il ne semble pas que la persistance virale soit aussi longue dans le sang de PNH infectés par Ebo-Z et Ebo-R (56). Il est également probable que cette méthode permette la détection du virus dès la phase d'incubation.

Le diagnostic sérologique.

L'immunofluorescence sur lames.

Elle consiste à incuber le sérum à tester sur des lames sur lesquelles sont fixées des cellules infectées par le virus, inactivé par rayonnement gamma, les anticorps (Ac) étant ensuite révélés par immunofluorescence. Très souvent, les lames utilisées comportent différents types de cellules infectées (Ebo-Z, Ebo-S, Congo-Crimée, Rift Valley, Lassa, Marburg) (57, 58). Cette technique était très utilisée pour le diagnostic et les études de séroprévalence des filovirus il y a une vingtaine d'année (59, 60), mais le nombre élevé de résultats faussement positifs a conduit à une surestimation des prévalences et rend ces résultats difficilement exploitables (61).

La détection des IgM et IgG.

D'autres tests sérologiques spécifiques des différents filovirus – ELISA, Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA), western blots – ont été décrits (62-64). Malheureusement, ces techniques n'ont pas été validées sur le terrain, et, en dépit de la grande spécificité du RIPA et du Western blot, elles sont difficilement applicables dans un contexte épidémique, et particulièrement onéreuses. Une publication récente a décrit l'utilisation d'Ag recombinants d'Ebo-Z (nucléoprotéine et glycoprotéine) pour la détection des IgM spécifiques, ce qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de production d'Ag par culture virale (65).

Récemment, des tests ELISA permettant la détection des IgM et IgG spécifiques d'Ebo-R, Ebo-S et Ebo-Z ont été décrits et validés à partir de prélèvements provenant de Reston (USA, 1989) (66) et Kikwit (RDC, 1995) (49). La détection des IgM spécifiques se fait par immuno-capture en fixant des Ac anti-IgM au fond d'une plaque de micro-titration, puis en incubant le sérum à tester suivi d'Ag du sous-type viral recherché. La fixation de l'Ag est ensuite révélée à l'aide d'un sérum de lapin anti-Ebola. Les IgG spécifiques sont détectées en incubant le sérum sur des Ag viraux fixés au fond d'une plaque de micro-titration, puis sont révélées avec des Ac anti-IgG humaines couplés à une enzyme. L'avantage de ces techniques est de pouvoir utiliser des sérums inactivés par la chaleur, et de ne pas nécessiter d'équipement particulier de laboratoire. Cependant, les Ac IgM et IgG ne sont détectés que tardivement après l'infection et uniquement chez certains patients, ce qui limite l'utilisation de ces tests pour l'établissement d'un diagnostic en période aiguë de la maladie. Par contre, la persistance des IgG spécifiques – les IgM spécifiques n'étant plus détectées 3 mois après les symptômes – permet un diagnostic rétrospectif jusqu'à 2 ans après la maladie (49).

5. Une absence de traitement et de prophylaxie, un contrôle difficile des épidémies.

Des traitements symptomatiques.

Aucun traitement ni prophylaxie ne sont actuellement disponibles contre les infections filovirales. L'efficacité thérapeutique et même prophylactique d'un inhibiteur de synthèse

nucléique, la ribavirine (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) a été démontrée chez l'homme contre plusieurs FHV comme la fièvre de Lassa, de Crimée-Congo, de la Vallée du Rift, et les FHV à syndrome rénal (hantavirus) (67-69). Cette molécule ne semble cependant pas efficace contre les filovirus, puisqu'elle n'inhibe pas la réplication du virus Ebola et n'a aucun effet chez la souris ou le singe cynomolgus infectés par Ebo-Z ou Ebo-S (70-72).

Les traitements prescrits aux patients hospitalisés atteints de FHV à filovirus sont donc strictement symptomatiques. Lors de l'épidémie de Kikwit (RDC, 1995), les patients recevaient par voie orale du paracétamol (douleurs et fièvre), du métoclopramide et de l'halopéridol (nausées, vomissements et hoquet), des diazépames (agitation et convulsions), ainsi qu'une large couverture antibiotique (ciprofloxacine, chloramphénicol, cotrimoxazole, tétracyclines et acide nalidixique), et dans quelques cas, des perfusions de ringer-lactate (73). Il en est de même pour l'épidémie de Booué (Gabon, 1996), où les patients ont reçu du paracétamol, du nifuroxazide, de l'ampicilline, et parfois des perfusions de ringer-lactate et même de sang total en cas d'hémorragies sévères (B. Pambo, communication personnelle). Lorsque des patients sont atteints de FHV dans des pays à haut niveau de développement, l'hospitalisation dans un service de réanimation intensive peut augmenter les chances de survie (74).

L'isolement des patients, seul moyen de contrôle des épidémies.

Le seul moyen de limiter l'extension des épidémies est donc d'empêcher la contamination de nouvelles personnes afin que l'épidémie s'arrête d'elle-même. Les patients sont ainsi isolés et les contacts directs avec le personnel soignant et la famille proscrits. De même, la surveillance des personnes ayant été en contact avec des malades est essentielle. Lors de l'épidémie de Kikwit (RDC, 1995), les patients ont été isolés dans un pavillon de l'hôpital en compagnie d'un médecin et de 3 infirmières (l'une d'elle sera contaminée et décèdera, les équipements de protection n'étant pas encore disponibles à ce moment). Par la suite, des bottes, combinaisons, gants, masques respiratoires et lunettes ont été fournis au personnel soignant, empêchant ainsi les contacts directs avec les malades. Les corps des malades décédés étaient désinfectés à l'eau de javel, mis dans des sacs mortuaires et inhumés

par des volontaires de la Croix-Rouge afin d'éviter la transmission lors des cérémonies funéraires (75). Des mesures similaires ont été mises en œuvre avec un égal succès lors des épidémies Gabonaises (16).

Des difficultés liées à l'enclavement des zones touchées.

Bien que ces mesures d'isolement soient d'une grande efficacité et assez rapides à mettre en œuvre, l'enclavement géographique et les structures médicales modestement équipées des zones généralement frappées par les FHV a souvent pour conséquence un très long délai (parfois plusieurs mois) entre la survenue de la maladie chez le cas index et la mise en place des procédures d'isolement et le diagnostic de la maladie, période pendant laquelle l'épidémie s'étend de manière dramatique. Ainsi, à Kikwit (RDC, 1995), l'épidémie s'est propagée à partir d'un malade pendant près d'un mois – dans un hôpital où il n'y avait ni eau, ni électricité, ni sanitaires – avant que les mesures d'isolement ne soient prises et que le matériel de protection soit disponible (73, 75). Il peut aussi arriver qu'une épidémie frappe un village n'ayant pas accès à des structures sanitaires, comme à Mekouka et Mayibout (Gabon, 1994 & 1996), où l'enclavement des villages touchés (7 et 6 h, respectivement, par le fleuve de la ville la plus proche) a permis la contamination d'une deuxième vague de patients avant que les autorités ne puissent intervenir (16).

6. Les filovirus, un risque majeur pour l'avenir.

Les FHV à filovirus sont donc, à l'instar des autres FHV, des problèmes majeurs de santé publique. Bien que les épidémies aient été jusqu'à présent sporadiques et localisées, il est clair que les activités économiques croissantes s'effectuant dans les régions de circulation des filovirus (exploitation forestière, ouverture de routes) risquent de maintenir sinon d'augmenter la fréquence des rencontres de l'homme avec le réservoir naturel ou un PNH contaminé par un filovirus. De plus, la mobilité croissante des personnes à l'intérieur et entre les pays favorisera de plus en plus l'apparition de foyers secondaires, comme cela a déjà été observé lors de l'épidémie de Booué (Gabon, 1996), où la fuite de plusieurs patients de l'hôpital de Booué a été à l'origine de l'apparition de foyers secondaires dans plusieurs villes

comme Libreville, la capitale Gabonaise (10 cas hospitalisés) et même Johannesburg (Afrique du Sud) (16). Ainsi, les FHV à filovirus représentent un risque majeur qu'il convient, en attendant qu'une prophylaxie ou un traitement ne soit disponible, de prévenir par une surveillance épidémiologique accrue des FHV dans les zones touchées, ce qui passe par la mise en place d'un réseau de 'sentinelles' dans les zones à risque afin de détecter rapidement les cas sporadiques d'infection filovirale (76), la formation des personnels de santé en matière de lutte contre les FHV, et enfin l'émergence de structures adaptées à la manipulation de ces pathogènes dans les pays où sévissent les FHV à filovirus (77).

II. LES FILOVIRUS.

1. Morphologie et structure des filovirus.

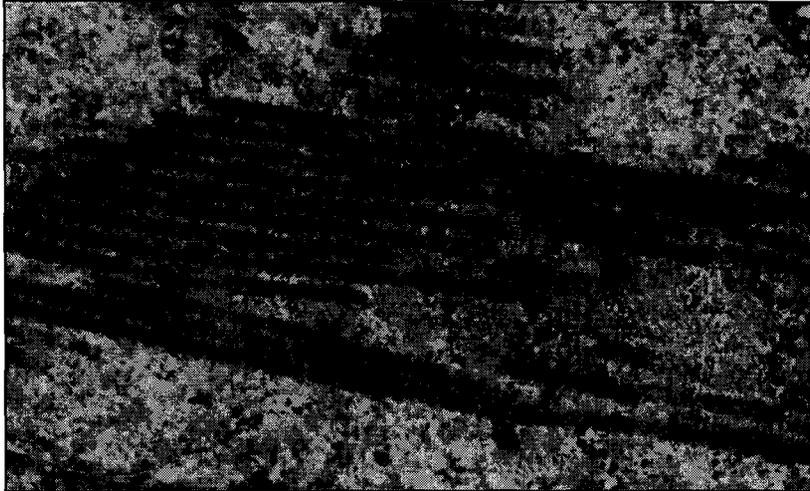


Photo 3. Coupe longitudinale de virions Ebo-Z dans une cellule (Photo : E.I. Ryabchikova)

Les premières observations morphologiques réalisées sur le virus de Marburg, premier filovirus découvert, avait conduit à le placer dans la famille des *Rhabdoviridae* (dont fait partie le virus rabique), mais des études physico-chimiques et morphologiques plus poussées des virus Marburg et Ebola ont mis en évidence leur nature unique, conduisant à créer une nouvelle famille dans l'ordre des Mononégavirales, les *Filoviridae*. La particularité de ces virus provient de leur morphologie filamenteuse très caractéristique les différenciant des autres Mononégavirales (photo 3) (78).

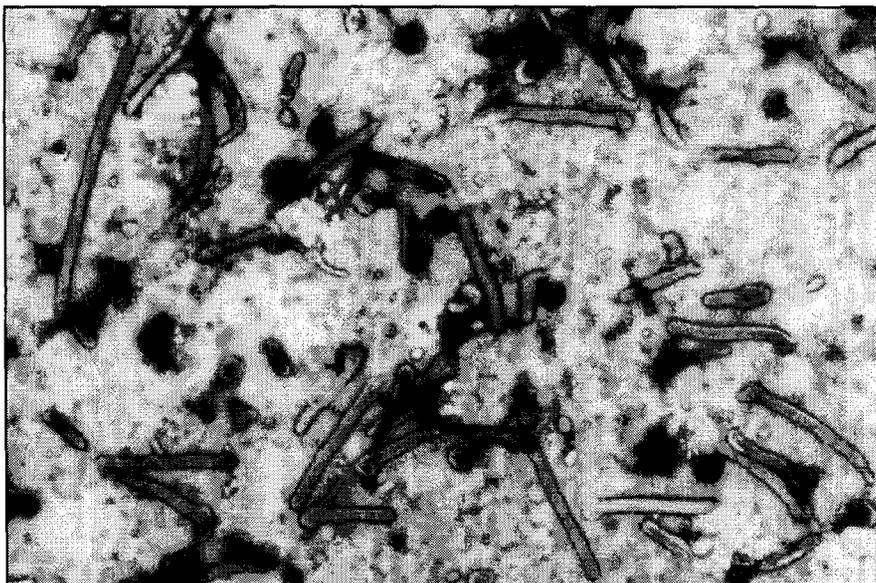


Photo 4. Polymorphisme du virus Ebo-Z (Photo: E.I. Ryabchikova)

Le virus Ebola est très polymorphe : si son diamètre est uniforme (80 nm environ), sa longueur est en revanche variable (photo 4). Il peut ainsi se présenter sous forme de long filament, ou sous des formes plus courtes, quelquefois branchées, réalisant différentes figures ('6', '8', 'U', cercle) (photo 5). Les filaments peuvent atteindre 10 à 15 µm, mais la fraction associée au pic d'infectivité se situe autour

de 1 µm (790 nm pour Marburg) (79). La nucléocapside présente un diamètre d'environ 50 nm et une symétrie hélicoïdale de périodicité de 5 nm avec un espace vide axial d'environ 20 nm de diamètre. Elle est composée de 4 protéines :

la nucléoprotéine (NP, 100-110 kDa), les

protéines de structure de virion (VP) de 30 (VP30) et 35 kDa (VP35) et la protéine L (ARN polymérase-ARN dépendante, 260 kDa) (80-81). Elle contient la molécule d'ARN linéaire d'un poids de 4.0×10^6 Da représentant 1% de la masse virale totale (79, 82-84).

L'enveloppe virale, qui provient en partie de la membrane des cellules infectées, contient 2 protéines, la VP24 (24 kDa) et la VP40 (40 kDa), et une glycoprotéine (GP, 120-150 kDa) transmembranaire, dont l'oligomérisation est à l'origine de la formation de spicules, d'environ 7 nm de diamètre et espacés d'environ 5 à 10 nm, à la surface (photo 6) (71, 85).



Photo 5. Vue d'un virion d'Ebo-Z en forme de '6' (Photo: E.I. Ryabchikova)

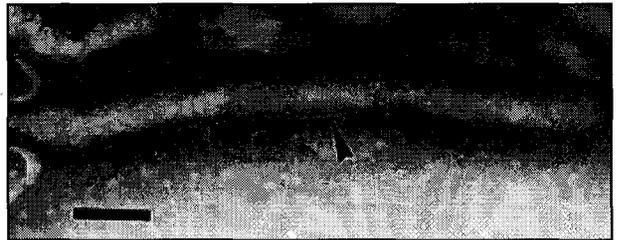


Photo 6. Spicules disposés le long d'un virion Ebo-Z. La flèche indique un des spicules. la barre indique 170 nm. D'après V.E. Volchkov *et al*, réf 109

2. Phylogénie des filovirus.

L'analyse du génome des différentes souches de filovirus isolées depuis leur apparition a mis en évidence les homologues existant, au niveau des nucléotides (environ 45% pour la GP, la VP35 et la protéine L) mais aussi des acides aminés (environ 35%), entre le virus Ebola et le virus de Marburg, justifiant la création d'une nouvelle famille parmi les

Mononégavirales (86-89). Cependant, les filovirus présentent certaines homologies avec d'autres Mononégavirales comme les paramyxovirus et, à un moindre degré, les rhabdovirus (89-91).

La comparaison des différents isolats de virus de Marburg (Ouganda, 1967, 'POP' et 'RYC'; Zimbabwe, 1975, 'OZO'; Kenya, 1980, 'MUS' et 1987, 'RAV') ne permet pas de séparer ces virus en différents sous-types, bien que cela soit controversé (92) (figure 3). En effet, l'isolat le plus éloigné des autres, 'RAV', ne diverge au niveau de la GP et de la VP35 que de 20~22% au niveau des nucléotides et de 6 et 22~23%, respectivement, pour les acides aminés; tandis que les autres isolats ne divergent que de 6~9% pour ces 2 gènes au niveau des nucléotides et des acides aminés (88).

Parmi les souches de virus Ebola, 4 sous-types se distinguent par une divergence du gène de la GP de 37 à 41% et de 34 à 43 %, respectivement au niveau des nucléotides et des acides aminés (figure 4) (87). Les relations phylogénétiques très étroites entre les souches africaines et la souche asiatique (Ebo-R) suggèrent que cette dernière pourrait avoir été introduite en Asie à partir de l'Afrique.

3. Stabilité génétique des filovirus:

Les virus à ARN sont connus pour évoluer très rapidement, à cause du taux important d'erreurs commises par la polymérase durant la réplication (93). Cependant, si les divergences génétiques sont relativement importantes entre les différents sous-types de virus Ebola, l'analyse des différentes souches isolées au cours des épidémies indique au contraire une impressionnante stabilité de ce virus. Ainsi, la comparaison des séquences nucléotidiques du

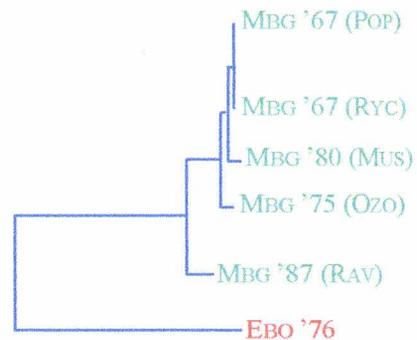


Figure 3. **Phylogénie des virus de Marburg**, basée sur la région codante de la GP. D'après A. Sanchez *et al*, réf 88

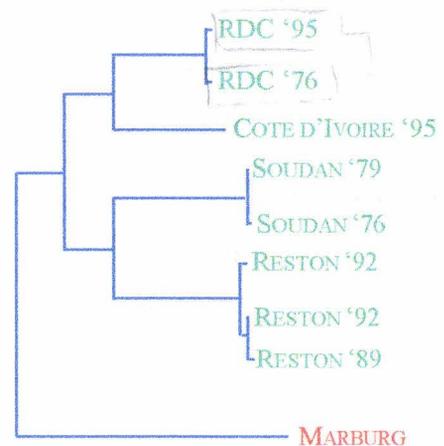


Figure 4. **Phylogénie des virus Ebola**, basée sur 2 régions conservées de la GP (C-term. & N-term.). D'après A. Sanchez *et al*, réf 87

gène de la GP des souches d'Ebo-Z isolées en RDC à près de 20 ans d'intervalle et à plus de 1000 kms de distance montre une homologie de 98,4% (87), les quelques mutations étant localisées dans la région variable (hydrophile) contenant les sites de glycosylation. La localisation des mutations ne semble pas aléatoire et ces dernières conduisent le plus souvent à un changement dans la séquence protéique primaire. Cette variabilité semble provenir d'une pression de sélection qui pourrait être liée à la réponse immune de l'hôte ou à un changement de conformation du récepteur, cette région de la GP représentant la partie extra-membranaire de la protéine. Des résultats similaires ont été obtenus entre les souches d'Ebo-R isolées en 1989 et 1996 aux Etats-Unis. La GP est encore plus conservée, puisqu'aucune des quelques mutations retrouvées dans le gène de la GP des 2 souches d'Ebo-Z ne conduit à un changement d'acide aminé, et seulement 2 substitutions d'acides aminés ont été détectées entre les isolats d'Ebo-R (54). Tandis que les divergences notables existant entre les différents sous-types de virus Ebola, mais aussi entre les virus Ebola et Marburg, suggèrent que ces virus sont très anciens ; l'extrême stabilité génétique des virus Ebola au cours du temps implique un équilibre stable avec le réservoir qui de surcroît semble assez répandu en Afrique Centrale.

La stabilité génétique du virus Ebola durant les épidémies est également très grande. Ainsi, aucune modification du virus Ebo-R n'a pu être décelée durant 3 mois de circulation virale lors de l'épidémie de 1996 (54). De même, au cours de l'épidémie de Kikwit (RDC, 1995), aucune variation génétique n'a été mise en évidence dans la région variable de la GP d'Ebo-Z après de multiples passages chez des patients décédés ou survivants, ni au cours d'une période de 3 mois chez un même patient (94). Cette absence totale de modification d'une région pourtant variable au cours des épidémies rend peu probable l'atténuation de la pathogénicité au cours du temps et des passages, à l'exception bien sûr de mutations d'autres gènes.

4. Le génome filoviral.

Le génome du virus Ebola (ainsi que Marburg) est constitué d'un ARN non segmenté, linéaire, simple brin, à polarité négative (ce qui le place dans l'ordre des Mononégavirales,

comprenant les *Rhabdoviridae*, les *Paramyxoviridae* et les *Filoviridae* (95)), d'une longueur de 19100 bases (figure 5) (83). La molécule d'ARN contient 7 gènes alignés dans l'ordre

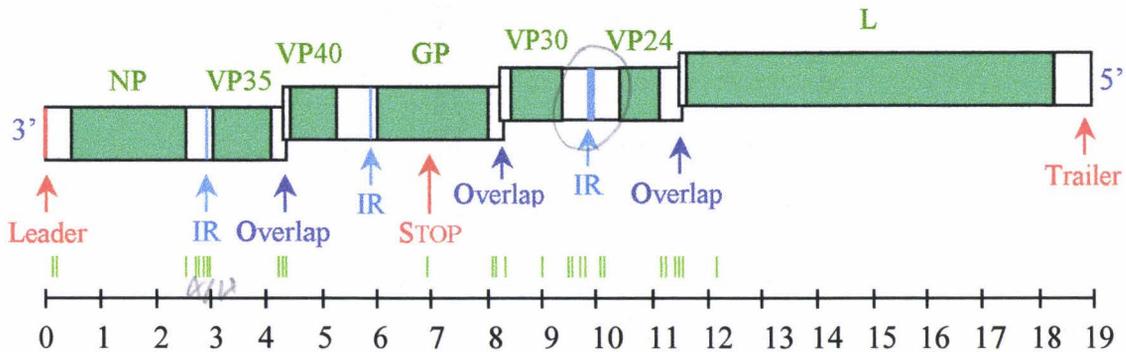


Figure 5. **Organisation du génome du virus Ebola.** Les rectangles verts représentent les parties codantes des gènes, tandis que les zones blanches figurent les parties non-codantes. Les régions intergéniques (IR) et chevauchante (Overlap) sont représentées. L'échelle représente la taille du génome, graduée en milliers de bases. Les zones riches en A/U sont figurées par un trait vert. D'après A. Sanchez *et al*, réf 86

suivant : 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'. Des séquences conservées servent de signaux de transcription, comme pour les autres virus à ARN négatif non segmenté, et se trouvent dans les séquences non-codantes flanquant les gènes, à l'exception d'un site d'arrêt situé au milieu de la partie codante de la GP. Les sites de départ et d'arrêt (site de polyadénylation) de transcription présentent la séquence consensus suivante (86) :



Les bases vertes ne figurent pas dans les gènes L et GP. La séquence soulignée se trouve dans tous les sites.

Une alternance de régions intergéniques et de courtes régions chevauchantes séparent les différents gènes le long du génome du virus Ebola. Le génome du virus de Marburg diffère par l'absence de région chevauchante, à l'exception d'une région située entre la VP30 et la VP24 n'existant pas dans le génome du virus Ebola (86). Ces régions présentent souvent des zones riches en A/U, bien qu'on trouve aussi 5 de ces zones dans les parties codantes. Les régions inter-géniques ont une longueur de 3 bases, à l'exception d'une région de 142 bases séparant la VP30 et la VP24. Les régions chevauchantes sont limitées aux séquences des sites de départ et d'arrêt des gènes concernés, et sont centrées autour de la séquence consensus 3'-UAAUU (86).

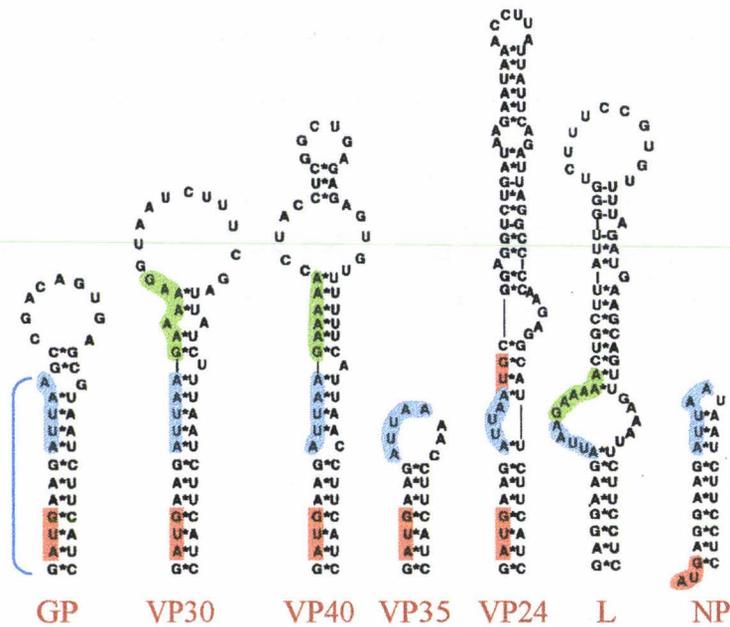


Figure 6. **Structure secondaire des ARNm d'Ebo-Z.** Structure en 'épi­ngle à cheveux' des extrémités 5' des ARN '+'. Le site consensus de transcription est surligné en bleu. Le site de départ de transcription est indiqué à gauche (parenthèse bleue). Si le site sert de stop pour le gène en amont, la fin du stop est surlignée en vert. Les codons AUG putatifs (différents de ceux utilisés pour la traduction) sont surlignés en rouge D'après A. Sanchez *et al*, réf 86

Les ARNm du virus Ebola (et de Marburg (96)) ont la particularité de former des structures secondaires en 'épi­ngle à cheveux' à leur extrémité 5' (figure 6). Ces structures influencent probablement l'expression des gènes en modifiant la stabilité des ARNm et la fixation sur les ribosomes. Ces 'épi­gles' d'ARN contiennent toutes le site de départ de transcription et, dans le cas de chevauchements de gènes, également le site de polyadénylation du gène en amont. On ne connaît pas encore la fonction de ces chevauchements, mais il est possible que cela affecte la transcription du gène en aval. Il est intéressant de noter qu'un – voire 2 – codon AUG sont présents dans cette structure. Cependant, seul celui contenu dans l' 'épi­ngle' de la GP peut potentiellement initier la traduction, car il est en phase avec le cadre de lecture (86).

5. Réplication virale et synthèse des protéines.

Le complexe ribonucléoprotéique.

Contrairement à la plupart des autres Mononégavirales, le virus Ebola (ainsi que Marburg) possède 4 protéines de nucléocapside, au lieu de 3, la NP, la VP35, la VP30 et la

protéine L (polymérase) (80). Le complexe ribonucléoprotéique, responsable de la transcription des gènes et de la réplication virale est formé de l'ARN négatif encapsidé par la NP et associé à la VP35, la VP30 et la protéine L (80). La VP35, qui représente l'équivalent de la protéine P des Mononégavirales, n'est que peu phosphorylée (80) et se complexe à la protéine L pour former la polymérase fonctionnelle (97, 98). Des interactions entre la NP et la VP35 existent également. La VP35 empêcherait l'agrégation de la NP permettant à celle-ci de se fixer sur les chaînes d'ARN naissantes lors de la réplication (99). Toutefois, les agrégats de NP seraient nécessaires à l'extension de l'encapsidation et interagissent avec le complexe VP35-L (polymérase active), permettant à la polymérase de se fixer au génome encapsidé (98). La VP30, très phosphorylée (80), ne semble pas importante dans la réplication du virus Ebola, mais est par contre indispensable à la transcription des ARNm (100), à la différence du virus de Marburg (101). La VP30, qui peut s'associer à la NP (98), pourrait avoir un rôle positif dans l'initiation de la transcription et être un facteur d'élongation et/ou de stabilisation des ARNm (100).

Les régions 'leader' et 'trailer' du génome semblent très importantes dans la réplication virale. Elles présentent des séquences complémentaires l'une de l'autre et forment chacune des structures secondaires en 'épingle à cheveux' qui semblent avoir un rôle dans la réplication du génome (89).

Les protéines associées à la membrane, la VP24 et la VP40.

Associée à la membrane virale, la VP24 est très hydrophobe (80, 86). Son rôle est encore mal connu, mais elle pourrait être impliquée dans la décapsidation. Il semble que la VP40 soit une protéine de matrice, son profil hydrophobique étant analogue aux protéines M des paramyxovirus (102). Elle pourrait être impliquée dans le bourgeonnement viral.

La glycoprotéine membranaire et les glycoprotéines solubles (GPs).

La GP intramembranaire est la seule protéine de surface des filovirus. Elle est responsable de la fixation sur le récepteur cellulaire, et de la fusion membranaire permettant l'entrée du virus dans la cellule (103). C'est une protéine transmembranaire de type I, contenant des carbohydrates liés à des N et à des O contribuant pour plus d'un tiers de la

masse de la molécule (104, 105). La région hydrophile de la GP où se situent les sites de glycosylation est très variable entre les souches virales, tandis que les extrémités N- et C-term. sont relativement conservées. Il est intéressant de noter que contrairement au virus Ebola, la GP du virus de Marburg ne présente pas d'acides sialiques terminaux (104). La fonction de ces nombreuses glycosylations n'est pas précisément connue, mais comme pour les autres glycoprotéines virales, l'addition de chaînes de carbohydrates est sans doute importante pour la structure protéique et la reconnaissance du récepteur sur la cellule cible (106), pour l'antigénicité du virion et pourraient protéger la protéine de la dégradation (104). L'oligomérisation de la GP sous forme d'homo trimères d'environ 450 kDa est à l'origine de la formation des spicules à la surface de la membrane (107, 108).

Cependant, seulement 20% des ARNm transcrits à partir du gène de la GP du virus Ebola codent pour la GP membranaire. En effet, l'arrêt occasionné par le site atypique de polyadénylation conduit à la synthèse d'un ARNm plus court codant pour la GPs, portant en commun avec la GP 295 acides aminés dans la partie N terminale mais différant de 69 acides aminés sur la partie C-terminale (figure 7). La GP membranaire a la particularité d'être codée

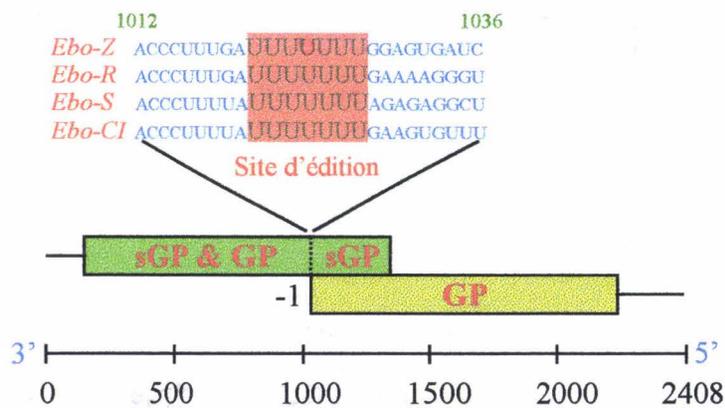
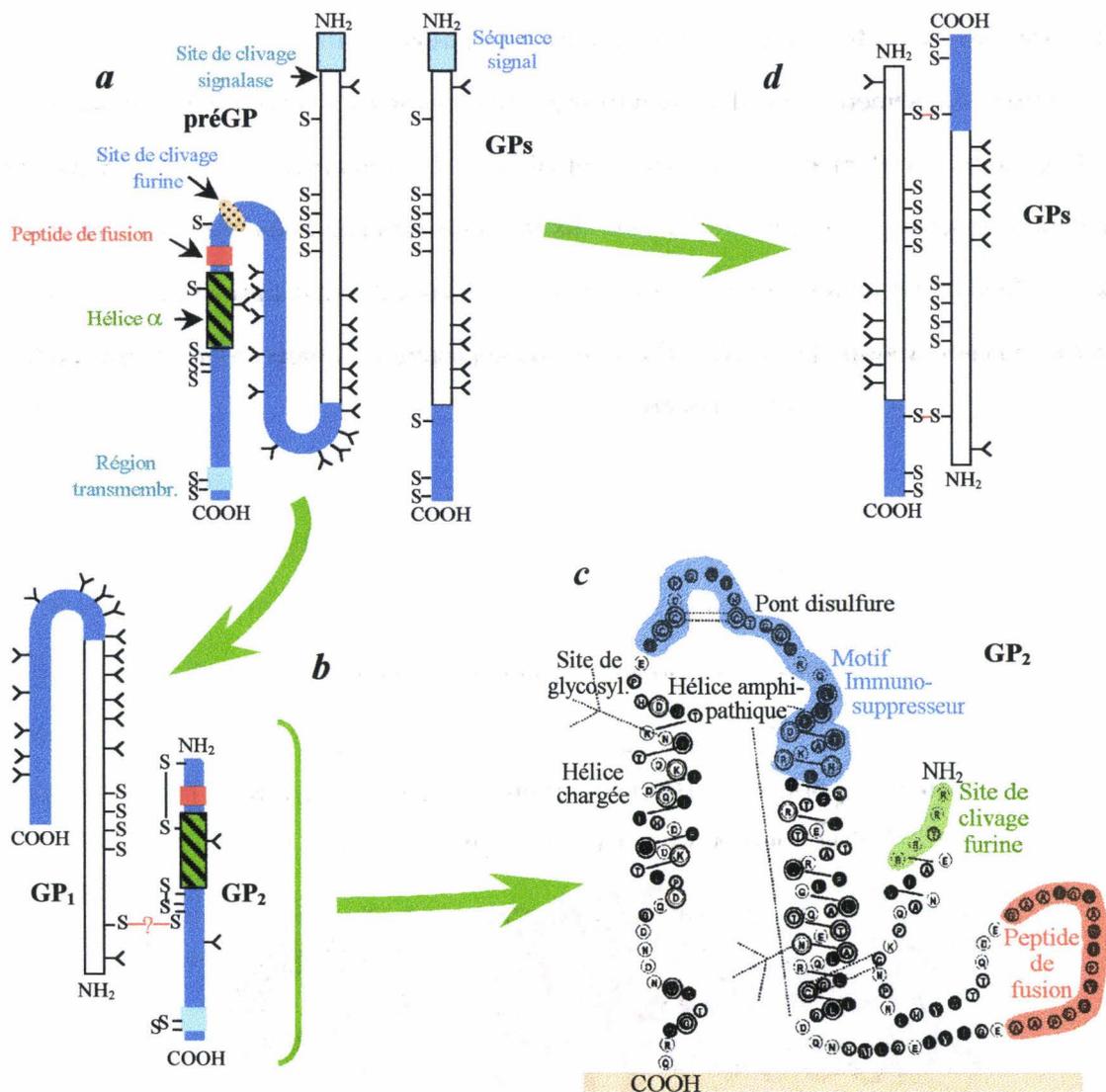


Figure 7. Représentation schématique de l'organisation du gène de la GP du virus Ebola. D'après A. Sanchez *et al*, réf 87

sur 2 phases ouvertes de lecture. La réunion sur l'ARN des 2 cadres de lecture se fait par une édition transcriptionnelle consistant à ajouter une base A supplémentaire non codée à la suite d'une succession de 7 A permettant ainsi à la polymérase de ne pas rencontrer le codon d'arrêt et de synthétiser l'ARNm couvrant tout le gène de la GP (87, 109). Par contre, le virus de Marburg ne transcrit qu'un seul ARN codant pour la GP membranaire, l'ARNm ne subissant pas d'édition (110).

La maturation de la GP requiert une séquence complexe d'évènements post-transcriptionnels. Ainsi, plusieurs formes de GP peuvent être observées dans la cellule. Le premier précurseur, présent dans le réticulum endoplasmique, est une GP de 110 kDa, représentant la forme N-glycosylée de la GP, appelée préGP_{er}. La glycosylation se poursuit ensuite et une GP de 160 kDa complètement glycosylée, la préGP, apparaît dans l'appareil de Golgi (figure 8a). Enfin, la préGP est clivée par une pro-protéine convertase de l'hôte, la furine, et forme un dimère appelé GP_{1,2}, composé de la GP₁ (140 kDa) et de la GP₂ (26 kDa) liées par un pont disulfure, représentant la forme mature de la GP des virus Ebola et de



Marburg (figure 8b) (111, 112). Il est intéressant de noter qu'en dépit de sa distribution ubiquitaire, la furine est particulièrement exprimée dans les hépatocytes et les cellules endothéliales, des cibles virales privilégiées (111). Il reste à déterminer de façon certaine si d'autres protéases que la furine peuvent cliver la GP, une controverse existant à ce sujet (111, 113). Il semble néanmoins que ce site soit important dans la pathogénicité. En effet, les souches pathogènes d'Ebola comme Zaïre, Soudan et Côte d'Ivoire possèdent le motif consensus (RCK/RR) et sont très sensibles au clivage par la furine, tandis que la souche Reston qui semble apathogène pour l'homme possède un site altéré (KQKR) rendant le clivage peu efficace (111).

La GP₂, sous-unité responsable de l'ancrage dans la membrane virale présente plusieurs motifs très conservés entre les filovirus, mais aussi avec certains rétrovirus. Elle contient une séquence de 22 acides aminés neutres et hydrophobes située à une courte distance du site de clivage, ce qui est similaire aux peptides de fusion des rétrovirus. De plus, des peptides synthétiques reproduisant cette séquence interagissent, en présence de calcium, avec des membranes contenant des phospholipides de type phosphatidylinositol et induisent la fusion de vésicules lipidiques (114). La GP₂ des virus Ebola et Marburg contient également une séquence de 26 acides aminés homologue aux motifs immunosuppresseurs des glycoprotéines de certains rétrovirus (87, 115, 116). La modélisation de la structure secondaire de la GP₂ présente de grandes homologues avec la protéine transmembranaire de rétrovirus oncogènes, formée de deux motifs en hélice exposant les motifs immunosuppresseur et de fusion (figure 8c) (117). Récemment, la cristallisation de fragments de la GP₂ a permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de sa forme activée (figure 9) (118,

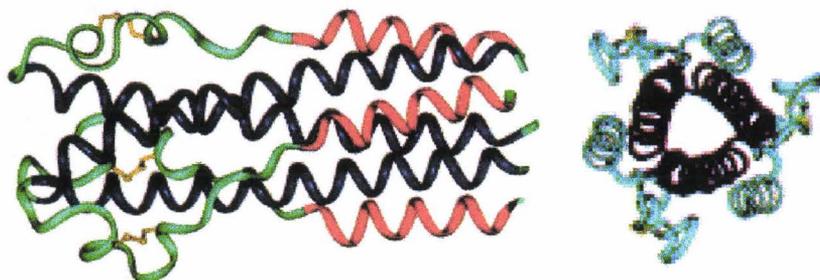


Figure 9. **Structure tertiaire et quaternaire de la GP₂**. Vue de côté et de dessus du trimère de GP₂ à l'état fusogène (structure hélicoïdale en épingle à cheveux). L'hélice du côté NH₂ est en bleu et celle du côté COOH est en rouge. Le motif immunosuppresseur est en vert et le pont disulfure en jaune. La portion transmembranaire (C-term.) de la GP₂ et le peptide de fusion (partie N-term.) ne sont pas représentés. D'après V.N. Malashkevich *et al*, réf 119

119), confirmant l'extrême similitude structurale existant entre la protéine de fusion du virus Ebola et celles d'autres virus (SIV, HIV, virus de la grippe) et suggérant de fait un mécanisme d'action commun (120, 121). Après fixation de la glycoprotéine sur le récepteur, un 2^{ème} signal d'activation provoque un changement conformationnel du trimère de GP₂. Chacune des molécules de l'homotrimère prend alors une structure hélicoïdale en 'épingle à cheveux' permettant l'exposition du domaine de fusion et le rapprochement des 2 membranes. Le domaine de fusion (hydrophobe) s'introduit dans la membrane de la cellule cible et la fusion a lieu par des mécanismes encore inconnus. Le passage de l'état natif à l'état fusogène de la GP₂ pourrait dépendre du pH (122) (peut-être de manière analogue au virus de la grippe pour lequel le passage à l'état fusogène dépend du faible pH des endosomes (123)), ou même être induit par l'interaction avec un second récepteur à l'exemple du complexe GP120/GP41 du virus HIV (121).

Ainsi, tandis que les trimères de GP₁ permettent la fixation sur le récepteur cellulaire, il semble que la GP₂ soit impliquée non seulement dans la fusion membranaire, mais aussi dans la formation du trimère de GP_{1,2}, dans le positionnement des trimères de GP₁ pour la fixation sur le récepteur, et même dans les interactions avec le système immunitaire par l'intermédiaire du motif immunosuppresseur.

En plus de la GP membranaire, plusieurs types de GPs sont sécrétées des cellules infectées par les virus Ebola. La transcription du gène de la GP, en raison du site d'arrêt précoce, génère majoritairement un ARNm non-édité codant pour une protéine de 50 à 70 kDa (moyenne 59 kDa), la GPs, qui n'est pas produite lors des infections par le virus de Marburg (87, 109). Ne possédant que la séquence signal (site de clivage de la signalase) située à l'extrémité NH₂ et non le motif transmembranaire qui se trouve à l'extrémité COOH, la GPs est sécrétée de la cellule, mais non incorporée dans la membrane plasmique. La GPs est en fait sécrétée sous forme d'homodimères, dans lesquels les 2 molécules de GPs, orientées de manière antiparallèle, sont reliées par 2 ponts disulfures situés en position 53 et 306 (112, 124) (figure 8d). La GPs est N-glycosylée dans l'appareil de Golgi, les carbohydrates représentant un tiers de sa masse (109). La séquence de l'extrémité COOH différant de celle de la GP sur 69 acides aminés, la structure et la fonction de cette protéine doit être différente. Une autre GP non-structurale, la GPss, est synthétisée à partir d'un

ARNm édité contenant 6 ou 9 A au lieu de 8, subissant également l'arrêt précoce de transcription du fait de l'absence de changement de cadre de lecture (109, 124). La séquence COOH de la GPss diffère de la GP et de la GPs, résultant en une différence de masse de la séquence d'acides aminés de 6,5 kDa entre la GPs et la GPss. La GPss ne possédant pas de cystéine à l'extrémité C-terminale, elle ne peut former d'oligomères et est sécrétée, en très faible quantité néanmoins, sous forme monomère (124). La GP₁ est également retrouvée dans le surnageant de cellules infectées (108). La GP₁ est probablement relarguée du complexe GP_{1,2} membranaire à la suite de la réduction du pont disulfure reliant les 2 sous-unités, comme pour la protéine HA₁ du virus de la grippe, ou bien il est possible que durant la maturation de la préGP, une fraction ne soit pas reliée par le pont disulfure et se dissocie spontanément (comme pour la GP120/41 du virus HIV) (125). Enfin, une fraction mineure de GP_{1,2} est associée à des virosomes, sur lequel on retrouve les spicules caractéristiques des virions (108).

Le relargage de GP₁ et la sécrétion de GPs suggèrent des fonctions biologiques – à ce jour encore inconnues – pour ces protéines solubles à l'exception d'une publication rapportant la fixation de la GPs (et non de la GP_{1,2}) à la surface des neutrophiles (126). Cependant, de nombreuses évidences minimisent l'implication de la GPs dans la pathogénèse au profit de la GP₁ soluble : *i*, le virus de Marburg, bien que très pathogène, ne produit pas de GPs mais de grandes quantités de GP₁ sont relarguées au cours de l'infection ; *ii*, certaines souches de virus Ebo-Z, mutées dans le site d'édition de la GP et ne produisant que de très faibles quantités de GPs, conservent toute leur pathogénicité (127) ; *iii*, le sous-type Reston, le moins pathogène des virus Ebola, produit des quantités de GPs comparables aux autres sous-types mais peu de GP₁ est relarguée (87, 127).

6. Un récepteur cellulaire inconnu.

Si l'utilisation de vecteurs rétroviraux exprimant ('pseudo type') la GP_{1,2} a confirmé que cette protéine était responsable de la fixation du virion à la surface de la cellule cible et de son entrée, le récepteur cellulaire sur lequel se fixe la GP₁ n'est toujours pas connu. Il semble néanmoins que le récepteur (ou un co-récepteur) soit une glycoprotéine de surface contenant

des chaînes oligosaccharidiques liées en N indispensables à l'infection de la cellule (103). De plus, l'infection par le virus Ebola est inhibée par des agents lysosomotropiques comme la chloroquine et le sulfate d'ammonium, indiquant que l'entrée du virus dépendrait du pH (122). Ces études ont également permis de montrer le tropisme très large de la GP_{1,2}, les vecteurs 'pseudo typés' étant capables d'infecter différentes lignées cellulaires – cellules épithéliales provenant de nombreux tissus, cellules endothéliales, lignées monocytaires, hépatocytes – provenant de différentes espèces – hommes, PNH, souris, hamsters (103, 122, 126). Il est intéressant de noter que les lymphocytes B et T sont totalement réfractaires à l'infection par ces vecteurs, suggérant que ces cellules n'expriment pas à leur surface le récepteur (ou le co-récepteur) (122). Enfin, bien que cela soit controversé, la GPs semble se fixer à la surface des neutrophiles – probablement via le CD16b (FcγRIIIb), tandis qu'elle ne se fixe pas à la surface des cellules endothéliales à l'inverse des vecteurs exprimant la GP_{1,2} (126). Ces résultats confirment que la GP membranaire et la GPs n'ont pas les mêmes sites de fixation et surtout, présentent probablement des fonctions biologiques distinctes. D'ailleurs, très peu de réactions croisées sont observées entre les deux formes de GP, suggérant des structures différentes (104, 112).

III. PHYSIOPATHOLOGIE DES FIEVRES HEMORRAGIQUES A FILOVIRUS.

1. Tableau clinique des fièvres hémorragiques à filovirus.

Si la mortalité chez l'homme est variable selon les sous-types de virus Ebola et le virus de Marburg, le tableau clinique des fièvres hémorragiques à filovirus est relativement similaire.

La période d'incubation.

La période d'incubation des FHV à filovirus peut varier de 3 à 21 jours, mais elle est le plus souvent de 5 à 8 jours dans le cas d'Ebo-Z, lorsque l'infection a lieu par contact cutané/muqueux, et un peu moins lors d'une contamination par voie parentérale (aiguilles souillées, Yambuku, RDC, 1976) (9, 128). Une période d'incubation de 7 à 14 jours a été observée lors de l'épidémie d'Ebo-S (Nzara, Soudan, 1976) (11) tandis qu'un des deux patients infectés par Ebo-CI a présenté les premiers symptômes de FHV 8 jours après l'infection (129). Dans le cas du virus de Marburg, la période d'incubation est également comprise entre 7 et 11 jours (7, 8). Le virus Ebo-R n'ayant pas induit de pathologie chez les quelques cas documentés, on ne peut parler de période d'incubation.

Une évolution biphasique.

Les fièvres hémorragiques virales à filovirus se manifestent très soudainement et présentent une évolution biphasique, avec une période de relative rémission d'un ou 2 jours.

Ainsi, la maladie se déclare dans tous les cas par un syndrome pseudo-grippal composé d'une température élevée et persistante accompagnée de violentes céphalées et de douleurs articulaires et musculaires (tableau 1). D'autres symptômes – asthénie extrême, anorexie, diarrhées, nausées, vomissements, douleurs abdominales – apparaissent ensuite dans les jours qui suivent chez la plupart des patients, tandis que les douleurs thoraciques sont, à la différence des autres FHV, retrouvées très souvent lors des infections par Ebo-S (11). Maux de gorge, odynophagie, dysphagie et hyperémie conjonctivale bilatérale surviennent également chez environ la moitié des patients. On peut également observer chez certains

malades de la toux. Enfin, 4 ou 5 jours après l'apparition des symptômes, des rashes érythémateux généralisés (parfois accompagnés de pétéchies), suivis de desquamation, sont notés chez certains patients (chez la plupart dans le

cas du virus de Marburg) (6, 8, 9, 18, 128, 129).

Après cette première phase, d'une durée d'environ 8 jours et souvent moins, une courte période de pseudo-rémission est parfois observée, permettant une légère amélioration de l'état du patient (40).

Par la suite, certains patients évoluent vers une aggravation de la maladie et la mort, survenant en moyenne 10 jours après l'apparition des symptômes (3-21 jours), tandis que les autres, en dépit de la sévérité de leurs symptômes, se remettent lentement de la maladie et deviendront convalescents. La 2^{ème} phase clinique de la maladie est composée de multiples signes hémorragiques – saignements au niveau des muqueuses et des points d'injection, gingivorragie, hématomèse, pétéchies, épistaxis et hémoptysie – qui sont de très mauvais pronostic. Méléna et hématurie représentent les signes hémorragiques les plus fréquents et surviennent également chez certains survivants. D'autres signes évocateurs d'une issue fatale surviennent quelques heures avant le décès tels la tachypnée, le hoquet et l'anurie, tandis qu'il arrive que la température se normalise à ce moment. Des signes neuropsychiatriques sont observés chez certains patients, particulièrement dans le cas des

virus de Marburg et Ebo-S: convulsions, confusion, prostration, agressivité, méningite, tinnitus, dysesthésie et plus rarement cécité brutale et dysphonie. Très souvent, un avortement

	Décès	Survie
Symptômes.		
Asthénie	85	95
Céphalées	52	74
Diarrhée	86	84
Nausées/Vomissements	73	68
Douleurs abdominales	62	68
Arthralgies/Myalgies	50	79
Anorexie	43	47
Maux de gorge, odynophagie ou dysphagie	56	58
Douleurs lombaires	12	26
Toux	7	26
Douleurs thoraciques	10	5
Chute des cheveux	5	11
Tinnitus	1	11
Dysesthésie	0	5
Signes.		
Fièvre	93	95
hyperémie conjonctivale	42	47
Rash érythémateux	14	16
Tachypnée	31	0
Hoquet	17	5
Anurie	7	0
Convulsions	2	0
Signes hémorragiques.		
Méléna	8	16
Hématurie	7	16
Gingivorragie	15	0
Hématémèse	13	0
Selles sanglantes	7	5
Pétéchies	8	0
Epistaxis	2	0
Saignement p ⁱ injections	8	5
Hémoptysie	0	11
TOTAL	42	37

Tableau II. Tableau clinique des FHV à Ebo-Z (RDC, 1995). La fréquence de survenue des symptômes et signes (%) est indiquée pour les décédés (n=84) et les survivants (n=19). D'après M.A. Bwaka *et al*, réf 128

spontané survient chez les patientes enceintes (25% à Yambuku, 1976 et 66% à Kikwit, 1995) environ une semaine après l'apparition des symptômes. De même, tous les enfants nés de patientes ayant succombées à l'infection décèdent dans les 3 semaines qui suivent la naissance sans symptôme particulier à l'exception de fièvre (8, 9, 11, 128, 130). Les femmes enceintes infectées par Ebo-Z présentent d'ailleurs des FHV extrêmement sévères, accompagnées d'un tableau clinique complet, de saignements dans tous les cas et d'une mortalité proche de 100% (131). Il est intéressant de noter qu'en dépit d'un tableau clinique et d'un taux de mortalité similaires, la fréquence des saignements lors de l'épidémie de Kikwit (RDC, 1995) est très inférieure à celle observée à Yambuku (RDC, 1976) (41 et 78%, respectivement, pour les décédés ; 37 et 40% chez les survivants), particulièrement dans le cas des patients décédés (9, 128). Les souches virales étant similaires (87), cette différence peut être liée au mode de transmission intraveineux pour la plupart lors de l'épidémie de Yambuku, à des soins et une prise en charge médicale plus élaborés à Kikwit, à des cofacteurs extérieurs, mais aussi à un biais d'observation (rétrospective en 1976). De même, tandis que la mortalité induite par Ebo-S est inférieure à Ebo-Z (53 et 80%, respectivement), les signes hémorragiques sont plus fréquents avec Ebo-S (>90 et 50% des décédés et survivants, respectivement) (11).

La convalescence.

Les symptômes de FHV s'estompent chez les survivants environ 2 semaines après la survenue de la maladie. Ils commencent à retrouver l'appétit, mais une asthénie intense et un amaigrissement notable persisteront encore quelques semaines. De même, de nombreuses complications sont notées pendant la convalescence chez ces patients. Ainsi, ces derniers souffrent fréquemment d'arthralgies (qui pourraient être liées à des dépôts d'immuns complexes), de myalgies, d'anorexie, de douleurs abdominales et de chute massive des cheveux dans les semaines ou les mois qui suivent la maladie. On observe également des complications ophtalmologiques et génitales – uvéites, cécité temporaire, conjonctivites, orchite unilatérale ; neurologiques – tinnitus ; et quelquefois cardiaques (55, 128, 132). Ces désordres peuvent être liés à la persistance virale dans certains sites de l'organisme privilégiés sur le plan immunitaire. Ainsi, le virus de Marburg est retrouvé dans la chambre antérieure de l'œil et dans le tractus séminal des convalescents (7, 8) et on peut amplifier le virus Ebola par

RT-PCR dans le sperme des convalescents jusqu'à 3 mois après la maladie (55), ce qui indique une contamination potentielle par voie sexuelle plusieurs mois après les symptômes et peut expliquer un tel cas de transmission du virus de Marburg (130). Cependant, cette contagion semble très limitée, puisque aucun autre cas similaire n'a pu être démontré depuis (55).

Les modèles primates d'infection par les filovirus, un tableau clinique similaire à celui de l'homme.

De par leur sensibilité aux infections filovirales et la similitude des manifestations cliniques par rapport à l'homme, les PNH sont des modèles animaux de choix pour l'étude de ces pathologies. De nombreuses espèces sont utilisées: vervets d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*, responsables de l'importation du virus de Marburg en Allemagne en 1967), singes cynomolgus asiatiques (*Macaca fascicularis*), singes rhésus (*Macaca mulatta*), mais aussi babouins (*Papio hamadryas*).

Le tableau clinique des FHV à filovirus chez les PNH est similaire à celui observé chez l'homme. Ainsi, les infections expérimentales de singes rhésus, cynomolgus et vervets par les virus de Marburg, Ebo-Z ou Ebo-S se caractérisent par l'apparition de fièvre (>39,5°C), d'anorexie et de léthargie 3-4 jours après l'infection. La fièvre persiste jusqu'au stade terminal de la maladie, et se normalise peu de temps avant le décès. Entre le 4^{ème} et 7^{ème} jour, les singes rhésus, cynomolgus et vervets développent un rash généralisé (photo 7) accompagné de pétéchies, certains présentant de la diarrhée et parfois des hémorragies rectales. Les singes perdent en moyenne 10% de leur masse corporelle et la mortalité est

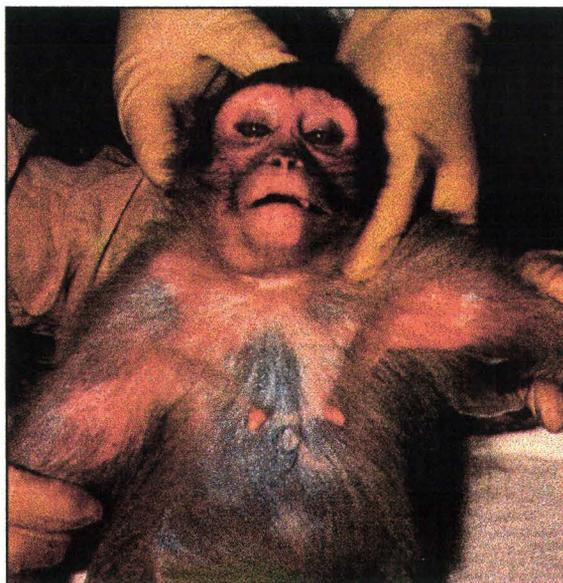


Photo 7. Rash cutané caractéristique chez un singe rhésus infecté par Ebo-Z. D'après E.T.W. Bowen *et al*, réf 136

supérieure à 90% 8 jours après l'infection (20, 133-137). De même, Ebo-R induit des symptômes similaires chez les singes vervets et cynomolgus (20, 138).

Bien que la mortalité soit plus élevée chez les PNH que chez l'homme et en dépit d'un tableau clinique sévère (fièvre, prostration, déshydratation, rash érythémateux, gingivorragie), certains animaux survivent et deviennent convalescents, d'une manière similaire à l'homme (36, 138, 139). Un plus grand nombre de singes survivent à l'infection par Ebo-R, démontrant comme pour l'homme la moindre pathogénicité de ce sous-type. La mortalité diffère également entre les différentes espèces de PNH pour un même virus (20, 140). Le virus Ebola peut être isolé ou amplifié par RT-PCR jusqu'à 2 semaines après l'infection dans le sang de PNH et 3 semaines dans le foie, les reins et la rate (56, 140). Comme chez l'homme, le virus de Marburg a été isolé dans le sperme de PNH 7 mois après l'infection (141).

2. Physiopathogenèse des fièvres hémorragiques à filovirus.

Paramètres virologiques au cours de l'infection de l'homme et des primates non-humains par les filovirus.

Virémie et antigénémie.

Ces 2 paramètres virologiques sont étroitement corrélés à la phase aiguë de la maladie. En effet, tant chez l'homme que chez les PNH, la survenue des premiers symptômes (fièvre, anorexie, asthénie, céphalées) est concomitante à l'apparition d'Ag viraux et de particules virales infectieuses dans la circulation. Si les paramètres virologiques sont peu connus pendant la période d'incubation chez l'homme, les données disponibles les plus précoces se situant en effet aux alentours de 2 ou 3 jours après l'apparition des symptômes, les infections expérimentales de PNH par les filovirus démontrent clairement cette corrélation. Ainsi, l'infection du vervet et du singe cynomolgus par Ebo-R se caractérisent par une période d'incubation de 7 jours tandis que la virémie est détectable à partir du 4^{ème} jour et présente un pic le 7^{ème} (20). Ces mêmes animaux infectés par Ebo-S ou Ebo-Z ou des singes rhésus infectés par Ebo-Z connaissent une période d'incubation de 3-4 jours, la virémie étant quant à elle détectable 2 jours après l'infection et maximale 4-5 jours après (20, 136). Il est intéressant de noter que les vervets présentent plus fréquemment une issue favorable à l'infection par les filovirus que les singes cynomolgus, en dépit d'une charge virale précoce beaucoup plus élevée (20, 140).

Au cours de l'infection de l'homme par le virus Ebo-Z, les paramètres virologiques caractérisant les premiers jours de la maladie sont relativement similaires entre les décédés et les survivants. La charge virale et l'antigénémie sont très élevées 3 jours après l'apparition des symptômes et similaires entre les 2 types de patients (figure 10). L'antigénémie augmente

ensuite régulièrement pour atteindre un pic – un peu plus élevé chez les décédés que les survivants – le 10^{ème} jour de la maladie ; et diminue rapidement pour disparaître entre le 15^{ème} et le 17^{ème} jour chez les survivants et

les patients succombant après le 10^{ème} jour, qui est le délai moyen de décès (49, 55). La charge virale plasmatique, bien que semblable le 3^{ème} jour de la maladie entre les

2 types de patients, atteint un pic très élevé chez les décédés le 9 ou 10^{ème} jour pour diminuer et disparaître par la suite, tandis qu'elle diminue au cours de la phase symptomatique pour disparaître environ 2 semaines après la survenue des symptômes chez les survivants. Chez ces patients, la disparition du virus de la circulation sanguine coïncide avec celle des symptômes, confirmant la corrélation existant entre ces différents paramètres (49, 55).

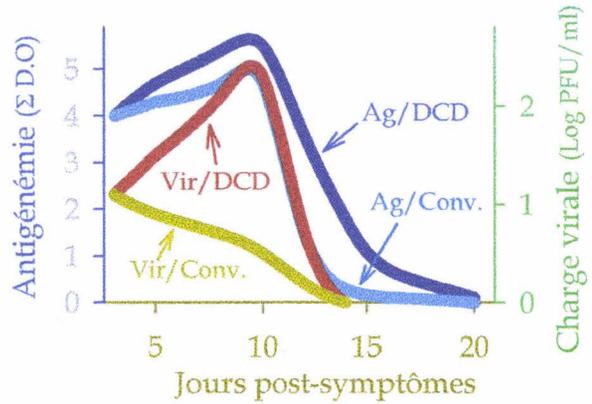


Figure 10. **Virémie et antigénémie au cours de l'infection de l'homme par le virus Ebo-Z.** Les cinétiques sont présentées en fonction du nombre de jours après l'apparition des symptômes. L'antigénémie (Ag) et la virémie (Vir) sont représentées pour les décédés (DCD) et les survivants (Conv.), sous forme de densités optiques (DO) et de log PFU/ml, respectivement. D'après T.G. Ksiazek *et al*, réf 49

Charge virale tissulaire.

Des charges virales élevées sont détectées dans de nombreux organes juste après l'apparition de la virémie. Ainsi, chez le singe rhésus infecté par Ebo-Z, de grandes quantités de virus sont retrouvées 4 jours après l'infection dans le foie, la rate et les poumons, tandis que des charges virales encore modérées sont déjà détectées dans les ganglions mésentériques, le cœur, les reins, les glandes surrénales et les testicules (tableau III). Les concentrations virales augmentent ensuite et le virus est même retrouvé dans le pancréas (un seul animal testé) et en faible quantité dans les urines à partir du 6^{ème} jour, mais non dans la bile et les fèces (136). Cependant, une étude plus récente a mis en évidence le virus de Reston dans les fèces de singes infectés (138). Il semble que la charge virale et antigénique pulmonaire soient beaucoup plus élevées lors de contaminations de PNH par aérosol que par voie parentérale (37, 38).

Tissus	Charge virale (Log ₁₀)				
	j4 R	j5 R	j6 R	j6 V	j8 R
Sang	6,0	5,5	6,5	6,5	6,5
Cœur	4,5	7,5	5,0	6,0	6,5
Poumons	7,5	8	6,5	6,0	7,5
Foie	7,5	7,5	7,0	7,0	7,5
Rate	7,5	6,5	8,0	7,5	7,5
Surrénales	5,0	7,0	7,0	5,0	7,5
Reins	5,0	7,0	7,0	5,0	7,5
Testicules	6,5	6,5	6,0		
Ganglions mésentériques	5,5	4,5	4,0	6,5	6,5
Pancréas					7,5
Bile	Nég	Nég	Nég		Nég
Fèces	Nég	Nég	Nég		Nég
Urine		Nég	3,5	3,5	3,5

Tableau III. Cinétique de la charge virale tissulaire chez les singes rhésus et vervets infectés par Ebo-Z. Les titres viraux sont indiqués en nombre d'unités infectieuses de cobaye. Le temps après l'infection est indiqué en jours. 'R' signifie rhésus et 'V' vervet. D'après E.T.W. Bowen *et al*, réf 136

Le monocyte/macrophage, première et principale cible virale.

Les cellules de la lignée monocytaire/macrophagique sont des cibles virales privilégiées des filovirus. En effet, les monocytes/macrophages humains sont très susceptibles *in vitro* à l'infection par le virus de Marburg et Ebo-Z, conduisant à la production d'ARN viral 6h après l'infection, de particules virales détectables dès 24-32h et finalement, de 6 à 14 jours, à la lyse des

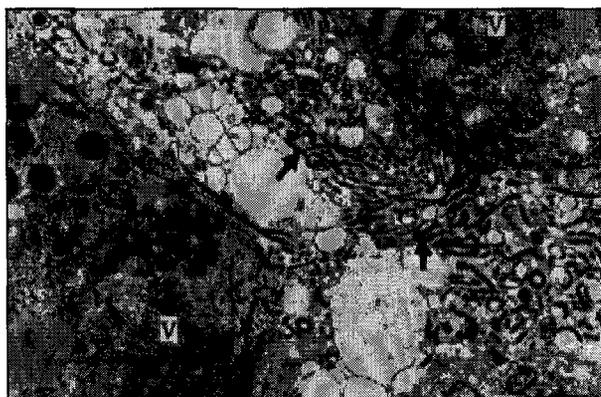


Photo 8. Réplication du virus Ebo-Z dans les macrophages de vervet. Les lettres 'V' indiquent les viroplastes et les flèches les virions. D'après E.I. Ryabchikova *et al*, réf 146

cellules infectées (142, 143). Les études histologiques réalisées au cours de l'infection de l'homme et des PNH par les filovirus indiquent que les monocytes/macrophages sont des sites majeurs de réplication virale dans les stades précoces de la maladie (photo 8) (21, 144-146).

Après s'être introduit dans la peau ou une muqueuse, probablement par l'intermédiaire de micro-lésions, les particules virales peuvent rejoindre la circulation générale directement, ou indirectement par l'intermédiaire du système lymphatique. Ce dernier cas suppose la réplication préalable du virus dans un ganglion lymphatique proche du site d'infection. Le tropisme privilégié des filovirus pour les monocytes/macrophages permet leur dissémination rapide dans plusieurs organes comme le foie (via les cellules de Kupffer), la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons (par l'intermédiaire des macrophages alvéolaires), les cavités pleurales et péritonéales et même le système nerveux via les cellules gliales. Le foie, la rate et les ganglions lymphatiques représentent cependant des sites majeurs de réplication virale, particulièrement au début de l'infection, permettant une production massive de virions alimentant la virémie. La présence de nombreux macrophages le long des sinus veineux de la rate, dans les sinus lymphatiques des ganglions, mais aussi des cellules de Kupffer dans les sinus de la veine porte du foie permet, au moment de l'apparition de la virémie, l'infection directe de ces cellules et l'amplification de la charge virale (147). Au cours de l'infection du vervet et du babouin par Ebo-Z, les premiers macrophages infectés apparaissent dans les sinus veineux du foie 2 jours après l'infection, tandis que les cellules de Kupffer infectées sont détectées dans des coupes hépatiques 3 jours après (146). De même, les premiers macrophages spléniques infectés apparaissent 3 jours après l'infection par Ebo-Z ou Marburg dans ces modèles, tandis que des particules virales sont détectées dans les macrophages alvéolaires le 5^{ème} jour. La présence de nombreux monocytes infectés dans le sang circulant permet également une dissémination systémique des filovirus après extravasation et migration tissulaire de ces cellules.

Un tropisme évolutif.

Très rapidement, d'autres cellules – fibroblastes, hépatocytes, cellules endothéliales, adrénalocytes, cellules interstitielles du testicule et parfois quelques rares cellules épithéliales

– deviennent des cibles dans lesquelles les filovirus se répliquent activement (24, 36, 37, 145, 146, 148).

Ainsi, au cours de l'infection du vervet et du babouin par le virus Ebo-Z, la réplication virale est détectée dans les hépatocytes et les adrénalocytes 3-4 jours après l'infection (146), et des inclusions virales intracytoplasmiques ont été mises en évidence dans des hépatocytes chez des patients ayant succombé à l'infection par le virus Ebo-Z (48). L'endothélium composant les sinus veineux du foie présente de nombreuses et larges disjonctions permettant au virus d'entrer dans l'espace de Disse et d'infecter directement les hépatocytes sans barrière cellulaire ou tissulaire (149). Des particules virales ont ainsi été mises en évidence dans l'espace de Disse sur des nécropsies hépatiques de PNH et de patients infectés par des filovirus (144, 145).

Chez le vervet, le singe rhésus et le babouin, du matériel viral est détecté dans les fibroblastes et les cellules endothéliales entre 6 et 8 jours après l'infection par Ebo-Z, c'est à dire dans les stades terminaux (36, 37, 146, 148) ; ainsi qu'avec Ebo-R (144). De même, des prélèvements *post-mortem* obtenus chez des patients infectés par Ebo-Z ont permis la mise en

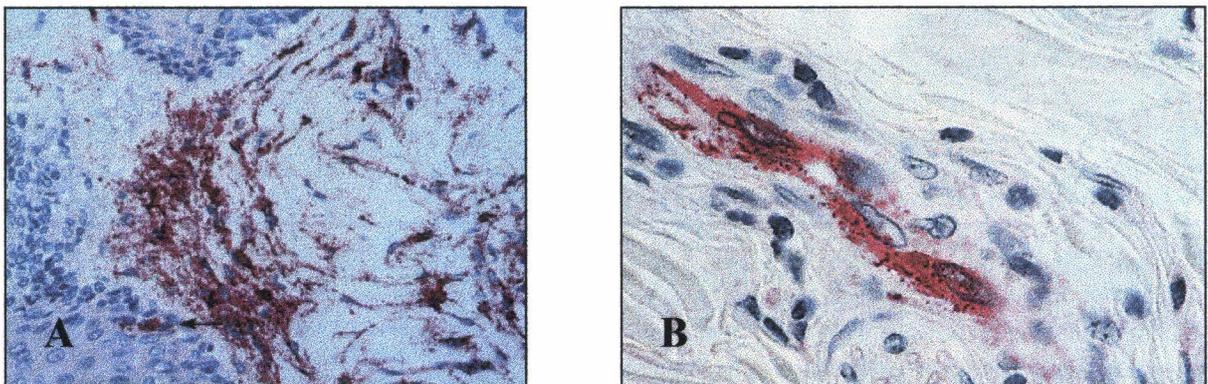


Photo 9. **Distribution des Ag Ebo-Z dans une biopsie de peau d'un patient décédé.** *a*, Les Ag sont retrouvés principalement dans les cellules endothéliales et les fibroblastes dermiques. De rares cellules de Langerhans sont immunopositives (flèche). *b*, Ag Ebo-Z détectés dans les cellules endothéliales d'un vaisseau sanguin. D'après S.R. Zaki *et al*, réf 48

évidence de la réplication virale dans les cellules endothéliales et les fibroblastes (photo 9) (48). Cependant, il semble que la réplication virale dans les cellules endothéliales soit restreinte aux veinules et capillaires.

Ces cellules sont probablement moins permissives que les monocytes/macrophages aux filovirus, ce qui peut expliquer leur infection tardive, à un moment où la charge virale est très élevée. Néanmoins, des études *in vitro* ont démontré que le virus de Marburg se répliquait

dans des cellules endothéliales cultivées et dans des veines de cordon ombilical avec une cinétique comparable aux traditionnelles cellules de rein de singes (Véro) utilisées habituellement pour la culture de filovirus (150). Le bourgeonnement des particules virales est dirigé du côté de la membrane apicale des cellules endothéliales, permettant une libération des virions dans la circulation (150). De plus, une étude récente a démontré la fixation de la GP membranaire, et non de la GPs, à la surface des cellules endothéliales, confirmant que la GP_{1,2} est impliquée dans l'infection de la cellule cible (126).

Modifications physiopathologiques au cours des fièvres hémorragiques à filovirus.

Les modèles primates d'infection par les filovirus ont permis de mieux comprendre la cascade d'évènements physiopathologiques conduisant au choc terminal et à la mort, tandis que les observations réalisées chez l'homme l'ont plutôt été *post-mortem*. Ainsi, les FHV à filovirus sont caractérisées par des modifications sévères de la formule sanguine, par des changements pathologiques touchant différents paramètres de la circulation et l'endothélium, des altérations majeures d'organes lymphoïdes (rate, ganglions, moelle osseuse) et des atteintes plus ou moins sévères selon le filovirus et l'hôte des fonctions hépatiques, rénales et surrénales, respiratoires, intestinales et reproductives.

Les modifications de la formule sanguine.

Des changements sévères de la formule sanguine caractérisent les FHV à filovirus. Une neutrophilie persistante – les neutrophiles pouvant représenter 90% des cellules circulantes – est détectable 4-5 jours après l'infection de PNH par Ebo-S, Z, ou Marburg, et ces granulocytes présentent des noyaux hyper-segmentés et des granules très denses suggérant leur activation (137). Au même moment, une thrombocytopénie et une lymphopénie touchant également les lymphocytes T et B apparaissent chez les PNH, s'exacerbant jusqu'à la mort. Quelques lymphocytes de formes atypiques sont observés parmi les cellules résiduelles (20, 36, 37, 137, 139, 146, 151, 152). Dans le cas d'Ebo-R, les altérations de la formule sanguine ne surviennent que 9-10 jours après l'infection (20). Des changements identiques sont observés au cours des infections humaines par les virus de Marburg (130, 153), Ebo-Z (22,

84), Ebo-S (11) et Ebo-CI (15, 129), ces modifications s'aggravant jusqu'au décès des patients.

La moelle osseuse.

Ces altérations pourraient provenir d'un dysfonctionnement de l'hématopoïèse. Chez le singe rhésus, des nécroses, de nombreux virions et des hémorragies sont observés dans la moelle osseuse dans les stades terminaux de l'infection par le virus Ebola (37, 38). De profonds changements – nécrose et déplétion cellulaire, diapédèse d'hématies, hémorragies, baisse du nombre de lymphocytes et de monocytes, altérations de l'endothélium – sont observés dans la moelle osseuse de babouin et de singes rhésus infectés par Ebo-Z ou Marburg. En dépit de ces atteintes sévères, la granulopoïèse et, dans un moindre degré, la thrombocytopoïèse persistent jusqu'à la mort. Cependant, les mégacaryocytes sont très altérés et, en dépit de l'absence de réplication virale, ne produisent pas de plaquettes ou en produisent dénués de granules spécifiques, et donc défectueuses (137).

Les macrophages et les cellules stromales de la moelle sont massivement infectés et les espaces intercellulaires contiennent de nombreuses particules virales. La destruction de ces cellules peut altérer l'hématopoïèse en modifiant le micro-environnement qui lui est nécessaire. De même, les macrophages peuvent être impliqués dans ces altérations par la sécrétion de médiateurs solubles.

Les altérations des vaisseaux sanguins.

Au cours de l'infection du vervet et du singe rhésus par Ebo-Z et Marburg, des changements pathologiques précoces atteignent la micro-circulation (veinules et capillaires) de différents organes. Ainsi, des modifications morphologiques des globules rouges et une diminution de la pinocytose endothéliale sont retrouvées 2-3 jours après l'infection dans ces modèles, indiquant des altérations du transport trans-endothélial et de l'approvisionnement en oxygène des tissus. Des troubles de la micro-circulation comme la stase capillaire, l'engorgement du sang, la formation de petits caillots sanguins, commencent à apparaître à ce moment dans le foie et la rate. Au bout de cinq jours chez le vervet infecté par Ebo-Z ou Marburg, l'engorgement et la thrombose des capillaires et petits vaisseaux sanguins

surviennent dans de nombreux organes, qui sont, par ordre décroissant d'altérations de l'endothélium, la rate, le foie, les reins, les poumons, les glandes surrénales, les ganglions lymphatiques, les intestins, et le cœur. Les modifications les plus sévères de la structure et de la perméabilité de l'endothélium sont observées dans les organes abondamment approvisionnés en sang (135, 146, 148). Il est intéressant de noter que ces troubles ne peuvent être liés, à ce moment de l'infection, à la réplication dans ces cellules. En effet, les dommages occasionnés par la réplication virale dans les cellules endothéliales ne surviennent qu'1 ou 2 jours avant le décès de l'animal. Des cellules endothéliales infectées se désintègrent alors le long des capillaires et des veinules, et des foyers nécrotiques apparaissent dans l'endothélium. Des œdèmes de la couche sub-endothéliale sont parfois observés dans les grands vaisseaux. Les péricytes des organes viscéraux et de la peau sont également très altérés à ce stade. De même, des études histologiques réalisées chez des patients décédés de FHV à Ebo-Z ont mis en évidence de grands dommages des vaisseaux sanguins de la peau et de différents organes: œdèmes, nécrose et décollement de la membrane, augmentation de la perméabilité endothéliale, liés en partie à la réplication virale (48, 145).

La rate et les ganglions lymphatiques, ou la destruction des organes lymphoïdes.

Une des caractéristiques des FHV à filovirus est l'altération majeure d'organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques, et plus particulièrement la rate. Ainsi, 2 ou 3 jours après l'infection du vervet par Ebo-Z, des troubles de la micro-circulation sont observés dans la rate (stase capillaire, thrombose), tandis que les macrophages et les cellules stromales et dendritiques de la rate et des ganglions lymphatiques sont hypertrophiés et qu'un blocage des mitoses et une involution folliculaire sont déjà perceptibles. Les dommages deviennent importants dans la pulpe rouge de la rate 4-6 jours après l'infection avec la destruction des parois des sinus, la nécrose de macrophages et de cellules stromales (également notée dans les ganglions lymphatiques, dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) et dans les plaques de Peyer) et des hémorragies massives, tandis qu'une importante déplétion lymphocytaire est observée dans la pulpe blanche. Dans les stades terminaux, l'architecture de la pulpe rouge est complètement détruite par la nécrose et nombre de cavités sont vidées de leur contenu cellulaire, remplacé par de la fibrine et des hématies. Dans la pulpe blanche de la

rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés, la déplétion lymphocytaire est extrême et les destructions sont exacerbées par des œdèmes de l'endothélium, des thromboses, des dépôts de fibrine et des phénomènes de diapédèse des hématies (146, 154). De même, des changements pathologiques similaires associés à une grande charge antigénique sont observés dans ces organes lymphoïdes lors des infections expérimentales de singes rhésus et cynomolgus par Ebo-Z ou Ebo-R (13, 36, 38, 135, 144, 148). Au cours de l'infection par Ebo-S, les lésions des organes lymphoïdes sont moins prononcées qu'avec Ebo-Z ou Ebo-R, en dépit d'une mortalité très forte (20). Les changements pathologiques des organes lymphoïdes et la réplication virale dans les macrophages spléniques ne sont par contre observés qu'à partir du 4^{ème} ou 5^{ème} jour après l'infection de vervets par le virus de Marburg. Cependant, les atteintes deviennent particulièrement sévères dans les stades terminaux et les mêmes destructions ne sont observées qu'avec le virus Ebo-Z (134). L'autopsie d'un chimpanzé infecté par Ebo-CI a également mis en évidence une congestion marquée de la rate, de nombreux foyers nécrotiques et hémorragies dans la pulpe rouge et une déplétion lymphocytaire très prononcée dans les follicules (21).

Les études histopathologiques *post mortem* réalisées chez des patients infectés par le virus de Marburg ont mis en évidence une destruction des lymphocytes de la rate et des ganglions lymphatiques et leur remplacement par des hématies (7, 79). De même, la rate et les ganglions lymphatiques de patients ayant succombé à l'infection par Ebo-S et Ebo-Z sont très altérés, la pulpe rouge de la rate étant engorgée et infiltrée de nombreuses hématies et les follicules lymphoïdes vidés de leur contenu lymphocytaire (11, 145, 155).

Le grand nombre de cellules monocytaires/macrophagiques dans les organes lymphoïdes explique l'atteinte précoce et extensive de ces tissus par la réplication virale. De même, la rate étant un organe particulièrement vascularisé, les altérations de la circulation et de l'endothélium sont également impliquées dans ces dommages. Cependant, les lymphocytes n'étant pas infectés par les filovirus (21, 122, 146, 156, 157), la destruction massive de ces cellules ne peut résulter d'effets cytopathogènes liés à la réplication virale, ni d'altérations de la circulation sanguine, encore relativement préservée lorsque la déplétion est initiée dans ces organes (2-3 jours après l'infection). Les différentes hypothèses concernant ces destructions seront abordées dans le chapitre IV.

Une atteinte hépatique sévère.

Le foie est l'un des organes les plus atteints au cours des FHV à filovirus, son dysfonctionnement résultant directement de dommages liés à la réplication virale, et indirectement des altérations de la micro-circulation. Ainsi, au cours de l'infection de différents PNH par Ebo-Z, Ebo-S et Marburg, on observe 2 jours après l'inoculation une congestion des sinus hépatiques, des vacuoles dans quelques hépatocytes et des cellules de Kupffer altérées. Des œdèmes de l'endothélium des sinus et des petits vaisseaux et quelques hépatocytes nécrosés apparaissent 3-4 jours après l'infection, tandis que de nombreuses cellules de Kupffer infectées sont localisées dans les sinus de la veine porte. Des changements pathologiques sévères surviennent au stade terminal de la maladie. Le virus se réplique activement dans les hépatocytes et les macrophages/cellules de Kupffer tandis que les

particules virales et les Ag s'accumulent. A partir du 5^{ème} jour, les sinus et les petits vaisseaux sont complètement détruits et les lumières se remplissent d'hématies, de débris cellulaires, de dépôts de fibrine et de caillots sanguins (photo 10). Enfin, de nombreuses cellules, infectées ou non, se désintègrent et les foyers diffus de nécrose hépatique sont de plus en plus nombreux (20, 37, 134, 135, 146, 148). Des modifications pathologiques

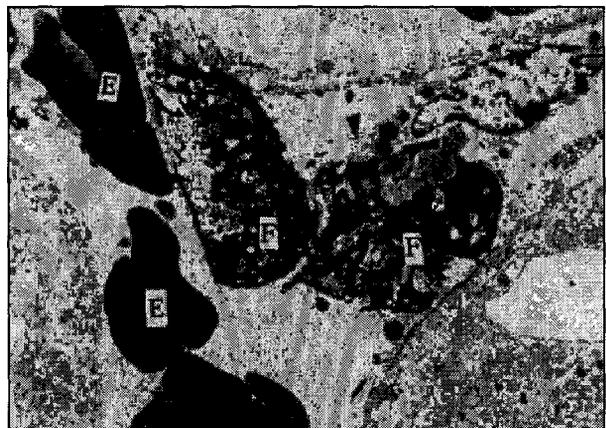


Photo 10. **Thrombose des sinus hépatiques chez le verveet infecté par Ebo-Z.** Les lettres 'E' représentent les hématies et 'F' les dépôts de fibrine. D'après E.I. Ryabchikova *et al*, réf 146

hépatiques similaires, à l'exception de l'absence de lésions vasculaires ont été notées chez un chimpanzé infecté par Ebo-CI, tandis que les syncytia multinucléés formés de cellules hépatiques infectées sont une caractéristique de ce modèle (21). Les atteintes sont par contre moins sévères au cours des infections expérimentales de PNH par Ebo-R (20, 144).

Les infections humaines par les virus Ebo-S, Ebo-Z et Marburg sont caractérisées par des atteintes hépatiques identiques à celle observées chez les PNH. Les nécroses hépatiques et parenchymateuses sont nombreuses. Les hépatocytes impliqués dans ces lésions contiennent de grandes inclusions intracytoplasmiques, remplies de nucléocapsides virales. Les cellules de Kupffer sont hyperplasiques et de nombreuses particules virales s'accumulent dans les sinus

hépatiques tandis que le virus se réplique activement dans les hépatocytes (photo 11) (8, 11, 48, 79, 153).

Les données biochimiques obtenues au cours des infections filovirales indiquent que

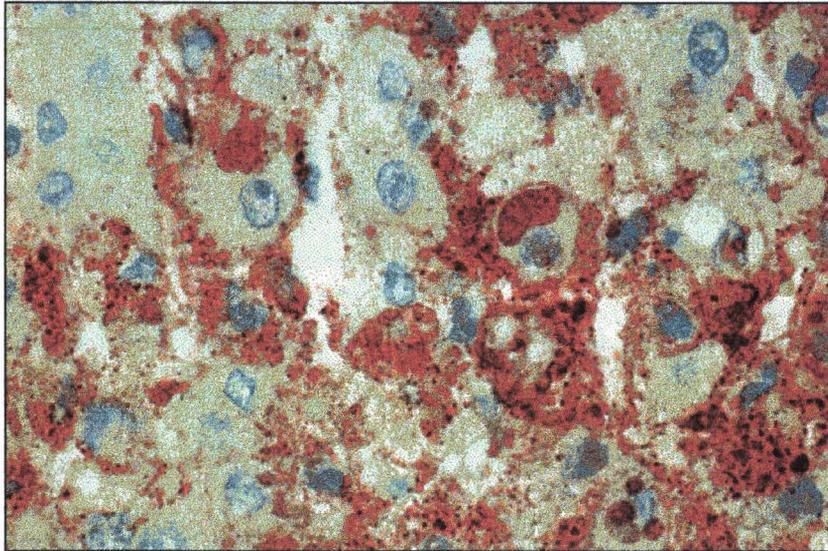


Photo 11. **Distribution des Ag Ebo-Z dans le foie d'un patient.** Les inclusions virales sont détectées dans les hépatocytes et de grandes quantités d'Ag dans les cellules sinusoidales et les sinus. D'après S.R. Zaki *et al*, réf 48

les fonctions de détoxification et de synthèse du foie sont sévèrement altérées. Ainsi, les infections de PNH par les virus de Marburg, Ebo-S, Ebo-Z et Ebo-R induisent une augmentation des concentrations sanguines des enzymes hépatiques, aspartate transaminase (AST) et alanine transaminase (ALT), et des ratios AST:ALT très élevés (jusqu'à 10:1). Ce ratio, inverse à celui observé lors des hépatites, semble être une caractéristique des infections filovirales. De même, les taux de lactate déshydrogénase (LDH) sont très élevés et les concentrations de créatinine et de phosphatase alcaline augmentent également dans les stades terminaux (20, 36, 37, 139, 146, 154). Cependant, les altérations enzymatiques présentent une cinétique différente selon les filovirus. Ainsi, si les infections expérimentales de PNH par Ebo-Z induisent un pic de AST, ALT et LDH dans la circulation 5 jours après l'infection, ces valeurs ne sont élevées que 9-10 jours après l'infection par Ebo-R, mais atteignent des concentrations égales ou même supérieures à Ebo-Z en dépit d'une pathogénicité moindre du sous-type Reston (20, 129, 158). Par contre, Ebo-S, bien que moins pathogène et présentant des constantes hépatiques moins élevées qu'Ebo-Z, induit néanmoins le pic enzymatique 5 jours après l'infection (20).

Peu d'études concernant les paramètres biochimiques caractérisant les FHV à filovirus de l'homme ont été publiées. Néanmoins, des altérations similaires des constantes hépatiques ont été observées lors d'infections humaines par les virus de Marburg et Ebo-Z, indiquant une défaillance de cet organe dans les stades terminaux. Ainsi, les patients infectés par le virus de Marburg et Ebo-Z présentent des concentrations très élevées en AST et ALT (avec un ratio AST:ALT élevé), en phosphatase alcaline et en bilirubine 1 ou 2 jours avant le décès (8, 9, 22, 153, 159). Dans le seul cas documenté d'infection humaine par Ebo-CI (survivant), des valeurs élevées en AST et ALT (ratio 2,7), phosphatase alcaline et LDH sont détectées 12-15 jours après l'infection, mais les dommages hépatiques chez cette patiente sont faibles, au vue des concentrations normales de bilirubine et de γ -glutamyl transférase (129).

Les dysfonctionnements rénaux.

Les reins sont relativement affectés lors des infections filovirales, et les données biochimiques obtenues chez les PNH et l'homme suggèrent des dysfonctionnements de sévérité variable. Sur le plan histopathologique, des lésions des tubules rénaux sont notées 3 jours après l'infection du vervet par le virus de Marburg ou Ebo-Z. Par la suite, les dommages s'accroissent et on observe une thrombose des capillaires, de l'hémostasie, des nécroses de l'épithélium tubulaire et des dépôts de sels minéraux dans les tubules. Des inclusions virales sont détectées dans l'endothélium, l'épithélium tubulaire et de nombreux macrophages. Au moment de la mort de l'animal, l'endothélium capillaire est en grande partie détruit, les espaces péri-vasculaires deviennent œdémateux et de nombreux macrophages et fibroblastes infectés se trouvent dans les tissus interstitiels. Dépôts de fibrine, diapédèse des hématies et hémorragies interstitielles ne sont observées qu'avec Ebo-Z dans ce modèle (146). Des altérations similaires surviennent chez le singe rhesus infecté par Ebo-Z (36, 38, 148). Au stade terminal de l'infection du singe cynomolgus par Ebo-R, des foyers nécrotiques sont détectés dans les tubules et l'endothélium et des dépôts de fibrine s'accumulent dans les capillaires (144). Par contre, un chimpanzé ayant succombé à l'infection par Ebo-CI ne présentait pas de lésion vasculaire ni dépôt de fibrine dans les capillaires, tandis que peu de macrophages infectés étaient détectés (21).

Peu de données histopathologiques sont disponibles en ce qui concerne les infections filovirales humaines. Néanmoins, une nécrose prononcée des tubules et quelques dépôts de fibrine ont été observés chez un patient décédé d'une FHV à virus de Marburg (153). De même, des autopsies de patients infectés par Ebo-S ont mis en évidence des foyers nécrotiques et des dépôts de sels minéraux dans les tubules, des précipités dans les espaces de Bowman et des infiltrations d'hématies et parfois de lymphocytes lysés dans les tissus interstitiels (11).

Les données biochimiques obtenues au cours des infections filovirales suggèrent un dysfonctionnement rénal dans les stades ultimes. Ainsi, 5 jours après l'infection du singe rhésus par Ebo-Z, les concentrations sériques d'urée, de créatinine et de créatinine phosphokinase augmentent tandis que celles de sodium, potassium et calcium diminuent ; ces désordres s'aggravent jusqu'à la mort (36, 139). Chez le babouin, ces changements surviennent 7 jours après l'infection par Ebo-Z et la fonction rénale est sévèrement altérée dans les stades terminaux (146, 154).

Le virus de Marburg induit chez l'homme une augmentation des concentrations d'urée et de créatine et une anurie dans les stades terminaux (8, 153). Par contre, le cas documenté d'infection par Ebo-CI n'a présenté qu'une altération très modérée de la fonction rénale (129).

Les glandes surrénales.

Bien qu'on ne connaisse pas l'impact des FHV à filovirus sur le système endocrinien, la réplication virale dans les adrénalocytes et les altérations de la circulation survenant dans les glandes surrénales suggèrent un dysfonctionnement probable. Chez le vervet, les perturbations hémostatiques deviennent sévères 5 jours après l'infection par Ebo-Z. Des petites hémorragies sont observées, ainsi que des phénomènes d'accumulation de plaquettes et de fibrine le long des capillaires. Des dommages cellulaires liés à la réplication virale sont observés dans certains adrénalocytes et macrophages. Un ou 2 jours après, le degré d'infection et de lyse des adrénalocytes augmente tandis que de nombreuses hémorragies et des foyers nécrotiques apparaissent. Dans les stades terminaux, des inclusions virales sont également observées dans les cellules endothéliales et l'importante destruction des adrénalocytes suggère un dysfonctionnement de la synthèse hormonale (146). De grandes quantités d'Ag viraux intra

et extra cellulaires ont été également détectées dans les glandes surrénales de singes rhésus infectés par Ebo-Z (38) tandis que les atteintes de ces organes au cours de l'infection par Ebo-R sont moins sévères (20).

Les poumons.

Les dommages observés dans les poumons au cours des FHV à filovirus dépendent pour une grande part des altérations de l'hémostase et sont variables en fonction du sous-type viral et du mode d'inoculation. Au cours de l'infection du vervet par Ebo-Z, des monocytes et des neutrophiles s'accumulent dans les vaisseaux sanguins et des caillots formés de fibrine, de débris cellulaires et d'hématies obstruent la circulation pulmonaire. Le virus ne semble pas se répliquer dans l'épithélium du tractus respiratoire, mais des macrophages alvéolaires, de rares fibroblastes et des cellules endothéliales infectées apparaissent 5 jours après l'infection (146). Chez le singe rhésus, les lésions pulmonaires sont variables, allant de modérées (petits foyers nécrotiques inter alvéolaires et œdèmes modérés) à sévères (nécrose extensive, collapsus alvéolaire, exudation de fibrine et d'hématies des alvéoles). De plus, de nombreuses hémorragies et des dépôts de fibrine sont retrouvés dans les tissus interstitiels et les vaisseaux pulmonaires, et la plupart des capillaires sont obstrués par des monocytes nécrosés, des débris cellulaires, des hématies et des plaquettes (135, 148). Lors d'infections expérimentales de singes rhésus par des doses élevées de virus de Marburg ou Ebo-Z par voie respiratoire (aérosol), la charge virale pulmonaire apparaît précocement et est très élevée tandis que de très grandes quantités d'Ag sont détectées dans les tissus interstitiels et les cavités alvéolaires, principalement autour des bronchioles terminales. De même, des Ag sont présents dans l'épithélium bronchiolaire, dans des macrophages alvéolaires, dans les pneumocytes alvéolaires (contenant également des inclusions virales typiques) et sur les muqueuses des voies respiratoires supérieures (37, 38, 151). Ainsi, le changement de la voie de contamination modifie la distribution virale dans les différents organes. De même, la charge virale beaucoup plus élevée et la présence massive d'Ag et probablement de particules virales dans les cavités alvéolaires suggèrent une transmission possible par voie orale dans ce cas précis, contrairement aux autres voies d'inoculation. D'ailleurs, une telle transmission par voie

orale semble s'être opérée entre des singes infectés par voie orale et les témoins négatifs gardés dans la même pièce à quelque distance (38).

Si Ebo-Z n'est retrouvé chez les PNH en grandes quantités dans les poumons que lors d'infections par voie aérosol, le virus Ebo-R a une grande affinité pour cet organe. Au cours de l'infection par voie parentérale de singes cynomolgus par Ebo-R, en plus des altérations observées avec les autres filovirus, des particules virales sont abondamment détectées dans les cellules interstitielles alvéolaires, dans les pneumocytes I et dans les cavités alvéolaires, suggérant un grand potentiel de transmission par voie orale pour ce sous-type (138, 144).

Le système digestif.

Les lésions retrouvées dans ces organes sont relativement modérées et essentiellement liées aux troubles de l'hémostase. Ainsi, de rares hémorragies surviennent chez des babouins et singes rhésus infectés par Ebo-Z (36, 154), tandis que des dépôts de fibrine sont détectés chez ce dernier (36, 135, 148).

Les organes de reproduction.

Aucun changement histopathologique n'est détecté dans les ovaires et les trompes de femelles rhésus infectées par Ebo-Z, à l'exception d'inclusions virales dans les macrophages et les fibroblastes (36). Par contre, chez les mâles, les tissus testiculaires sont œdémateux et des hémorragies et des dépôts de fibrine apparaissent dans et entre les canalicules 6-7 jours après l'infection. Des cellules épithéliales des tubes séminaux se désintègrent. Le virus Ebola se réplique dans les cellules interstitielles, l'endothélium et les monocytes et non dans les tubes séminaux (135, 148).

Le cœur.

Là encore, les altérations rencontrées dans le muscle cardiaque au cours des FHV à filovirus sont liées aux troubles de la circulation. Une congestion des vaisseaux sanguins et une accumulation de plaquettes dans les capillaires, une diapédèse des hématies et des dépôts de fibrine sont détectés au cours de l'infection de PNH par Ebo-Z. Le virus se réplique dans

les macrophages interstitiels et circulants 4-5 jours après l'infection et dans les cellules endothéliales dans les stades ultimes de la maladie (36, 146).

Le système nerveux.

Les données concernant cet organe sont très fragmentaires. Cependant, une congestion des vaisseaux sanguins et des petites hémorragies cérébrales ont été découvertes chez le vervet infecté par le virus de Marburg (160). Chez le singe rhésus infecté par Ebo-Z, des œdèmes périvasculaires et des phénomènes d'hémostase sont les seules lésions cérébrales (36).

Les troubles de l'hémostase, des éléments majeurs de la physiopathogénèse.

Les FHV à filovirus se caractérisent par des troubles précoces de l'hémostase, qui, s'aggravant au cours de l'infection, sont à l'origine d'une grande partie des modifications physiopathologiques aboutissant à la mort.

La coagulation intravasculaire disséminée.

La thrombocytopénie caractérisant les FHV à filovirus peut également être la conséquence d'une consommation exagérée de plaquettes, pouvant quant à elle résulter du phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), un syndrome rencontré dans la plupart des infections filovirales. Ainsi, des taux élevés de produits de dégradation du fibrinogène, suggérant le développement de la CIVD, sont observés dans les stades terminaux au cours de l'infection de singes rhésus, et de babouins par Ebo-Z (36, 137, 139, 146). De même, au cours de l'infection de l'homme par les virus de Marburg, Ebo-Z et Ebo-CI, des taux faibles de fibrinogène et très élevés de produits de dégradation sont détectés dans les stades aigus et sont associés à des paramètres de temps de prothrombine très rallongés, suggérant que la CIVD est également impliquée dans les infections humaines (9, 22, 84, 129, 153, 159). Au niveau morphologique, le syndrome de CIVD est illustré par de nombreux dépôts de fibrine, visibles dès 2-3 jours après l'infection, dans les capillaires de singes verts et rhésus infectés par Ebo-Z (36, 135, 146, 148). Cependant, ces dépôts ne sont pas observés dans tous les cas, et la gravité de la CIVD varie en fonction des espèces de primates et des filovirus, de

façon indépendante de la mortalité. Ainsi, aucun dépôt de fibrine suggérant l'implication de la CIVD n'a été observé au cours de l'autopsie d'un chimpanzé infecté par Ebo-CI (21, 33). De même, si les paramètres sanguins de coagulation suggèrent l'existence de CIVD lors de l'infection du babouin par Ebo-Z, les données histologiques ne montrent pas de dépôt de fibrine (146). Enfin, ces phénomènes sont moins sévères au cours de l'infection du singe cynomolgus par Ebo-S qu'avec Ebo-Z et Ebo-R en dépit d'une mortalité similaire (20). Ces données suggèrent que la CIVD, bien que composante importante de la physiopathogénèse des FHV à filovirus, ne semble pas déterminante dans l'issue de l'infection (71, 139). Le monocyte/macrophage peut participer à l'induction de la CIVD, par sa capacité de sécrétion de nombreux facteurs de coagulation en réponse à différents stimuli (161-164), mais aussi par la production de cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1) ou le tumor necrosis factor- α (TNF- α) qui stimulent l'activité procoagulante des cellules endothéliales et, pour le dernier, qui favorise l'expression de molécules d'adhésion pour les plaquettes et les leucocytes à la surface des cellules endothéliales (165-167). De plus, les monocytes/macrophages sont impliqués, par leur propriétés de phagocytose, dans l'élimination plasmatique des facteurs de coagulation activés et des produits de dégradation du fibrinogène (168, 169). Un dysfonctionnement des fonctions phagocytaires des monocytes/macrophages, probable étant donné l'atteinte majeure de ces cellules lors des infections filovirales, pourrait intervenir dans le développement de la CIVD. D'autre part, les lésions de l'endothélium – résultant de la cytolysse des cellules endothéliales induite par la réplication virale (150) – peuvent, en exposant le tissu conjonctif sous-jacent thrombogénique, induire un processus menant à l'adhérence et à l'agrégation des plaquettes sur la zone lésée (170, 171). De même, étant donné le rôle important de l'endothélium dans la régulation de l'activité pro- ou anti-coagulante intravasculaire, l'atteinte des cellules endothéliales dans les stades terminaux peut provoquer un dysfonctionnement de ces cellules. Ainsi, des tissus vasculaires de singes rhésus infectés par Ebo-Z perdent *in vitro* leur capacité à produire de la prostacycline, ce qui peut contribuer à cette coagulopathie consommatrice (139).

Un dysfonctionnement des plaquettes.

Une autre caractéristique des infections filovirales est la perte de la capacité à s'agréger des plaquettes, détectable encore plus précocement que la thrombocytopénie. Au cours de l'infection du babouin par Ebo-Z, une tendance à l'hypercoagulation est notée jusqu'au 4^{ème} jour, suivie d'une hypocoagulation s'accroissant jusqu'à la mort de l'animal (146). De même, l'altération des fonctions plaquettaires apparaît 4 jours après l'infection du singe rhésus par Ebo-Z et aucune agrégation ne peut être obtenue dans les stades terminaux (137, 139). Plusieurs causes peuvent expliquer ce dysfonctionnement plaquettaire. Les produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène, présents en grande quantité dans les stades terminaux des infections filovirales, sont connus pour directement inhiber les fonctions des plaquettes et interférer avec la polymérisation de la fibrine (172). De même, l'activation *in vivo* des plaquettes au cours de la CIVD peut provoquer ces dysfonctionnements par un phénomène d'"épuisement" (*exhaustion*) des plaquettes (139, 173, 174). Une baisse de la concentration des facteurs de coagulation peut également être impliquée dans cette coagulopathie, et pourrait résulter d'une consommation exagérée du fait de la CIVD (175) et d'une baisse de la production liée au dysfonctionnement hépatique, organe de production de la plupart de ces facteurs (176).

Les hémorragies généralisées.

Enfin, la plus évidente et sans doute la plus grave des caractéristiques des FHV à filovirus est le syndrome hémorragique généralisé. Étant donné le tropisme des filovirus pour l'endothélium et les multiples troubles hémostatiques, ce syndrome est bien évidemment multifactoriel. La cytolysse des cellules endothéliales induite par la réplication virale contribue probablement à la survenue des hémorragies dans les stades terminaux (148, 150). Ainsi, au cours de l'infection du vervet par Ebo-Z, la lyse de certaines cellules endothéliales infectées dans les capillaires ne laisse intacte que la membrane basale. Si de petites lésions de l'endothélium peuvent être comblées par la multiplication des cellules adjacentes (177), les dommages extensifs induits par le virus dans les stades terminaux rend ce mécanisme inopérant et une extravasation du sang dans les tissus sous-jacents se produit. Cependant, les lésions de l'endothélium liées à la réplication virale sont observées uniquement dans les stades

ultimes et ne peuvent, par leur ampleur, justifier les hémorragies sévères caractérisant les FHV à filovirus. Les dysfonctionnements de l'hémostase précédemment décrits comme la thrombocytopénie, le défaut fonctionnel des plaquettes, la CIVD, et la dysrégulation des facteurs de coagulation sont sans aucun doute impliqués pour une grande part dans les hémorragies. De plus, une augmentation de la perméabilité de l'endothélium semble survenir au cours des infections filovirales, et contribue probablement à l'induction des hémorragies, des œdèmes généralisés et du choc hypovolémique. Ainsi, une diapédèse des hématies à travers un endothélium relativement intact est évidente dans les organes viscéraux et la muqueuse intestinale au cours des infections filovirales, plus particulièrement dans le cas du virus Ebola. Au cours de l'infection du singe rhésus par Ebo-Z, la micro-circulation de tous les organes est très altérée, avec des capillaires et des veines engorgés, de petites hémorragies et œdèmes tandis que les jonctions de l'endothélium se dissocient et que la membrane basale se détache de l'épithélium sous-jacent (148). Les péricytes étant impliqués dans la régulation de la perméabilité endothéliale, leur atteinte dans les stades terminaux peut contribuer à ces désordres (178). Les monocytes/macrophages infectés par les filovirus semblent également impliqués dans la perméabilisation de l'endothélium. En effet, l'infection de monocytes/macrophages *in vitro* par le virus de Marburg ou Ebola induit l'activation de la cellule et la sécrétion de TNF α (142, 143, 179), ce dernier induisant une augmentation de la perméabilité para-endothéliale (rupture des jonctions intercellulaires) bien avant la cytolysse des cellules infectées (142, 180). Cependant, de nombreux autres produits (protéases, thrombine, histamine, sérotonine, radicaux de l'oxygène, interferon- γ (IFN γ), IL-2) peuvent modifier de façon cumulative la perméabilité de l'endothélium, mais également abaisser le seuil à partir duquel le TNF α induit ces effets.

Malgré le pan-tropisme des filovirus, aucun organe n'est suffisamment altéré pour justifier à lui seul le choc fulminant et la mort. La sévère perte de fluide intravasculaire induit une déshydratation et une rupture des équilibres acides-bases et électrolytiques (140). Un choc hypovolémique et hypotensif survient dans les stades ultimes et peut, additionné aux dysfonctionnements de plusieurs organes ou tissus essentiels, être responsable du décès au cours des FHV à filovirus.

Les infections filovirales non-fatales.

Bien que les infections de PNH par Ebo-Z soient le plus souvent fatales, quelques animaux parviennent à survivre malgré un tableau clinique sévère. L'un de ces survivants a présenté une période symptomatique un peu rallongée par rapport aux singes mortellement infectés, mais a subi les mêmes altérations de la formule sanguine et de l'hémostase, tandis que les fonctions hépatiques et rénales et les équilibres électrolytiques étaient sévèrement perturbés. La formule sanguine a retrouvé des valeurs normales 11-12 jours après l'infection, à l'exception du taux de plaquettes ; et les paramètres biochimiques et de coagulation se sont normalisés 14 jours après l'infection, en même temps qu'ont disparu les symptômes (139). Une proportion plus importante de survivants est observée lors d'infection de singes cynomolgus et vervets par Ebo-S et Ebo-R. Il est possible que la moindre létalité d'Ebo-R soit liée à sa plus grande période d'incubation et à sa virémie plus tardive, laissant un plus long temps de réaction à l'hôte. La capacité de survivre aux infections filovirales dépend également de l'espèce de PNH infectée, les vervets présentant en effet une plus grande proportion de survivants que les singes cynomolgus malgré une virémie équivalente sinon plus élevée (20).

En dépit d'une charge virale et antigénique similaire dans les stades précoces (figure 10) et d'une période symptomatique sévère, accompagnée parfois d'hémorragies diverses, certains patients, dont la proportion est variable selon les filovirus (Cf Chapitre I-2), survivent à la maladie et deviennent convalescents. Cependant, les mécanismes par lesquels s'opère le contrôle de la charge virale ne sont pas encore connus.

3. L'adaptation virale dans les modèles d'infection de rongeurs.

Les rongeurs (cobayes, hamsters, lapins, souris) sont peu sensibles aux souches primaires (provenant de patients ou de PNH) de filovirus, ces derniers ayant besoin de plusieurs 'passages' à l'intérieur de l'hôte pour s'adapter et induire une pathologie et une mortalité similaires à celles observées chez les PNH et les humains.

L'inoculation de cobaye par des préparations de virus de Marburg ou Ebo-Z provenant de patients ou de PNH n'induit que peu ou pas de mortalité (0-20% selon les études) et de la fièvre uniquement dans 50% des cas. Le virus se réplique uniquement dans les macrophages

du foie et parfois de la rate et les lésions sont modérées (127, 156, 181, 182). Lors de l'infection par Ebo-Z, des granulomes sont observés avec la souche sauvage et la rate et les ganglions lymphatiques présentent déjà certaines altérations (127). Dès le 2^{ème} 'passage', les granulomes disparaissent du foie tandis que le nombre de macrophages infectés augmente. Des lésions apparaissent dans la rate, les ganglions, les reins et les glandes surrénales. La virémie est détectable et la mortalité atteint 25-40%. Au cours des 'passages' suivants, la charge virale, la pathologie et la mortalité augmentent régulièrement pour atteindre 80-100% entre les 5^{ème} et 8^{ème} 'passage' (127, 156). De plus, le tropisme viral évolue au cours des 'passages'. Des hépatocytes infectés apparaissent au 4^{ème} 'passage', des adrénalocytes au 5^{ème} ou 6^{ème} et le virus est détecté dans les cellules endothéliales et les fibroblastes au 8^{ème} 'passage' (127). Les lésions des différents organes, les modifications histopathologiques, mais aussi les changements de la formule sanguine, les destructions lymphocytaires, et les dysfonctionnements hépatiques et rénaux induits par le virus 'adapté' sont similaires à ceux observés chez les PNH ou l'homme (183), ce qui fait du cobaye un modèle expérimental précieux.

Contrairement à la souris nouveau-né qui succombe à l'infection par la souche primaire d'Ebo-Z (184), la souris BALB/c adulte est insensible à cette souche, mais au fur et à mesure des passages, le tropisme viral s'élargit (photo 12) et le virus induit une FHV sévère d'une mortalité de 100% en 7 jours. La FHV induite chez la souris présente les caractéristiques rencontrées dans les autres modèles, à l'exception des dépôts de fibrine qui sont rares. De façon surprenante, seule l'inoculation par voie intra-péritonéale, et non sous-cutanée ou intra-musculaire, permet l'infection des souris avec de faibles doses virales (157).

Les modifications virales s'opérant au cours des passages et conférant la virulence chez les rongeurs sont encore inconnues. Le séquençage du gène de la GP du virus adapté pour la souris n'a mis en évidence que 3 mutations silencieuses (157). De même, le séquençage du génome du virus adapté pour le cobaye n'a montré qu'un seul changement d'acide aminé conservatif dans les gènes de la NP et L et une addition dans le site d'édition de la GP ; ces mutations ne semblant pas impliquées dans l'augmentation de la pathogénicité. Par contre, le gène de la VP24 est modifié dans 2 souches adaptées différentes, 3 changements d'acide aminé non conservatifs ont ainsi été détectés – altérant même la mobilité

électrophorétique de la protéine – dans l'une ; et 2 changements d'acide aminé dans l'autre (185). La VP24 étant une protéine associée à la membrane, il est possible que des variations structurales de cette protéine puisse modifier la capacité du virus à infecter la ou les cellule(s) cible(s), permettant ainsi l'élargissement du tropisme viral.

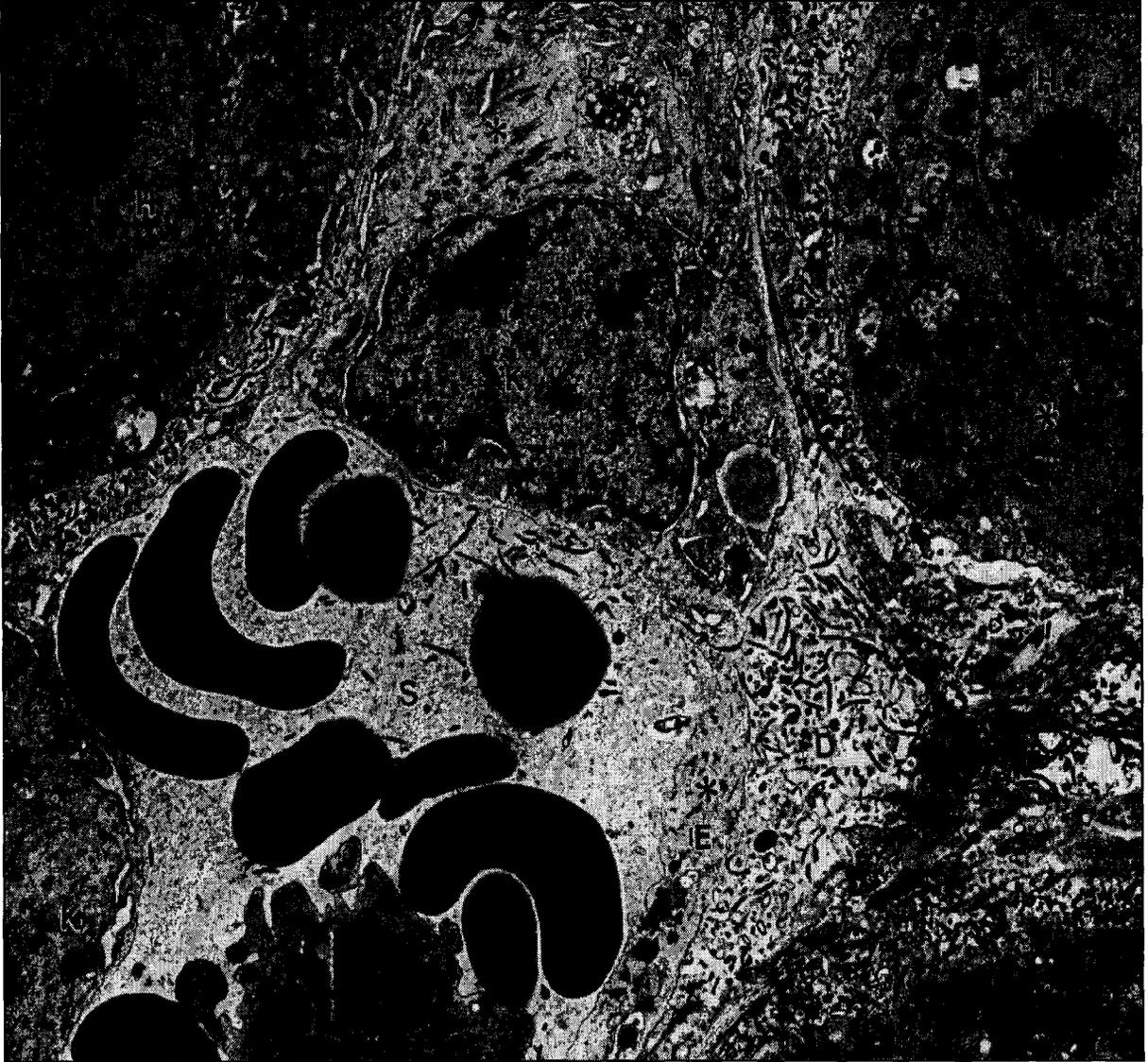


Photo 12. Détection du virus Ebo-Z adapté dans une coupe hépatique de souris infectée. Les inclusions virales (*) sont présentes dans les hépatocytes (H), les cellules de Kupffer (K), et dans les cellules endothéliales des capillaires (E). Des particules virales bourgeonnent des cellules de Kupffer dans le capillaire, et les espaces de Disse (D) contiennent de nombreux virions. D'après M. Bray *et al*, réf 157

IV. LA REPOSE IMMUNE AU COURS DES INFECTIONS FILOVIRALES.

1. Infection fatale et effondrement du système immunitaire.

Les données concernant les réponses immunes induites au cours des infections par les filovirus sont rares et limitées à quelques données histopathologiques ou paramètres immunitaires, tant dans les modèles expérimentaux que chez l'homme. Néanmoins, aucune évidence de réponse immune effectrice n'est observée lors des infections fatales par les filovirus (71, 156).

Une absence de réponse inflammatoire dans les tissus infectés.

Les FHV à filovirus sont caractérisées sur le plan histopathologique par une absence d'infiltration de cellules inflammatoires et de lymphocytes dans les tissus infectés. L'immunité non-spécifique ne semble pas se mettre en place dans les modèles d'infection fatale, en dépit de la neutrophilie persistante caractérisant les FHV à filovirus. En effet, aucun afflux de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles) ou de cellules tueuses naturelles (NK) n'est observé autour des cellules infectées dans les modèles primates d'infection par les filovirus, démontrant ainsi l'absence de réponse inflammatoire locale (36, 37, 146, 148). De même, l'absence d'infiltration lymphocytaire dans les sites de réplication virale suggère que l'immunité cellulaire spécifique ne se met pas non plus en place au cours de l'infection fatale. Des infiltrations modérées de macrophages alvéolaires et de leucocytes sont parfois observées dans les poumons de singes ou de cobayes infectés par le virus de Marburg ou Ebo-Z par voie aérosol, au contraire des infections par voie parentérale (37, 186). L'infiltration de quelques cellules inflammatoires a été notée dans le foie et les intestins d'un chimpanzé infecté par Ebo-CI (21). Enfin, les quelques données histopathologiques obtenues chez l'homme infecté par Ebo-S ont mis en évidence quelques lymphocytes dans les tissus infectés, mais aucune réaction inflammatoire ne semble se produire (11), à l'instar des observations réalisées *post mortem* chez des patients infectés par Ebo-Z (155).

Une suppression de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique en réponse aux mitogènes.

La propagation *in vitro* du virus de Marburg dans des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) est accompagnée d'une suppression considérable de la prolifération de ces cellules en réponse aux mitogènes comme le lipopolysaccharide (LPS) ou la concanavaline A (ConA) dès 4 heures après l'infection (179). De même, au cours de l'infection létale du cobaye ou de PNH par le virus de Marburg ou Ebo-Z, une diminution substantielle des indices de prolifération lymphocytaire en réponse aux mitogènes est notée (chez le babouin, l'indice est 5 fois inférieur à celui obtenu avant l'infection). La suppression de la prolifération lymphocytaire apparaît chez le cobaye et le singe rhésus 5-7 jours après l'infection par le virus de Marburg (3-4 jours avant le décès) (187, 188).

Pendant ce temps, de grandes fluctuations de l'activité des cellules NK sont enregistrées. Chez le babouin infecté par le virus de Marburg, l'activité des cellules NK augmente de façon significative 5-7 jours après l'infection (par rapport à celles observées avant l'infection) pour devenir virtuellement absente dans les stades terminaux de la maladie (189). Par contre, chez le cobaye et le singe rhésus, l'activité NK augmente tout au long de la maladie (187, 188, 190).

Ainsi, les infections fatales par les filovirus sont caractérisées par une suppression de la réponse inflammatoire tissulaire et une perturbation de l'activation lymphocytaire et NK.

Une activation cellulaire non-spécifique potentiellement pathogène.

Lors de l'infection de cobayes et de PNH par le virus de Marburg ou Ebo-Z, une augmentation de la prolifération lymphocytaire spontanée est observée (187, 188, 190). Par ailleurs, le rapport CD4/CD8 chute au cours de l'infection du singe rhésus par le virus de Marburg, passant de 1,5 avant l'infection à 0,75 dans les stades terminaux (190). Etant donné la lymphopénie caractérisant les infections fatales, cette modification du rapport CD4/CD8 peut résulter d'une délétion préférentielle des lymphocytes CD4+ et/ou d'une expansion de lymphocytes CD8+.

Par ailleurs, de grandes concentrations d'IFN γ et de TNF α apparaissent dans le sérum de cobayes ou de PNH au cours des infections fatales par le virus de Marburg ou Ebo-Z (187,

188, 189). De même, des taux plus élevés d'IFN γ , de TNF α , d'IL-2 et d'IL-10 ont été détectés dans les sérums de patients fatalement infectés par le virus Ebo-Z par rapport aux survivants (191). Ainsi, il semble qu'une activation cellulaire non-spécifique soit induite lors des infections par les filovirus.

L'infection *in vitro* de monocytes/macrophages humains par le virus de Marburg ou Ebo-Z conduit à une activation cellulaire, suggérée par la sécrétion de TNF α (142, 143, 179). Il est probable que l'infection extensive des macrophages au cours des infections fatales induise la sécrétion de TNF α (et sans doute d'autres cytokines) et probablement l'expression de marqueurs de surface par les cellules infectées, tous ces facteurs pouvant ensuite modifier l'état d'activation de lymphocytes voisins qui peuvent à leur tour produire certaines cytokines retrouvées dans les sérums de patients, comme l'IL-2 et l'IFN γ .

Cette activation cellulaire non-spécifique semble être impliquée dans la pathogenèse des FHV à filovirus. En effet, comme cela a été évoqué précédemment (Chapitre III-2, p74-76), la sécrétion par les macrophages infectés de certains médiateurs peut augmenter la perméabilité de l'endothélium et favoriser l'apparition de la CIVD. De plus, des expériences de neutralisation de cytokines ont mis en évidence un rôle pathogène des cytokines monocytaires et lymphocytaires. En effet, la neutralisation de l'IL-1 par la desferrioxamine (DFO) – qui est connue pour être un antagoniste de l'IL-1 et du TNF α – et/ou du TNF α par des Ac au cours de l'infection de cobayes par le virus de Marburg permet à 50% des animaux de survivre (100% de mortalité chez les témoins infectés) et retarde de 2 jours le décès des autres animaux (192, 193). De même, des cobayes infectés par le virus de Marburg et recevant de l'IL-2 ou ayant été traités à la diuciphone (inducteur de sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes) présentent des taux plus élevés d'IFN γ et de TNF α et succombent 36h plus tôt que les cobayes témoins (infectés sans IL-2) (187, 194).

Une réponse humorale inexistante.

La plupart des PNH infectés par le virus de Marburg ou Ebo-Z meurent sans qu'une réponse IgM ou IgG spécifique n'apparaisse (20, 188). Aucun Ac spécifique du virus n'a été détecté dans les sérums de singes décédés au cours d'épidémies de FHV à Ebo-R aux Etats-Unis et aux Philippines (34, 195). De même, 3 chimpanzés ayant succombé à l'infection par

Ebo-CI ne présentaient pas d'Ac spécifiques au moment de leur mort (33). Il semble même qu'en plus du délai court entre le premier contact avec le virus et le décès, l'infection par le virus Ebo-Z supprime la réponse humorale. En effet, l'infection par Ebo-Z de singes ayant survécu à une infection préalable par le virus Ebo-S ou Ebo-R et présentant des titres élevés en IgG spécifiques induit une diminution drastique du taux sérique de ces Ac (20). Au cours de l'infection de l'homme par le virus Ebo-Z, des IgM ou IgG spécifiques des Ag viraux ne sont détectées en faibles quantités dans le sérum des patients le jour de leur mort que dans moins de la moitié des cas et le plus souvent chez les patients présentant une longue phase symptomatique (49).

Implication de certaines protéines virales dans l'effondrement du système immunitaire.

Les infections fatales par les filovirus s'accompagnent donc d'un effondrement total du système immunitaire, caractérisé non seulement par une suppression des réponses cellulaires, une absence de réponse humorale et une activation cellulaire non-spécifique, mais également par une destruction et déplétion massives des lymphocytes T et B pendant la phase aiguë de la maladie, comme cela a été évoqué précédemment (Chapitre III-2, p63).

Certaines protéines virales pourraient être impliquées dans ces désordres. La fixation de la GPs à la surface de neutrophiles humains via le CD16b (Fc γ RIIIb) a récemment été mise en évidence. Les auteurs suggèrent que la fixation de la GPs induirait une inhibition de l'activation des neutrophiles, ce qui pourrait expliquer l'absence d'infiltration de ces granulocytes dans les tissus infectés en dehors de la neutrophilie persistante (126). Cependant, cette étude est relativement controversée. Les fonctions biologiques de la GP₁ soluble sont encore inconnues à ce jour mais il est probable, étant donné le rôle de la GP₁ dans la fixation du virus à la surface des cellules cibles comme les macrophages et les cellules endothéliales, qu'elle puisse interférer avec les fonctions monocytaires et endothéliales si elle conserve sa capacité de fixation. Enfin, la GP₂ des virus de Marburg et Ebola (y compris Reston (86)) contient une séquence homologue au motif immunosuppresseur des glycoprotéines de certains rétrovirus oncogènes (115, 116) (cf chapitre II-5, p50). Des peptides synthétiques simulant cette séquence inhibent la prolifération lymphocytaire en réponse à des mitogènes et l'activité

des cellules NK, suggérant que ce motif pourrait être impliqué dans les altérations de l'activation lymphocytaire (196).

Implication du tropisme des filovirus dans la réponse immune défectueuse.

Le tropisme privilégié et précoce des filovirus pour les monocytes/macrophages a sans doute une grande implication dans la pathogenèse et l'effondrement du système immunitaire. En effet, les monocytes/macrophages sont des cellules très importantes non seulement dans la réponse immune innée (phagocytose de particules virales, destruction des cellules infectées, sécrétion de médiateurs proinflammatoires), mais également dans la présentation d'Ag aux lymphocytes naïfs et dans la régulation de la réponse immune. De même, d'autres cellules présentatrices d'Ag (CPA) comme les cellules dendritiques sont également infectées par les filovirus à l'intérieur des organes lymphoïdes et sont détruites précocement au cours de l'infection. Des altérations morphologiques de ces cellules sont observées dans les modèles expérimentaux 2 jours après l'infection, et le nombre de cellules infectées et détruites augmente par la suite jusqu'au décès (146, 156). Il est probable que l'infection et la réplication virale altèrent les fonctions de phagocytose et de présentation d'Ag des macrophages et des CPA professionnelles, cette perturbation des processus complexes d'activation et de reconnaissance antigénique pouvant expliquer l'absence de réponse immune cellulaire et humorale spécifiques au cours des infections fatales par les filovirus. De même, il est possible que l'infection massive des macrophages soit impliquée dans la suppression de l'infiltration de cellules inflammatoires dans les tissus infectés – un processus important dans les défenses précoces non-spécifiques de l'hôte – par l'intermédiaire de médiateurs solubles, comme par exemple l'IL-10, retrouvée dans les sérums de patients mortellement infectés par Ebo-Z (191).

De même, la détection de la lymphopénie du sang circulant et de la déplétion et destruction des lymphocytes dans les organes lymphoïdes coïncide avec l'apparition de la virémie et de macrophages infectés dans ces organes, suggérant que l'infection des macrophages par les filovirus est responsable de ces phénomènes. L'augmentation de la prolifération lymphocytaire spontanée observée dans les modèles expérimentaux et la disparition des lymphocytes pourraient résulter de l'effet sur les lymphocytes de marqueurs de

surface, de médiateurs solubles et/ou de protéines virales exprimés et/ou sécrétés par les macrophages infectés par les filovirus.

Bien que les cellules endothéliales ne soient pas des CPA 'professionnelles', ces cellules, par l'expression inductible de molécules de costimulation, d'adhésion et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), la sécrétion de cytokines proinflammatoires et régulatrices, et leurs interactions avec les cellules du système immunitaire, participent à l'induction et la régulation de la réponse immune innée et acquise (197-201). L'ARN double-brin (ARNdb) – généré pendant la réplication virale et la transcription, mais considéré comme 'non-soi' par la cellule (202) – est un activateur majeur de ces défenses non-spécifiques, induisant l'expression par les cellules endothéliales de gènes codant pour des molécules d'adhésion (intercellular adhesion molecule- (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule- (VCAM)-1, sélectine-E), du CMH-I, et de l'IL-6 (203). D'autre part, l'ARNdb induit la synthèse et active 2 protéines antivirales dans la cellule, la 2'-5'-oligoadénylate synthétase (2'-5'-(A)_N) et la protéine-kinase activée par l'ARNdb (PKR), qui inhibe la synthèse des protéines ; et par ailleurs l'apoptose de la cellule infectée, ces 2 mécanismes de défense permettant de limiter l'extension de l'infection aux cellules voisines (204, 205). Cependant, l'absence d'accumulation de cellules inflammatoires autour des foyers de réplication virale de l'endothélium et l'intensité de la réplication virale dans l'endothélium dans les stades terminaux suggèrent que ces fonctions sont altérées au cours de l'infection par les filovirus. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'infection de cellules endothéliales par le virus Ebo-Z inhibe de nombreuses fonctions de ces cellules. Ainsi, l'induction de nombreux gènes immunorégulateurs en réponse aux interférons, mais non à l'IL-1 β , est supprimée au cours de l'infection des cellules endothéliales (206). Non seulement la synthèse d'aucun gène n'est observée en réponse à l'ARNdb filoviral au cours de l'infection par Ebo-Z de cellules endothéliales, mais l'infection de ces dernières inhibe de surcroît l'induction de la transcription de nombreux gènes – IL-6, ICAM-1, CMH-I, PKR, 2'-5'-(A)_N, IFN-regulatory factor-1 – en réponse à de l'ARNdb synthétique (207). Ainsi, non seulement le virus Ebo-Z neutralise les capacités des cellules endothéliales à contrôler et à limiter l'extension de l'infection, mais il supprime également les fonctions inflammatoires et immunorégulatrices de ces cellules, ce

qui contribue sans aucun doute à la pathogénèse et à l'absence de réponse inflammatoire au cours des infections fatales par les filovirus.

Ainsi, le tropisme des filovirus pour les monocytes/macrophages, d'autres CPA et les cellules endothéliales, permet non seulement une dissémination virale systémique rapide, mais semble également protéger le virus du système immunitaire par de nombreux mécanismes. Cette 'stratégie d'évasion' est illustrée non seulement par la suppression de la réponse inflammatoire non-spécifique et l'absence d'induction d'une réponse cellulaire et humorale spécifiques, mais également par la destruction totale d'organes lymphoïdes et de cellules immunitaires comme les lymphocytes T et B, mais aussi les macrophages et les CPA infectés. Cette neutralisation du système immunitaire permet aux filovirus de se répliquer sans entrave et de façon extensive, mais semble également être impliquée, par la libération de médiateurs solubles, dans certaines modifications pathologiques et le choc terminal.

2. La réponse immune au cours de l'infection non-fatale par les filovirus.

Une réaction inflammatoire granulomateuse est associée au contrôle des infections filovirales chez le cobaye.

L'étude des paramètres histopathologiques au cours de l'adaptation virale dans le modèle cobaye a confirmé l'absence de réponse inflammatoire autour des cellules infectées lors des infections fatales, mais a surtout démontré le rôle probablement important de cette réponse dans le contrôle de l'infection par la souche primaire. Ainsi, au cours de l'infection du cobaye par une souche d'Ebo-Z provenant d'un patient ou d'un PNH, le virus se réplique uniquement dans les macrophages – ce tropisme limité contribuant sans doute à sa moindre virulence – cependant que des foyers granulomateux, composés de monocytes, macrophages et neutrophiles se forment autour de certaines cellules infectées dans le foie. Les virions contenus dans le granulome présentent une morphologie anormale tandis que les monocytes/macrophages composant le granulome ne semblent pas être infectés. D'autres cellules macrophagiques infectées, minoritaires, sont situées à la surface des sinus et ne sont entourées d'aucune cellule inflammatoire. Lors des passages, les foyers granulomateux ne

sont plus observés tandis que la réplication virale devient importante et détectable dans la circulation. Plus aucune réponse inflammatoire n'est alors détectée au cours de l'infection (127). De même, une inflammation périportale et une prolifération de cellules de Kupffer ont été observées chez des cobayes inoculés avec du sang de patients infectés par le virus de Marburg, tandis que la prolifération cellulaire disparaît au cours des passages (181, 182). Il semble que l'inoculum viral provenant de patients ou de PNH contiennent 2 types de virions se comportant différemment chez le cobaye. Ainsi, tandis que la grande majorité des virions induit une réponse inflammatoire locale permettant la destruction des cellules infectées et l'absence de libération de nouveaux virions, la minorité de virions se répliquant dans les macrophages sans induire de réaction inflammatoire n'est pas détruite et constitue donc l'essentiel de l'inoculum utilisé pour le 2^{ème} passage. Cette sélection explique l'absence de formation de granulome dès ce passage et l'augmentation substantielle de charge virale observée à ce moment, mais suggère également une suppression de la réponse inflammatoire par ces virions, ce qui pourrait expliquer l'absence d'une telle réponse dans les tissus de l'hôte sensible (127). Ces données suggèrent que la réponse inflammatoire non-spécifique précoce pourrait être importante dans le contrôle des infections filovirales. Par ailleurs, l'infection asymptomatique des rongeurs par les souches filovirales primaires suggère que certains de ces mammifères pourraient potentiellement servir de réservoir naturel pour les filovirus.

Une réponse humorale spécifique importante et durable.

Les PNH et les patients ayant guéri spontanément d'une FHV à filovirus présentent après l'infection des titres très élevés et persistant en Ac spécifiques. Des IgG spécifiques apparaissent ainsi entre le 14^{ème} et le 21^{ème} jour après l'infection – de façon concomitante à la chute de la virémie – chez les singes vervets, cynomolgus et rhésus ayant survécu à l'infection par le virus Ebo-S ou Ebo-R et les titres élevés de ces Ac persistent ensuite quelques mois dans la circulation des singes (20, 56). Des réactions croisées sont observées entre les sous-types de virus Ebola, particulièrement entre les Ac spécifiques d'Ebo-S et les Ag d'Ebo-R. Cette étude a également montré que la NP, et non la GP, induisait ces réactions croisées (20).

De même, les patients ayant survécu à l'infection par le virus de Marburg, Ebo-Z, et Ebo-CI présentent des titres élevés en Ac spécifiques (15, 49, 55, 153). Une patiente infectée

par le virus Ebo-CI possédait des IgM spécifiques 3 jours après l'apparition des symptômes (11 jours après l'infection), la réponse IgM étant maximale le 7^{ème} jour. Des titres élevés d'IgG spécifiques d'Ebo-CI apparaissent entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour, de façon concomitante à la disparition de la virémie (129). De même au cours de l'infection de l'homme par le virus Ebo-Z, les IgM spécifiques sont détectées entre 2 et 9 jours après l'apparition des symptômes, présentent un titre maximal 18 jours après et disparaissent dans les 3 mois suivant. Les IgG spécifiques apparaissent chez ces patients la 2^{ème} semaine de la maladie, là encore de manière parallèle à la chute de la virémie, les titres atteignant très rapidement un plateau élevé (49, 55).

Bien que les survivants des FHV à filovirus subissent, à une moindre échelle, certaines altérations de la réponse immune observées au cours de l'infection fatale comme la lymphopénie et la neutrophilie (129, 139) et présentent une charge virale initiale élevée, il semble que ces altérations n'empêchent pas l'induction rapide d'une réponse lymphocytaire B spécifique efficace, ce qui sous-tend l'activation préalable de lymphocytes T helper (Th) indispensables à la commutation isotypique, l'activation et la différenciation des lymphocytes B. Il semble donc que les survivants des FHV à filovirus développent une immunité efficace, probablement non-spécifique dans un premier temps, si l'on en croit l'importante réaction inflammatoire observée dans le modèle cobaye non-pathogène (127), puis spécifique par la suite, ce qui se traduit par la réponse humorale rapide et forte observée au cours des infections non-létales par les filovirus.

V. PERSPECTIVES VACCINALES ET THERAPEUTIQUES.

La présence de titres élevés en Ac anti-filovirus chez les PNH et les humains ayant survécu à une FHV a encouragé les études vaccinales chez l'animal et les essais de sérothérapies, y compris chez l'homme. De même, quelques essais thérapeutiques, utilisant différentes molécules, ont été réalisés chez les PNH infectés par des filovirus. Bien que très contrastés, ces résultats sont néanmoins très prometteurs dans ces 2 approches de lutte contre les FHV à filovirus.

1. De nombreuses études vaccinales dans les modèles expérimentaux.

Protection acquise après une première infection filovirale.

Certains PNH ayant survécu à une infection filovirale et possédant des Ac spécifiques ont été réinoculés par le même virus ou un autre sous-type dans l'espoir que l'immunité acquise lors de la première infection les protège de la seconde. Ainsi, 5 singes cynomolgus ayant survécu à des infections par Ebo-R (4) et Ebo-S (1) ont été réinfectés par Ebo-Z par voie intra-péritonéale. Le singe préalablement infecté par Ebo-S n'a développé ni maladie ni virémie, ainsi qu'un autre immun pour Ebo-R. Il est intéressant de noter qu'aucun des survivants à la 2^{ème} infection n'a développé par la suite d'Ac spécifiques d'Ebo-Z, suggérant un contrôle précoce de l'infection par une réponse immune cellulaire et/ou les Ac induits par la première infection et encore présents (20). De même, lors d'une épidémie de FHV à virus Ebo-R chez des singes cynomolgus, la mortalité était significativement plus faible chez les singes possédant déjà au moment de l'infection des Ac spécifiques comparativement aux singes séronégatifs (208).

L'infection de souris par une souche non-adaptée d'Ebo-Z confère une protection contre une infection subséquente par la souche adaptée normalement létale, illustrée par l'absence de symptôme (157). De même, l'infection de souris par la souche adaptée par voie sous-cutanée, intra-dermique ou intra-musculaire – voie d'inoculation n'induisant que rarement une pathologie chez la souris – protège contre une infection par voie intra-péritonéale par Ebo-Z. Par contre, l'infection des souris par le virus de Marburg – non

pathogène, car non-adapté – ne confère pas d'immunité croisée contre Ebo-Z, ni l'immunisation par la souche d'Ebo-Z adaptée, mais inactivée par irradiation (157).

Immunisation par des Ag ou des préparations virales inactivées.

Il est probable que d'autres paramètres immunitaires que la réponse humorale soient nécessaires au contrôle de l'infection. En effet, l'issue d'une infection par le virus de Marburg chez des cobayes et PNH préalablement immunisés par le virus de Marburg inactivé n'est pas corrélée au titre d'IgG spécifiques présent au moment de l'infection (188, 190, 209). Par contre, des cobayes et des babouins immunisés par le virus Ebola inactivé ont supporté par la suite une infection normalement létale (210, 211). Cependant, la dose d'Ag utilisée et le nombre d'immunisations semblent importants dans la protection du cobaye, le nombre d'animaux survivant à l'infection étant corrélé à la dose utilisée (8 survivants/10 avec 2 X 50 µg) (212). De même, plusieurs immunisations avec de grandes quantités de protéines virales (7 mg par injection) sont nécessaires pour protéger le babouin (211), et l'utilisation de faibles doses antigéniques chez le singe rhésus n'induit pas de protection contre une infection par le virus Ebola (213). Deux-tiers des cobayes vaccinés par de la NP purifiée deviennent immuns à une infection par Ebo-Z, tandis que la VP40 n'induit pas de protection (214, 215).

L'étude de l'immunité induite par des Ag de virus de Marburg inactivés chez le cobaye et le singe a montré une activation de l'immunité non-spécifique, illustrée par l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages, de l'activation des cellules NK et de la production de TNF α et d'IFN γ , le pic d'activation se situant entre 3 et 5 jours après l'immunisation. Des Ac spécifiques apparaissent 2 semaines après et une réponse cellulaire mémoire est détectée en réponse à la stimulation *in vitro* par les Ag viraux. Une 2^{ème} immunisation induit une augmentation des titres d'Ac tandis que l'étude du rapport CD4/CD8 indique une expansion des lymphocytes CD4+ les 2 premières semaines et des lymphocytes CD8+ entre le 25^{ème} et le 32^{ème} jour après l'immunisation. Contrairement aux observations réalisées au cours des infections, aucune baisse de l'activation par les mitogènes n'est détectée dans ces modèles vaccinaux (188, 190, 209, 212).

L'utilisation de vecteurs vivants et les vaccins à ADN.

La production d'Ag à partir de culture de filovirus est très délicate puisque nécessitant des structures particulières. De plus, l'utilisation d'Ag inactivés n'étant pas dénuée de risques, de nombreuses études se sont intéressées à l'immunisation par des préparations permettant l'expression du gène codant pour une protéine filovirale dans l'organisme, utilisant comme vecteur la vaccine ou, plus simplement, un plasmide. Ces approches sont connues pour induire des réponses immunes efficaces par l'expression intracellulaire de la protéine d'intérêt, suppriment le besoin de production massive d'Ag viraux (donc relativement bon marché), et présentent l'avantage d'une bonne inocuité, considérant que l'inoculation d'un seul gène viral est sans risque pathogène.

Différentes souches recombinantes de vaccine contenant un des gènes du virus Ebola – NP, VP35, VP30, GP, GPs, VP40 ou VP24 – ont été testées pour leur capacité à induire, par voie sous-cutanée, une protection chez le cobaye contre une infection par le virus Ebola. Tandis que les souches exprimant la NP, VP40, VP35, VP30, VP24 ou la GPs ne confèrent aucune protection contre une inoculation létale 1 mois plus tard, la moitié des animaux immunisés avec la souche codant pour la GP membranaire ont survécu (189, 216). Par contre, le même protocole vaccinal, mais utilisant la GP membranaire du virus de Marburg, n'a pas protégé les cobayes en dépit de la présence d'Ac spécifiques au moment de l'infection par le virus de Marburg (217). Cependant, une protection a été obtenue chez des cobayes avec une souche recombinante de baculovirus exprimant la GP membranaire du virus de Marburg, et non avec celle exprimant la NP (218).

L'inoculation répétée (1x 0,5 µg + 3x 1,5 µg) de plasmides exprimant la GP membranaire ou la NP du virus Ebo-Z à des souris les protège toutes de l'infection par une souche adaptée d'Ebo-Z, létale pour elles (157, 219). Cette immunisation induit non seulement des titres d'Ac élevés, mais également une réponse lymphocytaire T cytotoxique, ce qui suggère là encore que l'induction d'une immunité à médiation humorale et cellulaire est nécessaire au contrôle de la virémie (219). Une étude récente utilisant des plasmides codant pour la GP, la GPs ou la NP a montré l'induction chez la souris d'une forte réponse cytotoxique pour la GP et la GPs, et de faibles taux d'Ac ; tandis que la NP induisait de fort titres d'IgG spécifiques mais aucune réponse cellulaire spécifique n'était détectée *in vitro*. Des

cobayes inoculés avec ces plasmides et infectés un mois après par le virus Ebo-Z sont protégés par chacune des 3 préparations, tandis que seul les animaux immunisés par les plasmides exprimant la GP ou la GPs survivent à une infection 4 mois après (220). Il semble dans ce modèle que la réponse humorale ne soit pas suffisante et qu'une réponse cytotoxique soit nécessaire à la protection, bien qu'elle ne soit pas détectée avec la NP. En effet, les IgG spécifiques de la NP et de la GP, lorsqu'ils apparaissent, ne confèrent pas de protection lors d'un transfert passif chez le cobaye et n'inhibent pas la réplication du virus Ebo-Z *in vitro* (220).

L'immunopathogénèse et la vaccination.

Certains protocoles vaccinaux contre le virus de Marburg n'ont non seulement induit aucune protection contre une infection homologue létale, mais ont même diminué le temps de survie des animaux immunisés par rapport aux contrôles infectés 'naïfs'.

Cette immunopathogénèse se manifeste chez le cobaye par une production prononcée de TNF α et d'IFN γ ainsi qu'une plus forte prolifération lymphocytaire spontanée comparativement aux cobayes 'naïfs'. Les animaux immunisés ayant survécu n'ont présenté des taux significatifs de TNF α et d'IFN γ que les 3 premiers jours suivant l'infection, et la virémie était détectable uniquement durant les premières 24h (209). De même, tandis que des cobayes inoculés 1 seule fois par de la vaccine exprimant la GP du virus de Marburg n'ont, en dépit de la présence d'IgG spécifiques, survécu à une infection subséquente ; les cobayes inoculés 2 fois avant l'infection ont présenté les temps de survie les plus courts (217). Des résultats similaires ont été obtenus chez le singe rhésus. En effet, les singes immunisés par le virus de Marburg inactivé ont présenté la même mortalité que les singes 'naïfs' (50%), et les singes immunisés ayant succombé à la maladie ont présenté des taux croissants de TNF α et d'IFN γ , plus élevés dans les stades terminaux que chez les singes 'naïfs' mortellement infectés, et un décès plus rapide que ces derniers. Par contre, l'augmentation des concentrations de ces 2 cytokines est accompagnée d'une activité NK et n'est détectée que les 2 ou 3 premiers jours suivant l'infection chez les singes immunisés survivants (188, 190).

Ainsi, l'implication probable de l'immunopathogénèse dans la gravité des FHV à filovirus, soupçonnée lors des études de neutralisation de cytokines (cf chapitre IV-1, p82),

semble être également observée lors de vaccinations, ce qui est à prendre en considération pour toute étude immunoprophylactique ultérieure.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une immunisation doit nécessairement induire, pour être protectrice et empêcher l'apparition de la virémie, une réponse immune mémoire à médiation humorale et cellulaire comprenant des lymphocytes Th CD4+ et cytotoxiques (CTL) CD8+. Les cibles virales permettant une immunité effectrice semblent être, quant à elles, la GP membranaire, la NP et dans une moindre mesure, la GPs. Cependant, en dépit de certains risques d'immunopathogénicité, ces études montrent clairement qu'une approche immunoprophylactique des FHV à filovirus est envisageable. De plus, la stabilité génétique des filovirus est un précieux avantage et compense sans doute l'absence ou les faibles protections croisées observées entre les filovirus.

2. Les perspectives thérapeutiques.

L'immunothérapie, des résultats mitigés.

Les premières tentatives de sérothérapie ont été entreprises en 1977 par transfert passif de plasma de convalescents. Cependant, ces plasmas contenaient des titres d'IgG spécifiques trop faibles et de plus, ces Ac n'étaient que faiblement neutralisants *in vitro*, limitant ainsi leur efficacité. Par la suite, des sérums hyper-immuns ont été produits chez des animaux insensibles aux filovirus (chèvre, mouton, cheval), sélectionnés sur la base de leur propriétés neutralisantes chez le cobaye, et testés dans de nombreux modèles, y compris dans quelques cas chez l'homme.

Des sérums hyper-immuns obtenus chez la chèvre, dont l'activité anti-virale est contenue dans la fraction IgG₂ (correspondant aux IgG₃ chez l'homme), ont ainsi été testés chez le cobaye. Le transfert passif de ces Ac protège ces animaux de l'infection par Ebo-Z lorsqu'il est réalisé entre 1 jour avant et 2-3 jours après l'infection (221). Ce sérum a ensuite été testé chez des volontaires afin d'évaluer son innocuité et sa tolérance, qui semblent bonnes, et a été utilisé avec un apparent succès chez un patient accidentellement infecté (221). Des Ac spécifiques du virus de Marburg protègent 80% des cobayes infectés par ce virus (222). De

même, un sérum hyper-immun de cheval protège des babouins d'une infection létale par de faibles doses de virus Ebo-Z, et s'il est administré dans l'heure suivant l'infection, aucune virémie n'apparaît ; tandis que le sérum perd rapidement son efficacité si l'injection est retardée (211, 221). Par contre, ce même sérum hyper-immun a donné des résultats plus discutables chez la souris et le singe cynomolgus. En effet, si les cobayes recevant le sérum avant l'apparition de la virémie survivent, les souris ne sont jamais complètement protégées et la plupart des singes meurent quelque soit le schéma d'inoculation, malgré l'apparition plus tardive de la virémie et des symptômes (223, 224). Ces résultats discordants peuvent provenir de la dose de virus utilisée pour l'infection, beaucoup plus élevée dans ce dernier cas. Lors de l'épidémie de FHV à virus Ebo-Z de Kikwit (RDC, 1995), 8 patients en phase symptomatique ont reçu une transfusion de sang total, contenant des Ac spécifiques mais pas d'Ag, provenant de convalescents. Bien que 7 d'entre eux aient survécu en dépit d'une mortalité habituelle de 80%, l'utilisation de sang total et non de plasma rend difficile l'interprétation des résultats, ces derniers n'indiquant d'ailleurs aucun effet significatif de la transfusion une fois les données relativisées en fonction de l'âge des patients et de la probabilité de survie au moment où la thérapie a été initiée (225, 226). Enfin, la production d'Ac monoclonaux (AcMc) humains spécifiques des filovirus par biologie moléculaire représente une approche prometteuse dans le domaine de la sérothérapie (227, 228).

Des propriétés d'inhibition de la réplication *in vitro* des filovirus ayant été attribuées à l'IFN α_{2b} , des essais d'immunothérapies ont été réalisés en injectant de l'IFN α_{2b} à des cobayes et des singes cynomolgus infectés par les virus de Marburg et Ebo-Z, respectivement, mais il semble que l'action de cette molécule ne se limite à retarder le décès sans modifier la mortalité, y compris lorsque cette thérapie est entreprise simultanément à une sérothérapie (192, 224).

Ainsi, l'immunothérapie des FHV à filovirus, bien que donnant quelques résultats prometteurs dans le domaine de la sérothérapie, ne semble pas très efficace, ce qui peut être attribué au fait que les filovirus nécessitent pour leur contrôle, comme cela a été observé lors des essais vaccinaux, une réponse immune à médiation humorale et cellulaire. Le transfert passif d'Ac spécifiques ne paraît en effet efficace que si les Ac présentent des titres de

neutralisation élevés et sont injectés lorsque la charge virale est minimale ; ces IgG spécifiques ne parvenant pas à contrôler une virémie déjà installée.

Les molécules anti-virales, des résultats prometteurs.

Récemment, des analogues de nucléosides inhibiteurs de la *S*-adénylhomocystéine hydrolase se sont avérés actifs *in vitro* contre le virus Ebo-S et Ebo-Z. De plus, des souris infectées par une souche adaptée de virus Ebo-Z et traitées par la 3-déazaadénosine carbocyclique (un de ces analogues) dans les 24h suivant l'infection survivent toutes à la maladie, la mortalité s'élevant à 10 et 60% lorsque le traitement est initié respectivement 2 et 3 jours après l'infection (72). Cette molécule, la première possédant une activité anti-filovirale, représente un grand espoir thérapeutique et de plus amples essais doivent être entrepris chez les PNH.

En attendant qu'un traitement spécifique ou un vaccin ne soit disponible, une prise en charge médicale intensive des patients, comprenant des transfusions de plasma, de plaquettes, de facteurs de coagulation et de prostacycline, permet une réduction, faible mais néanmoins notable, de la mortalité associée aux FHV à filovirus. Cela peut d'ailleurs expliquer le faible taux de mortalité induit par le virus de Marburg chez l'homme, comparativement à l'extrême pathogénicité observée dans les modèles expérimentaux, la plupart des patients infectés par ce virus ayant en effet été admis dans des structures de soins intensifs.

Résultats



AVANT-PROPOS

Bien que des études sérologiques réalisées il y a une quinzaine d'années aient démontré la circulation du virus Ebola dans la sous-région Gabon-Cameroun-République Centrafricaine, et que certains récits de villageois aient suggéré des épidémies sporadiques dans des villages très reculés (communauté pygmée), aucune épidémie de FHV à virus Ebola n'avait jusqu'alors été officiellement recensée dans ces pays (59, 60).

En décembre 1994, une épidémie de FHV est survenue dans 3 campements de chercheurs d'or au Nord-Est du Gabon (Mekouka, Andock et Minkebe) situés dans une petite clairière isolée dans la forêt équatoriale (voir figure 11). Les 32 malades se sont ensuite rendus, en descendant l'Ivindo (6h de pirogue) à l'Hôpital de Makokou, ville la plus proche de ces sites. Il semble que simultanément à l'épidémie humaine, une mortalité élevée ait été détectée parmi les grands singes vivant à proximité des campements (chimpanzés et gorilles). Un premier cas secondaire, venant du village de Mayela, en aval de Mekouka, a été ensuite suivi de 16 autres mi-janvier 1995, dans 3 villages proches de Makokou (Mayela, Ekobakoba et Etakaniabe). Ces personnes ont apparemment été contaminées au contact des premiers malades hospitalisés. Au total, 49 personnes ont présenté un tableau clinique de FHV. Certains, parmi les premiers cas, étant également atteints de jaunisse, le diagnostic clinique a d'abord été celui de fièvre jaune, au demeurant endémique au Gabon.

A la demande des autorités sanitaires Gabonaises, une équipe du CIRMF s'est rendue sur place et les prélèvements sanguins de 9 malades ont pu être amenés au laboratoire. Par ailleurs, une vaste enquête épidémiologique a été initiée dans ces villages, permettant ainsi la constitution d'une banque de sérum pour cette région. Des IgM spécifiques du virus amaril furent détectées chez quelques patients. Les prélèvements furent par la suite envoyés au Centre Collaboratif de l'OMS pour les arboviroses et les fièvres hémorragiques à l'Institut Pasteur de Paris, dans le but de confirmer le diagnostic de fièvre jaune et d'isoler le virus par inoculation de souriceaux, de moustiques et de cultures de cellules AP61. L'isolement viral s'est avéré négatif, mais la présence du génome amaril dans certains prélèvements a pu être démontrée par RT-PCR, confirmée par hybridation avec une sonde spécifique et la séquence



partielle déterminée (229),(230). L'annonce officielle de l'épidémie de fièvre jaune a entraîné une campagne massive de vaccination anti-amaril (231).

Cependant, l'absence de preuve sérologique d'infection par le virus amaril chez certains patients, y compris décédés, a conduit à la recherche d'autres agents étiologiques induisant des FHV. C'est ainsi que 19 patients hospitalisés présentaient des preuves sérologiques (IgM, Ag circulants ou isolement viral) de la circulation concomitante du virus Ebola. Des mesures d'isolement des patients et de protection des personnels soignant a permis de limiter l'extension de cette première épidémie de FHV à virus Ebola au Gabon (16).

La survenue quasi-simultanée de l'épisode de Tai (Côte d'Ivoire, 1994), de l'épidémie de Kikwit (RDC, 1995) et de l'épidémie de Mekouka laissant présager d'autres apparitions du virus Ebola, le CIRMF s'est doté des réactifs indispensables au diagnostic des infections par le virus Ebola (IgM, IgG, Ag-capture), généreusement fournis par le Center for Disease Control (CDC, Atlanta), et a également entrepris la mise en place sur le site d'une structure permettant la manipulation d'un tel pathogène. Cette structure, bien que partiellement opérationnelle à ce moment, a néanmoins permis au CIRMF de réagir rapidement, à la demande des autorités sanitaires Gabonaises, lors des 2 épidémies suivantes ; une équipe se rendant sur le terrain très rapidement et le diagnostic biologique établi dans les 24h suivant l'arrivée des prélèvements au laboratoire.

Par ailleurs, la mise en place d'un tel laboratoire en zone d'endémie a justifié l'initiation de recherches, tant en virologie qu'en immunologie, sur les FHV à virus Ebola et la création de l'Unité de Recherches sur les Maladies Emergentes. Les connaissances concernant la réponse immune de l'homme au cours de l'infection par le virus Ebola étant encore très parcellaires à ce moment, la possibilité d'étudier certains aspects de la réponse humorale et cellulaire chez des patients fatalement infectés ou survivants a justifié la réalisation de ces travaux de thèse. De même, l'observation lors des épidémies de personnes ayant des contacts très étroits avec des malades mais ne présentant jamais de symptôme a permis la mise en évidence de sujets infectés de façon asymptomatique par ce sous-type de virus Ebola, pourtant très pathogène, et la caractérisation de leur réponse immune humorale et cellulaire, objets d'une autre thèse, préparée par le D^r Eric Leroy.

Cependant, la présence unique en Afrique Centrale d'une telle structure ainsi que l'endémicité des FHV rend nécessaire l'obtention par le CIRMF, auprès d'instances telles que l'OMS, d'un label de référence concernant le diagnostic et la recherche sur les FHV. Dans ce but, 2 expertises du laboratoire ont été conduites, la première par les D^r Fisher-Hoch et McCormick en janvier 1998 et la 2^{ème} en février 1999 par le D^r Richmond, afin que le BSL-4 du CIRMF réponde aux normes internationales en vigueur pour ce type de manipulation. Le laboratoire a ainsi dû être fermé en septembre 1998, afin que les modifications nécessaires soient réalisées, mais n'a malheureusement pu être réouvert à ce jour. Néanmoins, l'obtention prochaine par le CIRMF de ce label permettra la mise en place d'une surveillance épidémiologique des FHV au Gabon, mais aussi dans la sous-région, ainsi que la poursuite et l'initiation de protocoles de recherche bénéficiant de cette situation unique.

I. LES EPIDEMIES DE FHV A VIRUS EBO-Z DE MAYIBOUT ET BOOUE (GABON, 1996).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, tant sur le terrain que sur le plan des prélèvements biologiques, ayant été initiés à partir de l'épidémie de Mayibout, l'épidémie de Mekouka ne sera que partiellement abordée.

1. Description des épidémies.

Mayibout, février 1996.

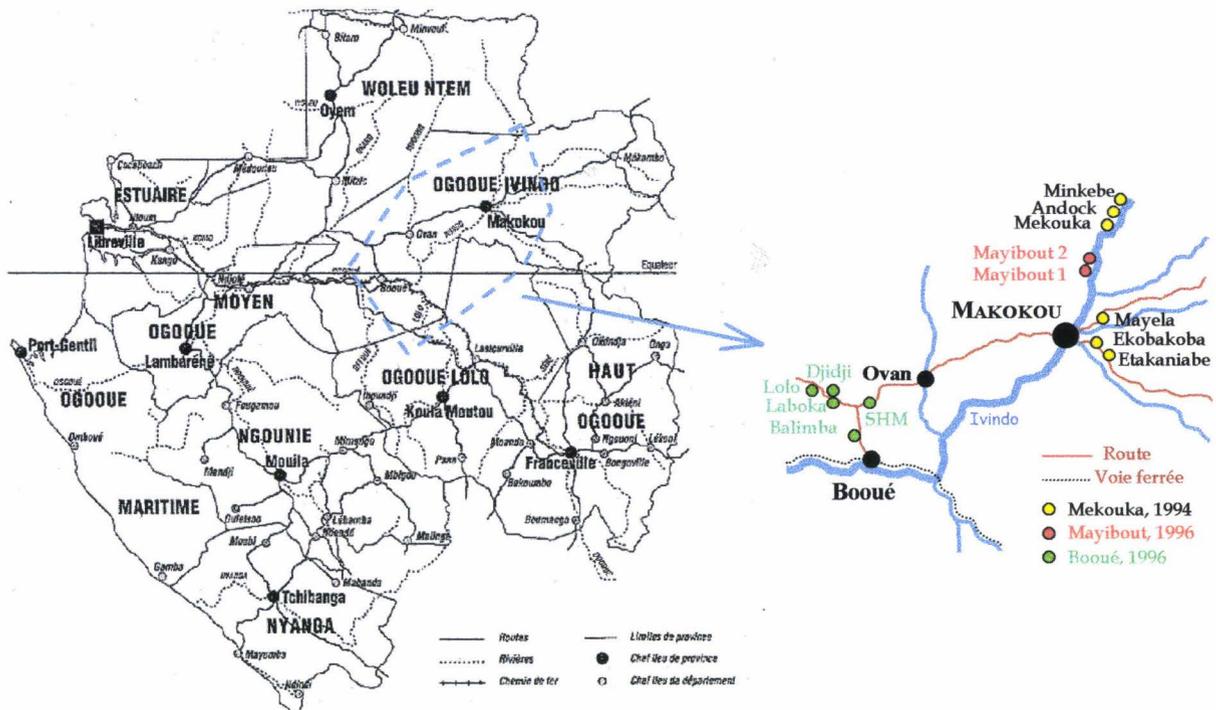


Figure 11. Localisation géographique des 3 épidémies de FHV à virus Ebo-Z au Gabon (1994-1996). L'agrandissement (traits pointillés) représente la zone couvrant les 3 épidémies. Les ronds jaunes localisent les sites où des cas ont été enregistrés lors de la première épidémie, les ronds rouges l'épidémie de Mayibout et les ronds verts celle de Booué.

Dix-huit personnes, enfants et adultes résidant dans le village de Mayibout 2 (figure 11), ayant touché, découpé ou porté la viande d'un chimpanzé trouvé mort dans la forêt, par la suite cuisinée et mangée, ont présenté environ 8 jours après le contact infectieux les premiers symptômes de FHV (fièvre, céphalées, diarrhée sanglante), dont l'agent étiologique, le virus Ebo-Z (souche Gabon, cf chapitre I-3), a été diagnostiqué et isolé par le CIRMF et l'OMS. Les personnes s'étant contentées de manger la viande sans la toucher avant la cuisson n'ont

pas été contaminées par ce biais. L'infection de ces cas primaires s'étant déroulée de manière très ponctuelle, les périodes d'incubation présentées par ces patients ont donc pu être établies précisément pour la plupart (17/18) et sont figurées avec d'autres paramètres dans le tableau IV.

Sexe	Age	Contact	Incub	Symptômes	Jours	Issue
M	15	s, d, p, m	7	v, d, g, m	7	D
F	21	c, m	7	v, d, hc	11	D
M	10	s	9	v, hc, m	8	D
M	10	s, p	9	v, d, g, hc, m	5	D
F	14	s, p, c, m	7	v, d, g, m, hm	6	D
F	10	s, p, c, m	7	v, d, g, hc, m	6	D
F	10	s, p, c, m	7	v, d, g, ic, m, hm	6	D
F	11	s, p, c, m	7	v, d, g, hc, m	6	D
M	15	s, d, p, m	8	v, d, hq, g, m, hm	6	D
M	31	s, d, p, m	8	v, d, g, hq, hc	6	D
M	24	s, d, p, m	9	v, d, hq, g, hc	6	D
F	59	?	9	v, d, m, hm	8	D
M	10	s, p	9	hc		S
F	10	s, p, m	9	v, d		S
F	23	s, p, m	6	v, d, g		S
M	39	c, m	9	d, hc		S
M	13	s, p, m	9	v, d		S

Tableau IV. Description des cas primaires de l'épidémie de Mayibout. Le sexe, l'âge, la durée de la période d'incubation et, pour les décédés, de la maladie (jours), l'issue fatale (D) ou non (S) sont figurés ; ainsi que les contacts avec le chimpanzé (s: présence sur le site ; d: dépeçage ; p: transport de la viande ; c: préparation culinaire ; m: ingestion viande cuite) et certains symptômes (v: vomissements ; d: diarrhée ; g: gingivorragie ; m: méléna ; hc: hyperémie conjonctivale ; hq: hoquet ; hm: hématurie)

Le sexe et l'âge des patients ne semblent pas influencer sur l'issue de la maladie. En effet, l'âge moyen des décédés et survivants est de $19,2 \pm 14$ et $19,0 \pm 12$ ans, respectivement, tandis que les personnes des 2 sexes semblent touchées dans les mêmes proportions. De même, les périodes d'incubation, respectivement de $7,8 \pm 0,9$ et $8,4 \pm 1,3$ jours pour les décédés et survivants, sont similaires quelle que soit l'issue de la maladie. Il est difficile de relier le type de contacts qu'ont eus les patients avec l'animal contaminé et l'issue de la maladie, bien que ce paramètre ne semble cependant pas impliqué. Les patients fatalement infectés ont présenté un tableau clinique beaucoup plus sévère que les survivants, particulièrement en ce qui concerne les signes hémorragiques, et ont connu une phase symptomatique de $6,8 \pm 1,6$ jours. Par contre, une température élevée a été notée chez tous les patients, quelle que soit l'issue, des arthralgies ou myalgies dans 33% des cas, céphalées (27%), asthénie (27%), épistaxis (13%) et douleurs abdominales (7%). Deux cas primaires n'ont pu être reliés à un contact avec le

chimpanzé en dépit de la survenue de symptômes en même temps que les autres cas primaires.

Les malades ont été évacués par le fleuve à l'hôpital de Makokou, où ils ont été isolés. Cependant, les corps de 4 patients décédés dans les 48h suivantes ont été rapatriés au village. Un 5^{ème} patient s'est échappé de l'hôpital et est également retourné à Mayibout, où il est rapidement mort. Les patients décédés furent alors inhumés sans aucune précaution par les villageois. Environ une semaine après la survenue des symptômes chez les cas primaires sont apparus des cas secondaires, résultant quant à eux de contaminations inter-humaines (soins aux malades, cérémonies funéraires). Cependant, il est difficile, étant donné le type de contamination de ces cas, de déterminer précisément la durée de la phase d'incubation. Seul l'un d'eux, contaminé lors d'une cérémonie funéraire, a pu être précisément décrit, et a présenté une période d'incubation de 7 jours et une issue favorable. Les cas secondaires décédés (7) ont connu une phase symptomatique de $6,6 \pm 1,3$ jours à l'exception d'un patient, malade pendant 15 jours avant de succomber ; tandis qu'une phase symptomatique de 8 jours a été observée chez le seul cas tertiaire décédé (sur les 3). Les symptômes ressentis par les cas secondaires, décédés ou survivants (5), étaient similaires à ceux observés chez les cas primaires. La mortalité survenue chez ces patients, bien qu'inférieure à celle des cas primaires, ne semble pas significativement différente (59% contre 70% pour les cas primaires, 67% pour l'ensemble des 35 patients infectés au cours de l'épidémie).

Les mesures d'isolement, bien que n'ayant pu empêcher la contamination des cas secondaires et tertiaires ni la fuite d'une patiente ultérieurement décédée dans le train l'amenant à Libreville, ont néanmoins permis de rapidement circonscrire l'épidémie.

Booué, octobre 1996.

A la demande des autorités sanitaires Gabonaises, le CIRMF a diagnostiqué, le 4 octobre 1996, 2 cas de FHV à virus Ebola (Ag-capture positifs) parmi 3 patients hospitalisés avec des signes de FHV à l'hôpital de Booué et 3 contacts de ces malades.

L'enquête épidémiologique rétrospective a montré que le cas index semblait être un chasseur de 39 ans mort (de façon non déclarée) le 13 juillet dans un campement forestier près de Booué (200 kms de Mekouka et 120 de Mayibout) avec un tableau typique de FHV (fièvre,

céphalées, diarrhées, vomissements et saignements). Il est intéressant de noter qu'à la même période, un chimpanzé ayant succombé à une FHV à virus Ebola (le diagnostic a été réalisé à partir d'une biopsie de peau par le CDC (16)) a été trouvé dans la forêt dans la région de la Lopé, une zone assez proche de celle où chassait le cas index, mais cependant séparées par une barrière infranchissable par les PNH, le fleuve Ivindo. A la fin du mois d'août, un autre chasseur est décédé dans le même camp, mais ne semble pas avoir été contaminé par le premier cas. Un 3^{ème} chasseur, tombé malade 12 jours après, s'est enfui de l'hôpital de Booué pour se rendre dans le village de Balimba, où il est mort après avoir contaminé un tradipraticien et son neveu. Ces derniers ont présenté les premiers symptômes mi-septembre et ont été hospitalisés à Booué, puis transférés à Makokou où ils sont morts ; laissant derrière eux 3 personnes infectées, qui tomberont à leur tour malades, ces derniers cas étant ceux ayant permis le diagnostic biologique de cette 3^{ème} épidémie de FHV à virus Ebola.

Par la suite, l'épidémie s'est étendue autour de Booué dans plusieurs villages et campements forestiers (Balimba, SHM), 24 cas dont 17 morts étant enregistrés le 17 novembre. De nombreux patients ont fui de l'hôpital de Booué, se rendant dans leur village ou prenant le train ou la route pour rejoindre d'autres villes, y compris Libreville, où 15 cas (11 décès) au total ont été enregistrés tout au long de l'épidémie. Un médecin s'est d'ailleurs contaminé en procédant à une endoscopie chez un malade venant de Booué et hospitalisé à Libreville, et s'est rendu en Afrique du Sud le 27 octobre afin de se faire soigner, ignorant probablement l'étiologie de sa maladie. Hospitalisé à Johannesburg, il a survécu mais a contaminé une infirmière qui a présenté les premiers symptômes le 2 novembre et est décédée le 24 (232).

A la fin de ce mois, une 2^{ème} vague de l'épidémie est apparue dans 3 sites proches de Booué: Lolo (6 cas, 3 décès), campement SHM (5 cas, 4 décès) et campement de Balimba (1 cas, 1 décès), causant de nombreuses nouvelles infections. Le CIRMF s'est ainsi rendu le 11 et le 13 Décembre à Lastourville (300 kms de Booué), afin de prélever une patiente venant de Booué et ses contacts tandis que 5 patients (dont 3 sont décédés) se trouvaient encore à l'hôpital de Booué le 20 du même mois. Le dernier cas de FHV a été enregistré le 18 janvier 1997 et l'épidémie a été officiellement déclarée terminée en mars avec un total de 60 cas et 45 décès (mortalité: 75%). Cette épidémie s'est donc distinguée des 2 précédentes par sa très

longue durée (près de 6 mois) et les nombreux passages inter-humains effectués à partir de la souche virale initiale (environ une dizaine).

La dispersion des patients, pas toujours hospitalisés, dans plusieurs villes et villages ainsi que la longue durée de l'épidémie ont entravé les enquêtes épidémiologiques et le suivi clinique et biologique de certains patients. Nous n'avons ainsi pu suivre et prélever que 14 patients (9 morts, 5 survivants), pour lesquels les observations cliniques sont figurées dans le tableau V. Malheureusement, les données concernant les contacts infectieux et la période d'incubation de ces patients étaient trop imprécises pour être exploitables.

Sexe	Age	Passage viral	Date début	Symptômes	Jours	Issue
M	3	4-5	12/10	d, n, v, ic, a	5	D
F	9	4-5	13-16/10	d, n, v, mg, a, da, spi	9-12	D
M	47	4-5	?	hc, c, a, da	† 23/10	D
F	48	4-5	16/10	d, v, hc, g, my, c, a, m, hm, e, da	11	D
F	19	4-5	18/10	d, n, v, hc, my, m, c, a, da	11	D
M	14	4-5	22/10	d, n, v, hc, g, my, c, a, mg	6	D
F	44	6-8	16/12	d, n, v, my, a, t, da	13	D
M	4	6-8	19/12	d, v, a, da	4	D
M	30	6-8	20/12	?	7	D
F	20	4	10/10	?	12	S
M	40	4-5	16/10	d, n, v, hc, my, c, a, da	10	S
F	26	5-7	4/12	my, a, da, hc	5	S
F	32	6-8	8/12	hc, my, a	13	S
F	18	6-8	14/12	d, v, my, m, a, hy, da	10	S

Tableau V. Description de quelques patients de l'épidémie de Booué. Le sexe, l'âge, le nombre de passages inter-humains depuis le cas index, la date du début de la période symptomatique, le nombre de jours de symptômes (jours), et l'issue fatale (D) ou non (S) sont figurés ; ainsi que certains symptômes (d: diarrhée ; n: nausées ; v: vomissements ; hc: hyperémie conjonctivale ; g: gingivorragie ; my: myalgies/arthralgies ; c: céphalées ; a: asthénie ; m: méléna; hm: hématurie ; e: épistaxis ; hy: hémoptysie ; da: douleurs abdominales ; spi: saignements points d'injection ; la température élevée étant un symptôme retrouvé dans tous les cas)

La durée de la phase symptomatique, pour ces patients, a été de 5 à 13 jours quelle que soit l'issue de la maladie (certains patients ont cependant connu des périodes plus longues, comme l'infirmière de Johannesburg, qui a présenté des symptômes pendant 3 semaines avant de succomber). Cette épidémie ne se distingue pas des 2 précédentes sur le plan clinique, avec systématiquement une température élevée, et très souvent des vomissements, diarrhées, hyperémie conjonctivale, asthénie, céphalées, myalgies/arthralgies, gingivorragies et mélénas. D'autres signes – hématurie, épistaxis, saignements aux points d'injection, toux et maux de

gorge – sont observés chez certains patients fatalement infectés tandis qu'un des survivants a présenté une hémoptysie. Plusieurs enfants en bas-âge (2 sont figurés ici) infectés lors de cette épidémie se sont avérés très sensibles à l'infection, évoluant toujours vers la mort en quelques jours avec un tableau clinique apparemment peu sévère. A l'exception de ces cas extrêmes et à l'instar de l'épidémie de Mayibout, l'âge et le sexe n'influent apparemment pas sur l'issue de la maladie ou le tableau clinique. De même, la pathogénie du virus Ebola ne semble pas avoir évolué au fil des nombreux passages, le tableau clinique demeurant similaire pour les décédés et survivants, et la mortalité restant la même jusqu'à la fin de l'épidémie. Enfin, l'issue de la maladie ne semble pas liée à la contamination auprès d'un patient particulier. En effet, plusieurs exemples de familles entières infectées par la même personne présentaient les 2 types d'évolution à l'infection par le virus Ebo-Z.

2. Le diagnostic.

Bien que d'autres équipes (Institut Pasteur, Paris ; CDC, Atlanta) aient également fourni, de façon ponctuelle, des résultats biologiques au Comité International de Lutte contre les Fièvres Hémorragiques, chargé sur place du contrôle des épidémies, le CIRMF a contribué de façon majeure à la confirmation biologique de nombreux cas lors de ces épidémies. Les techniques appliquées ont alors été la détection d'Ag circulants, et de celle de l'ARN viral dans les PBMC par RT-PCR (cf chapitre II-2) à partir de l'épidémie de Booué, pour le diagnostic des FHV à virus Ebo-Z chez les patients en phase symptomatique, tandis que la détection des IgG spécifiques était utilisée en complément des 2 techniques précédentes (le diagnostic par PCR n'étant pas validé à ce moment, la détection d'Ag était alors la méthode de référence). Des problèmes de réactifs (lot d'Ag Ebo-Z) ayant rendu inutilisable le test de détection des IgM spécifiques du virus Ebo-Z et le CIRMF ne pouvant pas encore en produire à ce moment, cette technique n'a été utilisée que partiellement, lors de l'épidémie de Mayibout.

Après avoir diagnostiqué les premiers cas de ces 2 épidémies, le CIRMF est régulièrement intervenu, par la suite, afin de confirmer, chez des patients présentant des symptômes de FHV, l'infection par le virus Ebo-Z. Le travail sur le terrain a également permis

de prélever les patients en phase symptomatique, mais aussi les survivants après les symptômes ainsi que les personnes ayant eu des contacts très proches avec des malades.

Au cours de l'épidémie de Mayibout, les patients ont été prélevés 1 fois pendant la phase symptomatique (3-6 jours après l'apparition des symptômes) et 1 ou 2 autres fois 8 et 30 jours après (début de la convalescence) pour les survivants. Par contre, lors de l'épidémie de Booué, les patients ont pour certains été prélevés jusqu'à 3 fois pendant la phase symptomatique et 2 fois pendant la proche convalescence pour les survivants. Cependant, pour d'autres malades, 1 seul prélèvement n'a pu être effectué, le plus souvent en phase symptomatique (Cf Matériel et méthodes).

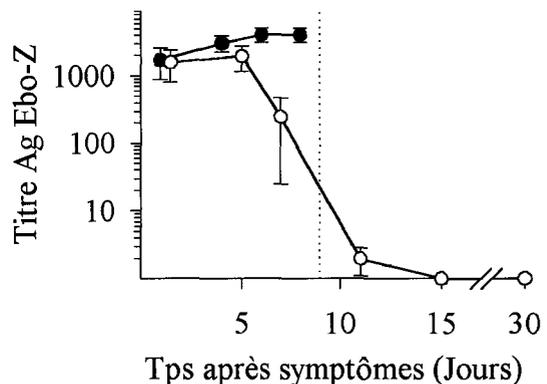
Par ailleurs, de nombreux prélèvements de patients présentant des signes suspects (fièvre et diarrhée sanglante) nous ont été adressés de temps en temps par les autorités sanitaires, à des fins de diagnostic. Cependant, aucun de ces prélèvements testés en dehors d'un cadre épidémique n'a présenté d'évidence de l'implication d'Ebo-Z, l'étiologie étant le plus souvent bactérienne.

II. PARAMETRES VIROLOGIQUES AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z (SOUCHE GABON).

1. L'antigénémie circulante, similitudes entre les patients au début de la phase symptomatique et corrélation à la phase clinique de la maladie.

Les Ag circulants du virus Ebo-Z ont été titrés dans les plasmas de patients, provenant des épidémies de Mayibout et Booué, prélevés pendant la phase symptomatique et également la proche convalescence chez les survivants. Les résultats sont présentés dans la figure 12. La

Figure 12. Cinétique des Ag circulants chez les patients de Mayibout et Booué. La ligne verticale pointillée figure le moment de la mort ou de la disparition des symptômes chez les survivants. Les moyennes \pm l'écart type (ET) des valeurs individuelles (titre d'Ag) sont représentées en fonction du nombre de jours avant la mort pour les décédés (●) (8 ± 1 jours, n=3 ; 5 ± 1 , n=5 ; 3 ± 1 , n=6 ; $1 \pm 0,5$, n=6) et, pour les survivants (○), en fonction de la phase symptomatique (2 ± 1 jours après l'apparition des symptômes, n=6 ; 5 ± 1 , n=5 ; 8 ± 1 , n=4) et de la convalescence (1-5 jours après la disparition des symptômes, n=5 ; 7-12, n=5 ; 3 semaines, n=5). Les titres d'Ag correspondent à la dernière dilution du plasma présentant une valeur supérieure à la moyenne des valeurs de 10 plasmas négatifs ± 2 ET.



charge antigénique plasmatique est élevée et équivalente chez les décédés (titre $1/1730 \pm 850$) et les survivants (titre $1/1600 \pm 800$) les premiers jours de la maladie (1-3 jours après les symptômes). Par la suite, les titres augmentent pour atteindre un plateau très élevé ($1/4096 \pm 1000$) 3-4 jours avant la mort.

Par contre, malgré une légère augmentation 4-6 jours après les symptômes ($1/1960 \pm 800$), la quantité d'Ag circulants présents dans le plasma des survivants chute considérablement 7-9 jours après les symptômes ($1/250 \pm 225$) (correspondant aux derniers jours de la maladie) et devient presque nulle 1-5 jours après les symptômes ($1/2 \pm 1$). Ainsi, la charge antigénique circulante et les symptômes disparaissent simultanément chez les survivants. Bien que le manque de précision quant à la date de l'apparition des symptômes (cas d'un prélèvement de survivant) et l'altération de l'échantillon (3 cas décédés) aient empêché l'exploitation de ces prélèvements, quelques patients (contacts de malades à ce

moment), prélevés pendant la période d'incubation, ne présentaient pas d'Ag circulants (résultats non présentés). L'ensemble de ces résultats suggère une corrélation entre la survenue des symptômes et la présence d'Ag viraux dans la circulation.

2. Détection de l'ARN viral dans les PBMC de patients.

Une technique de RT-PCR a été mise au point dans le but d'amplifier un fragment du génome du virus Ebo-Z à partir de PBMC ou de sérum (résultats non présentés) de patients infectés. Elle consiste à amplifier un fragment de 420 paires de base (pb) du gène L (polymérase) en utilisant un couple d'amorces dont les séquences nous ont été communiquées par A. Sanchez (CDC, (54)). La spécificité du fragment amplifié a été confirmée par hybridation 'froide' avec une sonde spécifique du gène L d'Ebo-Z et par le séquençage du produit de PCR chez 3 patients montrant 97% d'homologie avec la séquence d'Ebo-Z (Mayinga) (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis). Comme nous n'avons obtenu que du sérum et des culots sanguins pendant la phase symptomatique des patients de Mayibout, l'amplification du fragment a été réalisée, dans ce cas particulier, à partir d'ARN extrait de culots sanguins. Le fragment est détecté chez la plupart des décédés (5/6) et certains survivants (3/6) (figure 13).

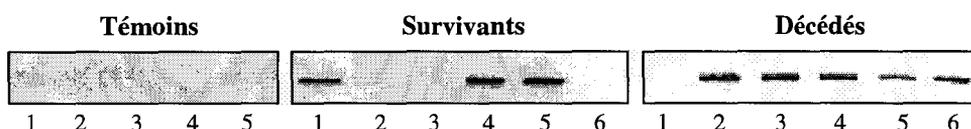


Figure 13. Amplification par RT-PCR d'un fragment de 420 pb du gène L chez les patients de Mayibout. L'ARN provient, pour les témoins négatifs et les patients de Mayibout, de culots sanguins. Cinq témoins endémiques, 6 survivants (prélevés pendant la phase symptomatique), et 6 décédés de l'épidémie de Mayibout sont figurés.

Par contre, les résultats présentés dans la figure 14 proviennent de PBMC de patients de Booué, et pour 4 d'entre eux, de l'épidémie de Mekouka. La RT-PCR semble très spécifique, puisqu'aucun témoin négatif (n=10) n'est amplifié (figure 14a). Le fragment de 420 pb spécifique du gène L est détecté chez tous les survivants en phase symptomatique (l'un d'eux présentant néanmoins un signal très faible), et chez 2/3 en convalescence. Le fragment est également retrouvé chez tous les décédés, y compris le premier jour de la maladie, avec une forte intensité. Dans le but d'augmenter la sensibilité de cette technique, une 2^{ème} PCR a

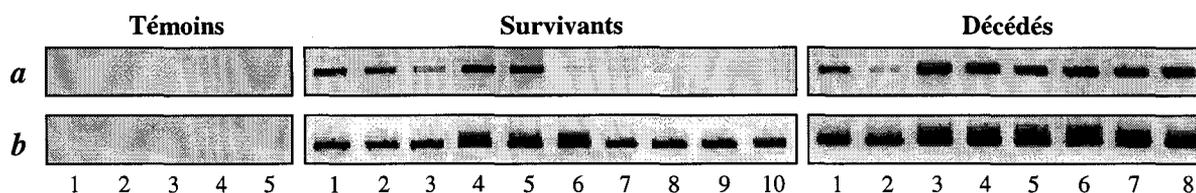


Figure 14. **Amplification du gène L chez les patients de Booué.** L'ARN provient de PBMC. Cinq témoins endémiques sont présentés (10 testés), ainsi que 7 survivants en phase symptomatique (Booué, n° 1-5 ; Mekouka, n° 6-7) et 3 en convalescence, (8, 2 jours après la disparition des symptômes ; 9, 5 jours après et 10, 15 jours après) et 8 patients décédés en phase symptomatique (1-2, patients de Mekouka ; 3-8, patients de Booué. **a**, première amplification (fragment de 420 pb). **b**, amplification d'un fragment de 298 pb à partir des produits de première PCR.

été réalisée à partir des produits de la première PCR en utilisant des amorces déterminées à partir de la séquence de l'amplicon (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis) (figure 14b). Des signaux de forte intensité sont détectés chez tous les survivants, en phase symptomatique et de convalescence, et bien sûr tous les décédés. Toutefois, la spécificité ne souffre pas de ce gain de sensibilité, puisqu'aucun des témoins négatifs n'est amplifié.

Cette technique de RT-PCR a été appliquée au diagnostic des FHV à virus Ebo-Z lors de l'épidémie de Booué, parallèlement à la détection des Ag circulants, mais également lors des dépistages de cas suspects sporadiques. La validation de ce nouvel outil de diagnostic des FHV à virus Ebola et sa comparaison par rapport aux méthodes de références (Ag-capture, IgM, IgG) a fait l'objet d'une publication (E.M. Leroy, S. Baize *et al*, sous presse).

3. Phylogénie et comparaison des différentes souches Gabonaises de virus Ebola.

Les isolements viraux réalisés au CIRMF, mais également au CDC et à l'Institut Pasteur de Paris, par inoculation de cellules Véro E6 en culture à partir de sérums de patients décédés ont permis la caractérisation moléculaire des différentes souches Gabonaises de virus Ebola. Cependant, il semble que l'isolement viral à partir de sérums de survivants en phase symptomatique soit plus délicat, les tentatives d'inoculation de cellules Véro E6 (un seul passage n'a pu être fait) que nous avons effectuées n'ayant pas permis l'isolement d'une souche. Cependant, ces résultats étant préliminaires – l'isolateur n'a en effet pu être utilisé qu'un court laps de temps, ils ne sont pas présentés.

Réalisée en collaboration avec le CDC, l'étude du gène de la GP des souches de virus Ebola provenant de patients décédés des 3 épidémies gabonaises a permis de placer ces

souches parmi le sous-type Zaïre, leurs divergences par rapport à ce dernier étant négligeables – 23 nucléotides par rapport à la souche provenant de Kikwit, RDC, 1995 ; et 38 avec Yambuku, RDC, 1976 (17). Les souches provenant des épidémies gabonaises présentent toutes des différences, qui bien que légères (4 nucléotides différents entre Mekouka et Mayibout, et encore 4 entre cette dernière et Booué), suffisent à confirmer que ces 3 épidémies sont bien distinctes. De plus, aucune différence n'est notée dans la région la plus variable de la GP (783 pb) entre les souches provenant d'une même épidémie, même après de nombreux passages. La séquence du virus de l'épidémie de Booué est en effet identique entre la souche provenant de l'infirmière décédée en Afrique du Sud (5-8^{ème} passage) et celle de 2 autres patients décédés (5-6^{ème} passage), ces souches s'étant séparées sur le plan évolutif depuis le 2^{ème} passage (17).

De même, le séquençage d'un fragment du gène L (156 pb) de virus provenant des épidémies de Mekouka et de Booué n'a mis en évidence qu'une seule mutation entre ces souches distantes de 18 mois (233). De même, l'étude du gène de la VP24, à partir du produit de l'amplification par RT-PCR de ce gène, chez 4 décédés et 4 survivants des épidémies de Mayibout et Booué n'a mis en évidence aucune différence de séquence entre ces patients tandis que 8 mutations ne conduisant à aucun changement d'acide aminé sont observées par rapport à Ebo-Z (Yambuku, 1976) et une seule par rapport à la Ebo-Z (Mekouka, 1994). L'ensemble de ces résultats confirme donc l'extrême stabilité génétique du virus Ebo-Z (Gabon), entre les épidémies, mais plus particulièrement au cours d'une même épidémie.

III. LA REPOSE HUMORALE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z.

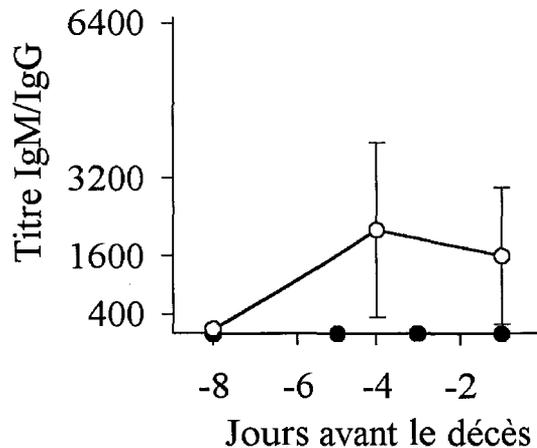
L'analyse de la réponse humorale chez les patients infectés au cours des épidémies de Mayibout et Booué a été réalisée en utilisant des Ag (généreusement fournis par P.E. Rollin, Special Pathogen Branch, CDC, Atlanta, USA et V.E. Volchkov, Marburg, Allemagne) pour les ELISA et Western Blots, respectivement) provenant d'une souche Zaïre 76 (Mayinga), car les Ag provenant de la souche Gabon (préparés par le CDC) n'étaient pas disponibles en quantité suffisante à ce moment.

1. Une réponse humorale défectueuse au cours de l'infection fatale.

Analyse des réponses IgM et IgG spécifiques par ELISA.

Les IgM et IgG spécifiques du virus Ebo-Z ont été recherchées dans les sérums de patients fatalement infectés au cours de la phase symptomatique et les cinétiques de ces réponses sont présentées dans la figure 15. Les IgM spécifiques apparaissent entre 6 et 2 jours

Figure 15. Analyse par ELISA de la réponse IgM et IgG spécifiques du virus Ebo-Z au cours de l'infection fatale. Les moyennes \pm ET des valeurs individuelles (titre d'Ac spécifiques) sont représentées en fonction du nombre de jours avant la mort pour les IgM (\circ) (3 patients de Booué ; 8 ± 1 jours, 4 ± 2 , et $1 \pm 0,5$) ainsi que pour les IgG (\bullet), les patients provenant des épidémies de Mayibout et Booué (8 ± 1 jours, $n=3$; 5 ± 1 , $n=5$; 3 ± 1 , $n=6$; $1 \pm 0,5$, $n=6$). Les titres d'Ac sont déterminés de la même façon que pour la figure 12, et les plasmas sont évalués à partir d'une dilution de 1:100.



avant la mort, mais les taux demeurent faibles et tendent même à diminuer la veille du décès. Cette réponse est de plus irrégulière, puisque seul un tiers de ces patients possèdent des IgM spécifiques au moment de la mort.

La réponse IgG spécifique du virus Ebo-Z est quant à elle totalement absente chez les patients fatalement infectés, aucune réponse IgG n'est en effet détectée jusqu'au moment du

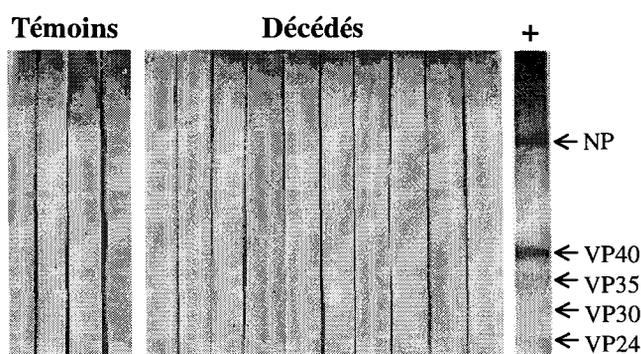
décès. Seul un patient de Mayibout de 70 ans ayant présenté une phase symptomatique anormalement longue de près d'un mois présentait 5 jours avant sa mort une faible positivité (non significative) en IgG spécifiques (1/100, résultat non présenté). Cependant, l'âge et la durée de la maladie, mais également l'absence de données concernant la contamination de ce patient (qui est l'un des 2 cas primaires de l'épidémie de Mayibout dont la contamination ne peut être reliée au chimpanzé infecté) ont conduit à l'exclure de l'étude. Cet exemple confirme d'ailleurs l'absence de production d'IgG spécifiques chez les patients décédés, puisque ce prélèvement qui ne présente que des taux très faibles et non significatifs d'IgG, a été obtenu 3 semaines après l'apparition des symptômes, laissant ainsi au patient plusieurs semaines après le contact pour produire des Ac.

Ces résultats indiquent que la réponse humorale ne semble pas se mettre en place de façon effective chez les patients décédés. En effet, en dépit d'une réponse IgM, faible et irrégulière, aucune réponse IgG n'est détectée au cours de l'infection fatale par le virus Ebo-Z.

Confirmation de l'absence d'IgG spécifiques du virus Ebo-Z par western blot.

Afin de confirmer l'absence d'IgG spécifiques au cours de l'infection fatale, l'analyse de la réponse IgG par western blot a été réalisée. Un surnageant de culture primaire d'une souche provenant d'un patient de Booué a d'abord été utilisé comme source d'Ag, mais le faible contenu antigénique de ce surnageant et le type de réaction enzymatique utilisé à ce moment a rendu ce test très peu sensible. Ces résultats, qui présentent néanmoins l'intérêt de l'homologie antigénique sont présentés dans la figure 16.

Figure 16. Analyse de la réponse IgG par western blot chez les patients décédés. Un surnageant de culture primaire de cellules Véro E6, inoculées par le plasma d'un patient de Booué, a été séparé par SDS-PAGE 9% en condition non-dénaturante. Les IgG spécifiques ont été recherchées dans les plasmas, dilués au 1/25^{ème}, de 10 témoins endémiques (4 sont représentés) et de 10 décédés. Le témoin positif (+) est une ascite de souris anti-Ebo-Z diluée au 1/1000^{ème}. Les positions de la NP, VP40, 35, 30 et 24 sont indiquées par des flèches.

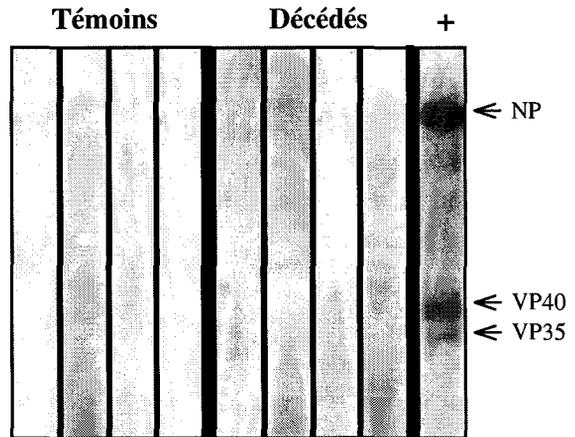


En dépit d'un très faible facteur de dilution des sérums (1/25^{ème}), aucune bande spécifique d'un Ag viral n'est détectée chez les patients décédés (n=10), contrairement à une ascite de

souris immunisée contre Ebo-Z et diluée au $1/1000^{\text{ème}}$, qui reconnaît principalement la NP et la VP40, mais également d'autres protéines qui semblent être la VP35, 30 et 24.

Dans le but d'obtenir une plus grande sensibilité de détection des IgG spécifiques, des Ag de virus Ebo-Z (Mayinga) purifiés (généreusement fournis par V.E. Volchkov) ont été utilisés, ainsi qu'un système de révélation par chemiluminescence, permettant une détection bien plus fine des IgG spécifiques (figure 17). Cependant, l'augmentation de la sensibilité du

Figure 17. Analyse de la réponse IgG par western blot chez les patients décédés. Une préparation purifiée et concentrée de virus Ebo-Z (Mayinga) (généreusement fournie par V.E. Volchkov) a été séparée par SDS-PAGE 10% en condition dénaturante. Les IgG spécifiques ont été recherchées dans les plasmas, dilués au $1/1000^{\text{ème}}$, de 10 témoins endémiques et de 10 décédés (4 sont représentés). Le témoin positif (+) est un plasma de survivant (prélevé après les symptômes) dilué au $1/1000^{\text{ème}}$. Les positions de la NP, VP40 et VP35 sont indiquées par des flèches.



test (le sérum humain utilisé comme témoin positif est dilué au $1/1000^{\text{ème}}$) ne permet pas la détection d'IgG spécifiques chez les patients fatalement infectés ($n=10$). Les plasmas de ces patients ont été testés à des dilutions plus faibles (jusqu'à $1/100^{\text{ème}}$), mais aucun signal spécifique n'est détecté à l'exception d'un fort bruit de fond (résultats non présentés).

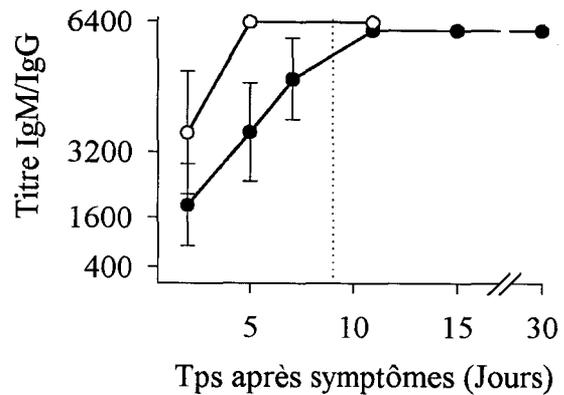
Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que la réponse humorale est sévèrement altérée au cours de l'infection fatale. En effet, seul un tiers des patients produisent des IgM et aucune réponse IgG spécifique du virus Ebo-Z n'est détectée avant la mort.

2. Une réponse humorale précoce associée à la guérison.

Analyse des réponses IgM et IgG spécifiques par ELISA.

Les réponses IgM et IgG spécifiques du virus Ebo-Z ont été étudiées chez les patients survivants depuis le début de la phase symptomatique jusqu'à un mois après l'apparition des symptômes (figure 18). Contrairement aux patients décédés, des IgM et des IgG spécifiques du virus Ebo-Z sont détectées dans tous les prélèvements de patients survivants. Ainsi, dès le début de la phase symptomatique (2-3 jours après l'apparition des symptômes), des taux

Figure 18. **Analyse par ELISA des réponses IgM et IgG spécifiques du virus Ebo-Z au cours de l'infection non-fatale.** Les moyennes \pm ET des valeurs individuelles (titre d'Ac spécifiques) sont représentées en fonction du nombre de jours après l'apparition des symptômes pour les IgM (○) (patients de Booué ; 2 ± 1 jours, $n=3$, 5 ± 2 , $n=4$), et 1-5 jours après la disparition des symptômes ($n=3$). Les IgG spécifiques (●) ont été détectées chez des patients provenant des épidémies de Mayibout et Booué prélevés pendant la phase symptomatique (2 ± 1 jours après l'apparition des symptômes, $n=6$; 5 ± 1 , $n=5$; 8 ± 1 , $n=4$), et après la disparition des symptômes (1-5 jours après, $n=5$; 7-12 jours, $n=5$; 21 jours, $n=5$).



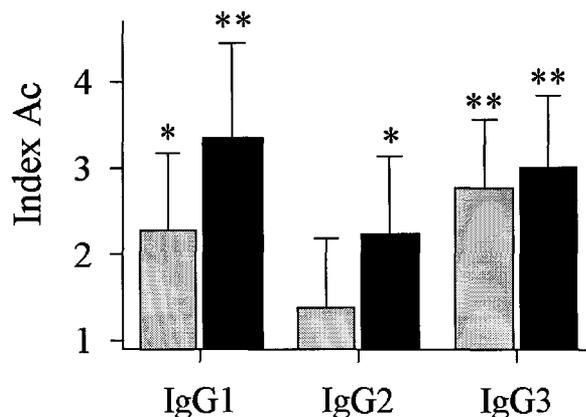
élevés d'IgM spécifiques sont détectés, tandis que les titres d'IgG sont à ce moment compris entre $1/100^{\text{ème}}$ (titre le plus faible, plasma obtenu 3 jours après l'apparition des symptômes) et $1/3200^{\text{ème}}$. De même, pour les survivants de Mayibout infectés par le chimpanzé, les prélèvements les plus précoces dont nous disposons présentent des titres d'IgG compris entre $1/500^{\text{ème}}$ et $1/6400^{\text{ème}}$, et ont été obtenus 12 jours après l'infection (3 et 6 jours après l'apparition des symptômes).

Les titres d'IgM sont très élevés 4-6 jours après l'apparition des symptômes (le plateau est lié à la dernière dilution testée) ; les taux d'IgG spécifiques augmentant quant à eux tout au long de la phase symptomatique pour atteindre ces valeurs juste après la disparition des symptômes (1-5 jours après). La réponse IgM n'a pu être testée sur les prélèvements les plus tardifs (3 semaines après l'apparition des symptômes), mais les IgG spécifiques sont toujours détectées en grandes quantités (figure 18).

Analyse des isotypes d'IgG spécifiques par ELISA.

Afin de déterminer quels isotypes d'IgG sont produits chez les survivants au cours de l'infection par le virus Ebo-Z, les titres d'Ac de chaque isotype d'IgG ont été mesurés chez les survivants pendant la phase symptomatique et la convalescence. Pendant la phase symptomatique, la réponse IgG spécifique des survivants est composée d'IgG₁ et plus particulièrement d'IgG₃, tandis que des IgG₂ spécifiques sont détectées à un faible taux (non significatif) et les IgG₄ absentes (figure 19). Pendant la convalescence (7-21 jours après la disparition des symptômes), les taux d'IgG₁ spécifiques d'Ebo-Z augmentent tandis que les IgG₃ sont maintenues à la même concentration. Des Ac IgG₂ sont à ce stade détectés de façon

Figure 19. Analyse des isotopes d'IgG impliqués dans la réponse humorale des survivants. La présence d'IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 a été détectée par ELISA dans les plasmas de 6 survivants, prélevés pendant la phase symptomatique (barres grises) et la convalescence (barres noires). Aucun sérum spécifique de référence n'étant disponible pour les différents isotopes, il n'est pas possible de comparer les densités optiques (D.O.) obtenues pour chaque isotype entre elles, c'est pourquoi les résultats sont représentés sous forme d'index d'Ac (moyenne D.O. Ag Ebo-Z / (moyenne + 2 ET D.O. Ag Véro) ± ET. (*) et (**) indiquent une différence significative, ($p < 0,05$) et ($p < 0,01$) respectivement, entre le signal spécifique et le bruit de fond. Aucune réponse IgG4 spécifique n'a été détectée chez ces patients (résultats non présentés).

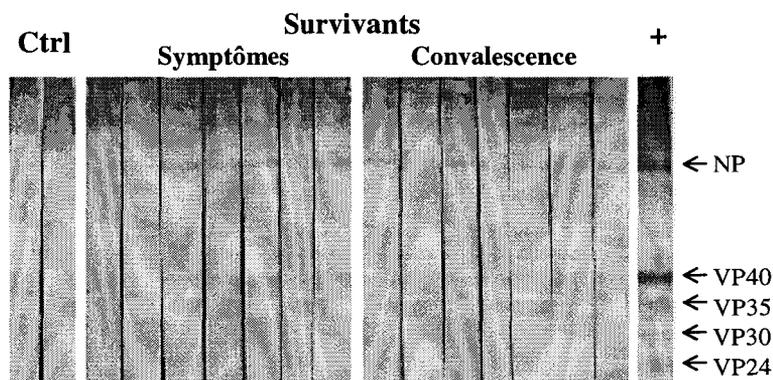


significative, cependant à des taux plus modestes. Les IgG4 n'apparaissent toujours pas, suggérant que cet isotype n'est pas impliqué dans la réponse humorale des survivants des FHV à virus Ebo-Z.

Analyse des Ag reconnus par les IgG par western blot.

L'utilisation d'Ag provenant de la souche Gabon, en dépit des faibles signaux, a permis de mettre en évidence une affinité préférentielle des Ac pour la NP et la VP40 (figure 20). En

Figure 20. Analyse de la réponse IgG spécifique de la souche Gabon par western blot chez les survivants. Un surnageant de culture primaire, inoculé par le plasma d'un patient de Bououé, a été séparé par SDS-PAGE 9% en condition non-dénaturante. Les plasmas sont dilués au $1/25^{\text{ème}}$. Deux témoins endémiques (Ctrl) (10 testés) et 7 survivants, pendant la phase symptomatique et 2-8 jours après les symptômes, sont représentés. Le contrôle positif (+) est une ascite de souris anti-Ebo-Z diluée au $1/1000^{\text{ème}}$. Les positions de la NP, VP40, 35, 30 et 24 sont indiquées par des flèches.

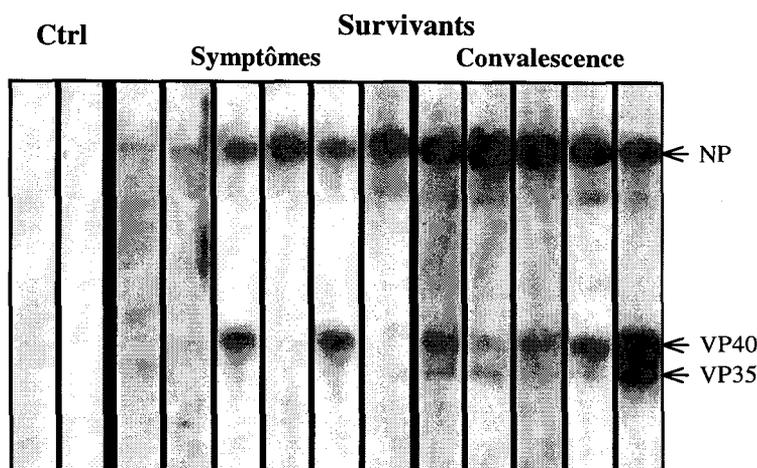


effet, tous les survivants présentent des IgG spécifiques de la NP dès le début de la phase symptomatique, tandis que les Ac anti VP40 sont retrouvés chez certains survivants (3/7) pendant les symptômes et la convalescence (5/7). Cependant, la sensibilité de détection étant très faible, il est possible que certains Ac dirigés contre d'autres protéines virales ne soient pas détectés.

L'utilisation d'Ag Ebo-Z (Mayinga) purifiés et de la chemiluminescence a confirmé l'immunogénicité préférentielle de la NP (figure 21), reconnue précocement au cours de la maladie (dès 3 jours après l'apparition des symptômes) chez tous les survivants. Des IgG

spécifiques de la VP40 sont également présentes chez certains survivants (2/6) (le 3^{ème} plasma contenant des Ac anti VP40 dans la figure 19 étant épuisé, il n'a pu être testé contre Ebo-Z Mayinga) dès la phase symptomatique et sont détectées dans tous les cas après la disparition des symptômes. De plus, l'augmentation de la sensibilité de détection permet la mise en

Figure 21. Détection des IgG spécifiques de la souche Mayinga chez les survivants par western blot. Une préparation purifiée et concentrée de virus Ebo-Z (Mayinga) a été séparé par SDS-PAGE 10% en condition dénaturante. Les IgG spécifiques ont été détectées dans les plasmas, dilués au 1/1000^{ème}, de 10 témoins endémiques (2 sont représentés), de 6 survivants pendant la phase symptomatique et 2-8 jours après la disparition des symptômes (5 patients). Les positions de la NP, VP40 et VP35 sont indiquées par des flèches.



évidence d'IgG spécifiques de la VP35 après la disparition des symptômes chez tous les survivants, les signaux étant faibles chez la plupart (5/6). Par contre, aucune réponse IgG spécifique de la GP (140 kDa), de la GPs (70 kDa), de la VP30 et 24 ne sont détectées chez ces patients.

Ainsi, la réponse humorale des patients ayant survécu à l'infection par le virus Ebo-Z est caractérisée par l'apparition précoce, dès les premiers jours de la phase symptomatique d'IgG spécifiques de la NP, puis de la VP40 et enfin, de la VP35, aucune autre protéine virale ne semblant être reconnue par les Ac.

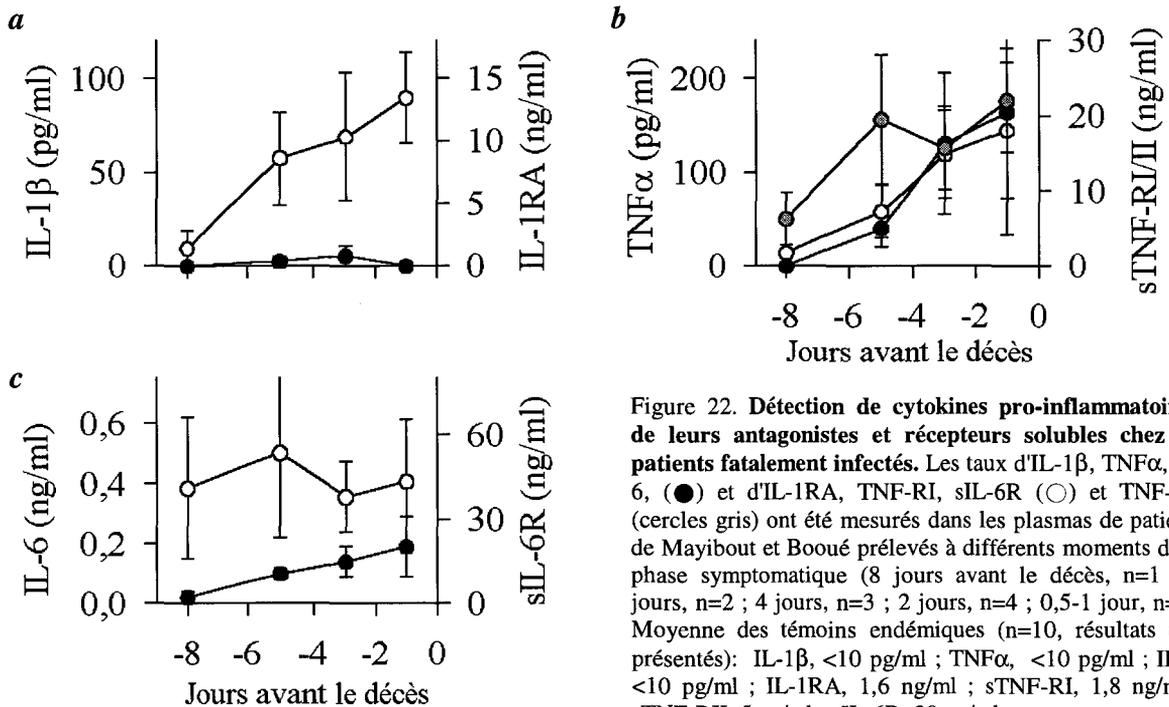
IV. LA REPOSE INFLAMMATOIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS EBO-Z.

Le rôle apparemment crucial de la réponse inflammatoire dans le contrôle de l'infection dans les modèles cobayes (cf Introduction, chapitre IV-2, p86-87), mais également son importance dans l'initiation et la régulation de la réponse immune nous ont conduits à étudier certains paramètres de la réponse inflammatoire chez les patients infectés par le virus Ebo-Z.

1. Une réponse inflammatoire défectueuse associée à l'infection fatale.

Dosage de cytokines pro-inflammatoires, de leurs antagonistes et récepteurs solubles.

Les taux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires – IFN α , IL-12, IL-1 β , tumor necrosis factor alpha (TNF α) et IL-6 et de leurs antagonistes ou récepteurs solubles – IL-1



receptor antagonist (IL-1RA), récepteurs solubles I et II au TNF α (sTNF-RI/II) et récepteur soluble à l'IL-6 (sIL-6R) – ont été mesurés dans les plasmas de patients fatalement infectés par Ebo-Z à différents moments de la phase symptomatique (figure 22). L'IFN α et l'IL-12 ne

sont retrouvés chez aucun patient, décédé ou témoin (résultats non présentés). L'IL-1 β n'est détectée à aucun moment de la maladie chez ces patients, mais des taux croissants et très élevés d'IL-RA apparaissent néanmoins 5 jours avant la mort (figure 22a). Des quantités croissantes de TNF α et de ses 2 récepteurs solubles sont mesurées au même moment (figure 22b). Cependant, les taux de TNF α enregistrés le dernier jour avant le décès sont relativement faibles (environ 150 ± 70 pg/ml) par rapport à ceux des récepteurs solubles, ces derniers présentant des concentrations pondérales plus élevées d'un facteur 100 (sTNF-RI: 18 ± 9 ng/ml ; sTNF-RII: 23 ± 7 ng/ml). L'IL-6 apparaît également au cours de la phase symptomatique pour atteindre des valeurs modestes au moment de la mort (200 ± 31 pg/ml) (figure 22c). Son récepteur soluble présente quant à lui des concentrations un peu plus élevées (environ 2 fois) que les témoins endémiques, mais qui demeurent constantes au cours de la maladie. Aucune réponse inflammatoire précoce n'est donc observée au cours de l'infection fatale, seuls certains médiateurs et récepteurs solubles apparaissant dans les stades terminaux.

Détection de chemokines au cours de l'infection fatale.

Les chemokines macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) α et β , IL-8, ainsi que macrophage chemotactic factor-1 (MCP-1) et RANTES ont été dosées au cours de l'infection fatale. L'IL-8 n'est jamais détectée chez les patients (résultats non présentés) tandis que les concentrations de RANTES (55 ± 15 ng/ml) ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les témoins endémiques (40 ± 12 ng/ml, n=10) (patients de Mayibout, résultats non présentés). MCP-1 n'a pu être dosée que chez 6 décédés de Mayibout en phase symptomatique, qui présentent des concentrations très élevées ($6,7 \pm 3,2$ ng/ml) par rapport aux témoins endémiques ($0,12 \pm 0,05$ ng/ml, n=10) (résultats non présentés). Par contre, les taux des chemokines MIP-1 α et β (respectivement 0,3 et 0,9 ng/ml) observés chez les patients fatalement infectés de Mayibout et Booué ne sont pas significativement différents de ceux des témoins endémiques (figure 23).

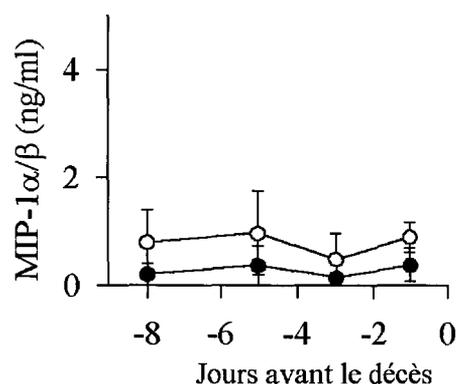


Figure 23. Production de MIP-1 α/β au cours de l'infection fatale. Les taux de MIP-1 α (●) et de MIP-1 β (○) ont été mesurés dans les plasmas de patients décédés (Cf figure 22 pour les détails). Moyenne des témoins endémiques (n=10): MIP-1 α , 0,2 ng/ml ; MIP-1 β , 0,93 ng/ml.

Dosage des dérivés du monoxyde d'azote, de la néoptérine et d'une protéine de phase aiguë.

La teneur en nitrites, métabolite stable du NO[•] permettant d'évaluer la production *in vivo* de ce dernier, a été mesurée au cours de l'infection fatale (figure 24a). Les taux de nitrites sont légèrement supérieurs, mais constants, à ceux des témoins endémiques (2-3 fois plus)

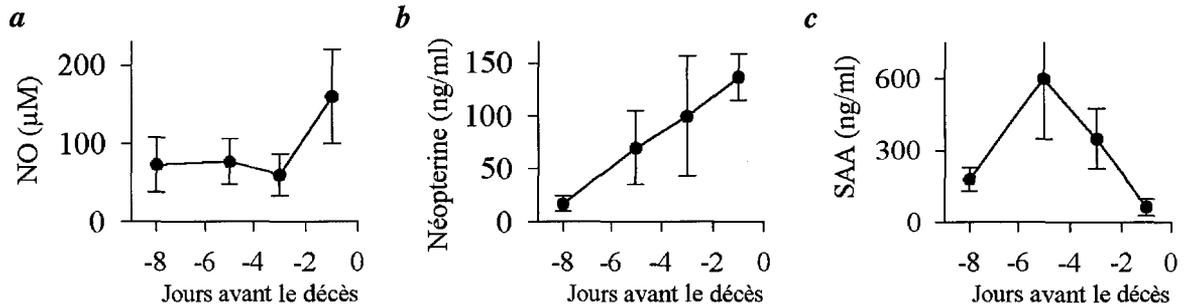


Figure 24. Détection du NO[•], de la néoptérine et de la SAA chez les patients fatalement infectés. Les nitrites, la néoptérine et la SAA ont été mesurés dans les plasmas de patients de Mayibout et Bououé (Cf figure 22 pour les détails). Les moyennes des témoins endémiques (n=10) sont: NO[•], 20 ± 12 µM, néoptérine, 2,2 ± 0,3 ng/ml et SAA, < 20 pg/ml.

tout au long de la phase symptomatique pour atteindre des valeurs élevées 1-2 jours avant la mort. Les concentrations de néoptérine augmentent quant à elles régulièrement au cours de la maladie et sont très élevées la veille du décès (figure 24b). Par contre, la sérum amyloid A (SAA), protéine de phase aiguë, est détectée en grande quantité 4-6 jours avant le décès, mais les taux diminuent par la suite pour retrouver des valeurs normales dans les stades terminaux (figure 24c).

Une production élevée de molécules anti-inflammatoires.

Plusieurs molécules connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires ont été dosées au cours de l'infection fatale. L'IL-13 n'est détectée dans les plasmas d'aucun patient ou témoin endémique de Mayibout (résultats non présentés). Par contre, ces patients présentent des taux de TGFβ supérieurs à ceux des témoins endémiques (47,1 ± 16,9 ng/ml, n=7 et 22,8

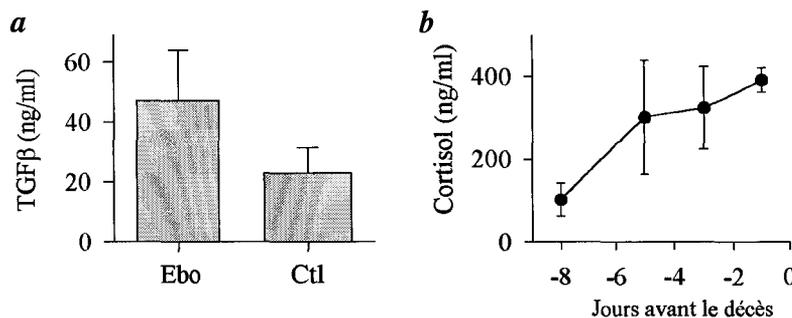


Figure 25. Détection du TGFβ et du cortisol chez les patients fatalement infectés. *a*, le TGFβ a été mesuré dans les plasmas de patients (Ebo, n=7) et témoins endémiques (Ctl, n=10) de Mayibout. *b*, le cortisol a été dosé dans les plasmas de patients de Mayibout et Bououé sur un automate VIDAS® (Cf figure 22 pour les détails). Moyenne des témoins (n=10) pour le cortisol, 92 ± 44 ng/ml.

$\pm 8,7$ ng/ml, $n=5$; $p<0,05$) au cours de la phase symptomatique (figure 25a). Le cortisol est détecté dans les plasmas de patients fatalement infectés de Mayibout et Booué à des taux très élevés (plus de 300 ng/ml) 4-6 jours avant le décès et ces concentrations se maintiennent jusqu'à la mort (figure 25b).

La production d'IL-10 chez les patients décédés a été évaluée non seulement par le dosage de la cytokine dans le plasma, mais également par la détection de l'ARNm dans les PBMC par RT-PCR (figure 26). L'ARNm codant pour l'IL-10 est détecté à partir du premier

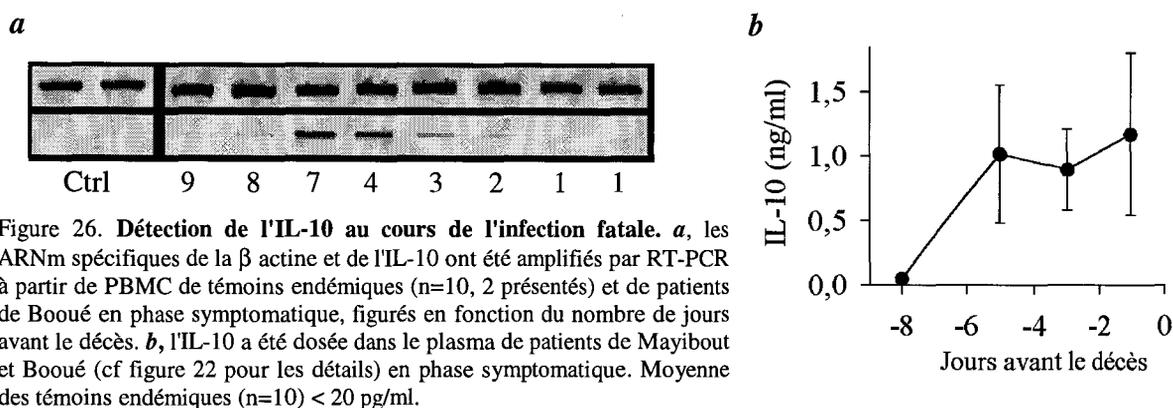


Figure 26. Détection de l'IL-10 au cours de l'infection fatale. *a*, les ARNm spécifiques de la β actine et de l'IL-10 ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de témoins endémiques ($n=10$, 2 présentés) et de patients de Booué en phase symptomatique, figurés en fonction du nombre de jours avant le décès. *b*, l'IL-10 a été dosée dans le plasma de patients de Mayibout et Booué (cf figure 22 pour les détails) en phase symptomatique. Moyenne des témoins endémiques ($n=10$) < 20 pg/ml.

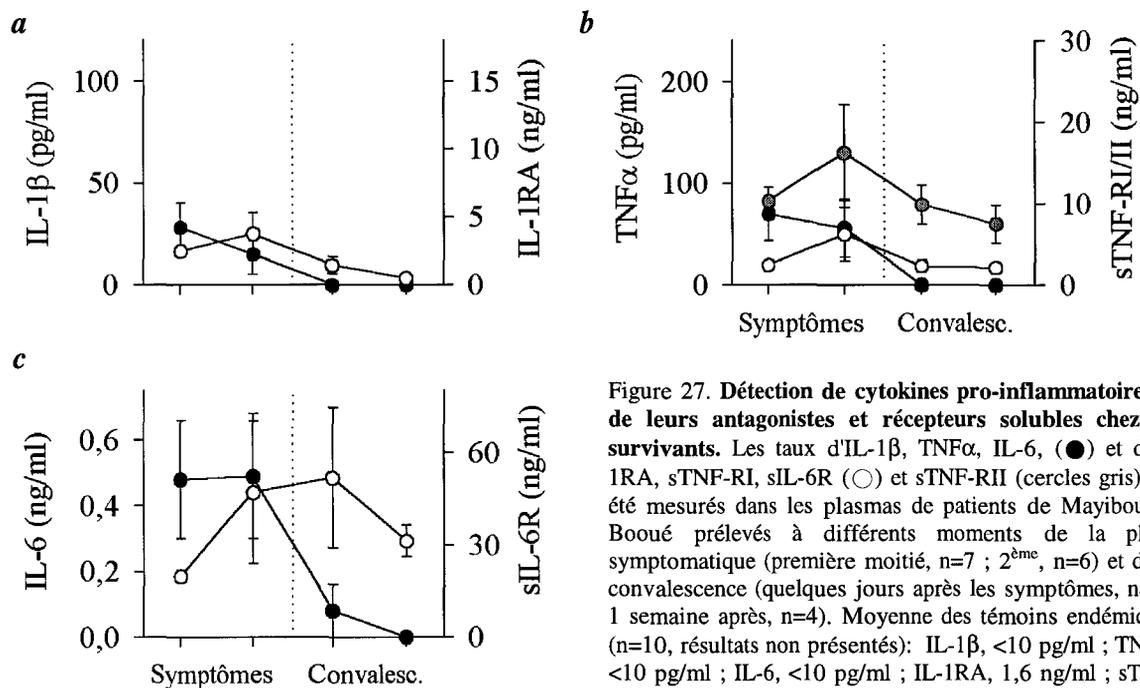
jour de la phase symptomatique (8 jours avant le décès), d'abord faiblement, le signal augmentant par la suite jusque 3-4 jours avant la mort pour s'atténuer 2 jours avant et disparaître la veille de la mort (figure 26a). Tandis que les concentrations d'IL-10 sont faibles le premier jour des symptômes (50 pg/ml), de très grandes quantités de cette cytokine (environ 1 ng/ml) apparaissent à partir de 4-6 jours avant et jusqu'à la mort des patients (figure 26b).

2. Réponse inflammatoire précoce et contrôle de l'infection.

Une synthèse précoce de cytokines pro-inflammatoires.

L'IFN α et l'IL-12, à l'instar de l'infection fatale, ne sont détectés chez les patients survivants ni pendant la phase symptomatique ni la convalescence (résultats non présentés). Par contre, des taux modestes, mais significatifs, d'IL-1 β et de TNF α sont mesurés au début de la phase symptomatique (figure 27a et b). Les concentrations de ces cytokines diminuent pendant la 2^{ème} moitié de la maladie, pour ne plus être détectées pendant la convalescence. Des concentrations croissantes des antagonistes ou récepteurs solubles respectifs – IL-1RA,

sTNF-RI/II – sont observées pendant la phase symptomatique, puis diminuent pendant la convalescence et retrouvent des valeurs normales une semaine après la disparition des symptômes. Il est intéressant de noter que les concentrations plasmatiques de ces antagonistes



ou récepteurs solubles sont nettement inférieures à celles observées au cours de l'infection fatale (IL-1RA, $3,8 \pm 1,6$ vs $13,8 \pm 3,6$ ng/ml ; sTNF-RI, $6,3 \pm 3,3$ vs $18,1 \pm 9$ ng/ml ; sTNF-RII, $16,3 \pm 5,9$ vs $22,0 \pm 6,9$ ng/ml). Des quantités notables d'IL-6 (0,5 ng/ml) sont enregistrées tout au long de la phase symptomatique, puis diminuent après la disparition des symptômes et l'IL-6 n'est plus détectée une semaine après (figure 27c). Les taux du récepteur soluble à l'IL-6 augmentent pendant la phase symptomatique, sont maximums quelques jours après la disparition des symptômes et enfin tendent vers des valeurs normales une semaine après. Ainsi, l'infection non fatale par le virus Ebo-Z est associée à une réponse inflammatoire précoce, suivie de la sécrétion d'antagoniste et de récepteurs solubles.

Une production précoce de chemokines.

L'IL-8 n'est jamais détectée chez les patients survivants (résultats non présentés). Des quantités de RANTES légèrement supérieures à celles des témoins ($64,2 \pm 15,9$ ng/ml, témoins endémiques, 40 ± 12 ng/ml, non significatif) sont détectées chez les patients de

Mayibout en phase symptomatique. Les concentrations de MCP-1 chez ces patients sont par contre très élevées pendant les symptômes ($10,7 \pm 4,2$ ng/ml ; témoins endémiques, $0,12 \pm 0,05$ ng/ml) (résultats non présentés). Des concentrations élevées de MIP-1 α , et plus particulièrement de MIP-1 β sont détectées au début de la phase symptomatique chez les patients survivants de Mayibout et Booué (figure 28), et diminuent à partir de la convalescence et de la 2^{ème} moitié de la phase symptomatique, respectivement pour MIP-1 α et MIP-1 β ; pour ne plus être détectables dans la circulation une semaine après la disparition des symptômes. Ainsi, l'infection non-fatale par le virus Ebo-Z est caractérisée par une production précoce de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines.

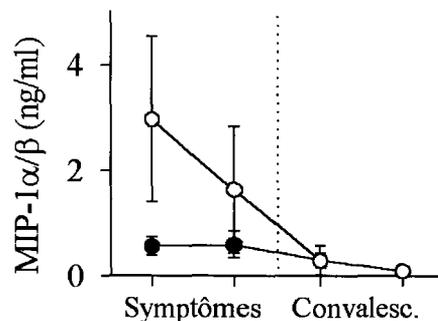


Figure 28. **Détection de MIP-1 α / β chez les survivants.** Les taux de MIP-1 α (●) et de MIP-1 β (○) ont été mesurés dans les plasmas de patients survivants (Cf figure 27 pour les détails). Moyenne des témoins endémiques (n=10): MIP-1 α , 0,2 ng/ml ; MIP-1 β , 0,93 ng/ml.

Dosage du monoxyde d'azote, de la néoptérine et de la SAA au cours de l'infection non-fatale par le virus Ebo-Z.

Les nitrites sont retrouvés en concentrations croissantes mais très variables au cours de la phase symptomatique chez les patients de Mayibout et Booué (figure 29a). Après s'être maintenues quelques jours après la disparition des symptômes, les taux de nitrites retrouvent

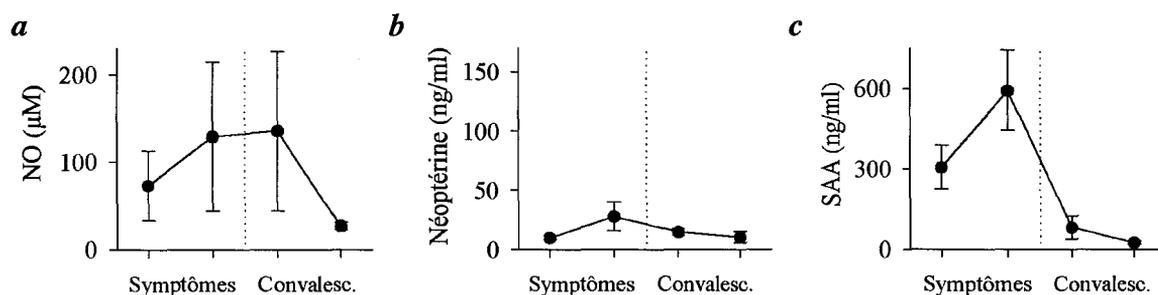


Figure 29. **Détection du NO[•], de la néoptérine et de la SAA chez les patients survivants.** Les nitrites, la néoptérine et la SAA ont été mesurés dans les plasmas de patients de Mayibout et Booué (Cf figure 27 pour les détails). Les moyennes des témoins endémiques (n=10) sont: NO[•], 20 ± 12 μ M, néoptérine, $2,2 \pm 0,3$ ng/ml et SAA, < 20 pg/ml.

une teneur plasmatique normale. Les taux de néoptérine augmentent également pendant la phase symptomatique chez les survivants et diminuent au moment de la convalescence (figure 29b), les valeurs maximales notées chez ces patients étant nettement inférieures à celles

observées chez les patients décédés (28 ± 12 vs 137 ± 22 ng/ml). La SAA est quant à elle détectée en quantités croissantes et élevées pendant la phase symptomatique, mais retrouve très rapidement des valeurs plasmatiques normales dès la disparition des symptômes (figure 29c).

Les molécules anti-inflammatoires au cours de l'infection non-fatale.

L'IL-13 n'est, comme au cours de l'infection fatale, jamais détectée chez les patients survivants (résultats non présentés). Les concentrations de TGF β chez les survivants de Mayibout (n=7) sont légèrement supérieures à celles des témoins endémiques (n=10), mais de façon non-significative ($35,7 \pm 7,5$ vs $26,5 \pm 10,2$ ng/ml, $p > 0,05$, résultats non présentés). Par contre, le cortisol est détecté en grande quantité dès le début de la phase symptomatique et atteint des valeurs similaires à celles observées chez les décédés (figure 30). Cependant, ces taux retournent aux valeurs normales une semaine après la disparition des symptômes.

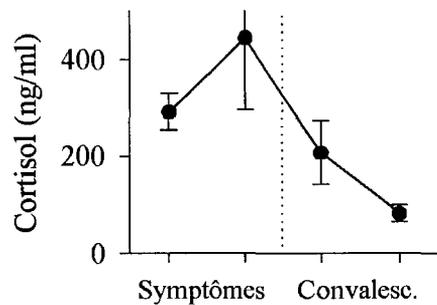


Figure 30. Dosage du cortisol au cours de l'infection non fatale. Le cortisol a été dosé dans les plasmas de patients de Mayibout et Booué sur un automate VIDAS® (Cf figure 27 pour les détails). Moyenne des témoins (n=10), 92 ± 44 ng/ml.

L'ARNm codant pour l'IL-10 n'est pas détecté pendant la phase symptomatique chez les patients survivants, un signal de faible intensité apparaît par contre juste après la disparition des symptômes (figure 31a). L'IL-10 n'est, à l'exception d'un faible taux détecté au début de la phase symptomatique, cependant pas retrouvée dans le plasma des patients survivants de Mayibout et Booué (figure 31b).

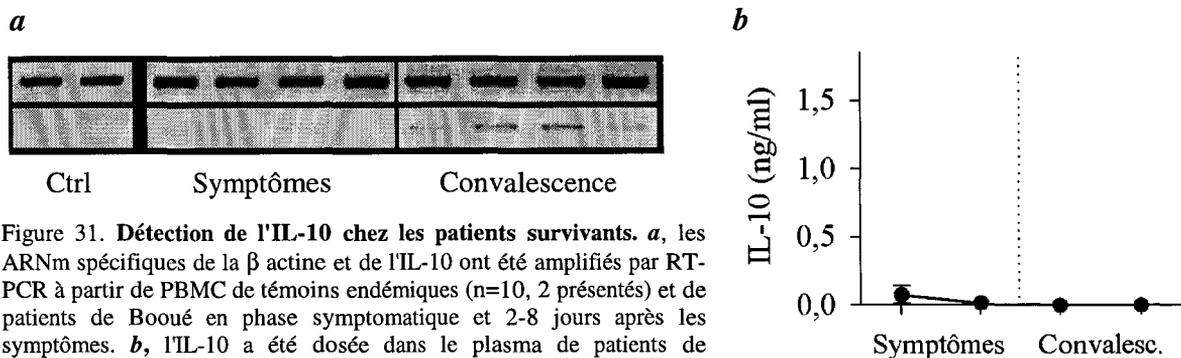


Figure 31. Détection de l'IL-10 chez les patients survivants. *a*, les ARNm spécifiques de la β actine et de l'IL-10 ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de témoins endémiques (n=10, 2 présentés) et de patients de Booué en phase symptomatique et 2-8 jours après les symptômes. *b*, l'IL-10 a été dosée dans le plasma de patients de Mayibout et Booué en phase symptomatique et pendant la convalescence (cf figure 27 pour les détails). Moyenne des témoins endémiques (n=10) < 20 pg/ml.

V. LA REPOSE LYMPHOCYTAIRE T AU COURS DES FHV A VIRUS EBO-Z.

La réponse lymphocytaire T étant cruciale dans l'induction et la régulation des fonctions effectrices de la réponse immune spécifique humorale et cellulaire, différents paramètres, cytokines et marqueurs d'activation (ARNm et/ou protéine), de la réponse lymphocytaire T ont été analysés à partir des plasma et PBMC des patients. Le faible délai (moins de 12h) entre le prélèvement des malades et l'extraction de l'ARN des PBMC a permis de rendre compte d'une manière relativement fidèle de la production *in vivo* des ARNm par les cellules circulantes des patients.

1. Activation précoce de cellules cytotoxiques et apoptose intravasculaire massive sont associées à l'infection fatale.

Analyse de cytokines dédiées aux lymphocytes T, une production élevée d'IFN γ .

Plusieurs cytokines associées à l'activité des lymphocytes T ont été analysées par amplification par RT-PCR de leur ARNm respectif à partir de PBMC de patients de Booué et par le dosage immuno-enzymatique de ces médiateurs solubles dans le plasma de patients de Mayibout et Booué.

Tandis que les ARNm codant pour l'IL-2, et l'IL-5 (résultats non présentés), ne sont jamais détectés chez les patients décédés, de faibles signaux spécifiques de l'ARNm de l'IL-4 sont observés dans les PBMC au début de la phase symptomatique (jusque 4 jours avant la

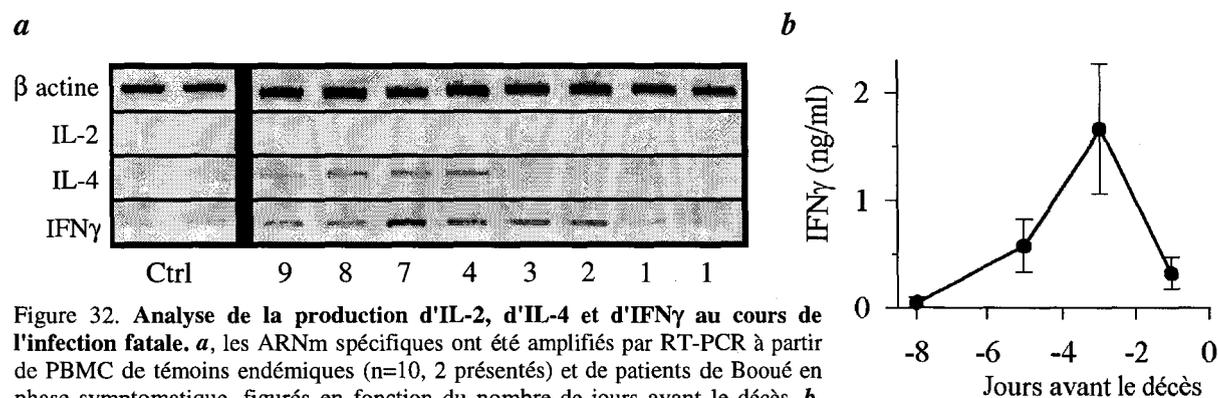


Figure 32. Analyse de la production d'IL-2, d'IL-4 et d'IFN γ au cours de l'infection fatale. *a*, les ARNm spécifiques ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de témoins endémiques (n=10, 2 présentés) et de patients de Booué en phase symptomatique, figurés en fonction du nombre de jours avant le décès. *b*, l'IFN γ a été dosé dans le plasma de patients de Mayibout et Booué en phase symptomatique (cf figure 27 pour les détails). Moyenne des témoins endémiques (n=10) < 20 pg/ml.

mort) (figure 32a). Par contre, l'ARNm codant pour l'IFN γ est retrouvé dès le premier jour de la phase symptomatique, le signal est d'intensité maximale 4-7 jours avant le décès, puis s'atténue voire disparaît la veille de la mort (figure 32a).

L'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5 ne sont jamais détectées dans les plasmas des patients fatalement infectés (résultats non présentés). Des quantités croissantes d'IFN γ sont observées pendant la phase symptomatique – les taux les plus élevés ($1,6 \pm 0,8$ ng/ml) sont enregistrés 3 jours avant le décès, mais les concentrations diminuent cependant la veille (figure 32b), comme cela a été observé pour l'ARNm.

Analyse de marqueurs d'activation associés à la réponse lymphocytaire T.

La détection par RT-PCR des ARNm codant pour différents marqueurs d'activation, et pour certains leur ligand respectif, impliqués dans l'activation des lymphocytes T a été réalisée à partir de PBMC de patients provenant de Booué (figure 33a). L'expression de

a

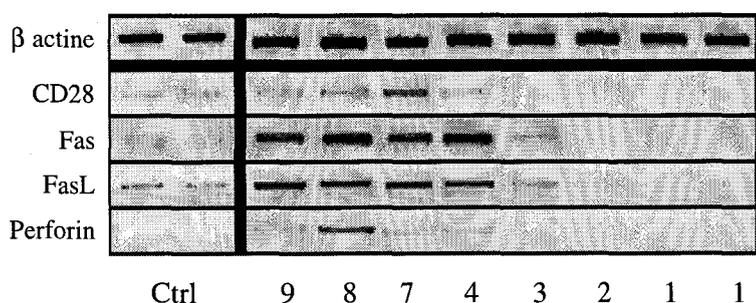
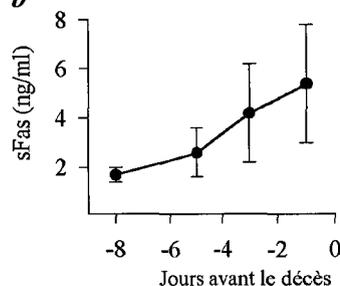
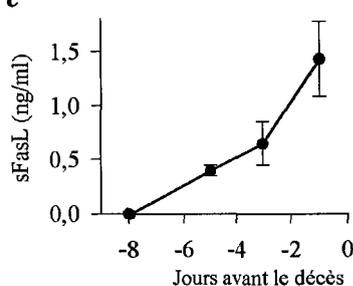


Figure 33. Analyse de marqueurs d'activation associés à la réponse lymphocytaire T au cours de l'infection fatale. *a*, détection d'ARNm spécifiques de différents marqueurs par RT-PCR à partir de PBMC de patients décédés de Booué prélevés pendant la phase symptomatique et figurés en fonction du nombre de jours avant le décès. Deux témoins endémiques ($n=10$) sont représentés. *b*, détection de sFas au cours de l'infection fatale. sFas a été dosé dans les plasmas de patients de Mayibout et Booué prélevés en phase symptomatique (Cf figure 27 pour les détails). Moyenne des témoins endémiques ($n=10$): $1,5 \pm 0,5$ ng/ml. *c*, détection de sFasL au cours de l'infection fatale. Moyenne des témoins endémiques ($n=10$) < 50 pg/ml.

b



c



l'ARNm codant pour le CD28 est similaire entre les témoins endémiques et les patients infectés au début de la phase symptomatique (9-4 jours avant le décès), mais n'est plus détectée les derniers jours de la vie. Les ARNm codant pour Fas (CD95) et son ligand (FasL/CD95L) sont fortement exprimés à partir du début de la phase symptomatique et jusqu'à 4 jours avant le décès chez les patients, ces ARNm n'étant plus détectés les 2-3

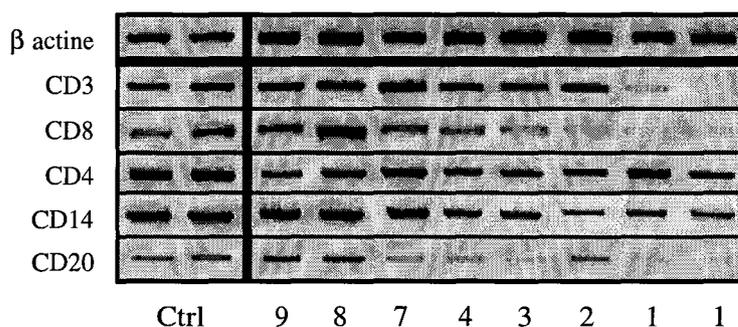
derniers jours. De même, considérant l'absence de signal spécifique de l'ARNm de perforine dans les PBMC des témoins endémiques, ce messager semble être synthétisé de façon significative au début de la maladie, mais n'est plus détecté les derniers jours avant la mort (figure 33a).

L'expression de Fas et FasL a également été évaluée par le dosage de leur forme soluble, sFas et sFasL, dans les plasmas de patients de Mayibout et Booué. Des quantités croissantes de sFas, cependant relativement variables entre les patients, sont détectées au cours de l'infection (figure 33b). Des taux croissants de sFasL sont retrouvés au cours de la phase symptomatique, et atteignent des valeurs très élevées les derniers jours avant la mort ($1,4 \pm 0,3$ ng/ml vs < 50 pg/ml pour les témoins, $n=10$) (figure 33c).

Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC.

Différents marqueurs de surface, spécifiques de différents types de cellules contenues dans les PBMC, ont été analysés par RT-PCR à partir d'ARN extraits de PBMC de patients de Booué obtenus en phase symptomatique. L'ARNm codant pour le CD3 présente une expression soutenue pendant la phase symptomatique, tandis qu'il n'est quasiment plus détecté le dernier jour avant le décès (figure 34). L'ARNm spécifique du CD8 connaît quant à lui une

Figure 34. Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC. Les ARNm codant pour le CD3, CD8, CD4, CD14 et CD20 ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de patients de Booué en phase symptomatique. 2 témoins endémiques sont présentés (Ctrl, 10 testés) et les patients décédés sont représentés en fonction du nombre de jours avant le décès.

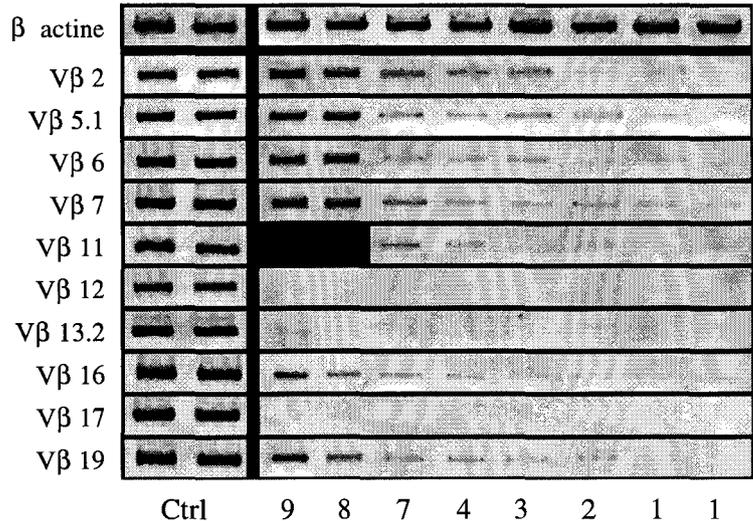


baisse d'expression plus précoce, à partir du 3^{ème} jour avant le décès, et n'est presque plus détecté la veille de la mort. Par contre, les ARNm codant pour le CD4 (exprimé par les lymphocytes T CD4+, mais également par les monocytes) et le CD14 présentent une expression maintenue tout au long de la phase symptomatique, y compris le dernier jour avant la mort. A l'exception des premiers jours de la maladie, l'ARN spécifique du CD20 semble très faiblement exprimé, particulièrement les derniers jours de la phase symptomatique (figure 34).

Analyse du répertoire V β du récepteur des lymphocytes T par RT-PCR.

Afin de déterminer si la diminution de l'expression des ARNm spécifiques des lymphocytes T au cours de l'infection fatale concerne également ou non l'ensemble du répertoire V β du récepteur des lymphocytes T (TCR), l'analyse par RT-PCR de l'expression de fragments, spécifiques de 22 familles différentes, de la région variable de la chaîne β du TCR a été réalisée à partir des PBMC des patients de Booué (figure 35). La grande majorité

Figure 35. Détection d'ARNm spécifiques de différents de TCR-V β au cours de l'infection fatale. Différents ARNm ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de patients de Booué. Les ARNm codant pour un fragment de la partie variable de la chaîne β du TCR (22 différentes familles de V β ont été testées (10 sont figurées, représentatives des autres). Les patients sont présentés en fonction du nombre de jours avant le décès. Deux patients n'ont pu être testés pour le V β 11. Deux témoins endémiques sont présentés (Ctrl, 5 testés)



des ARNm spécifiques des différentes familles (19/22, 7 figurées, représentatives des 12 non présentées) présentent une expression diminuant plus ou moins rapidement au cours de la phase symptomatique et ne sont plus ou presque détectés la veille du décès. Ces ARNm sont néanmoins exprimés les premiers jours de la maladie à un niveau similaire à ceux des témoins endémiques pour la plupart de ces familles (figure 35).

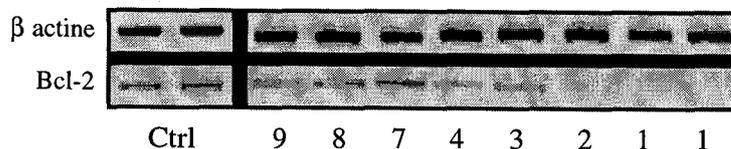
Les ARNm codant pour les V β 12, 13.2 et 17 présentent la particularité de n'être jamais détectés au cours de la phase symptomatique chez ces patients (à l'exception d'un faible signal spécifique du V β 13.2 noté le premier jour de la maladie), bien que ces 3 familles soient normalement représentées chez les témoins endémiques (figure 35).

Mise en évidence de mort cellulaire intravasculaire par apoptose.

La disparition des ARNm spécifiques des lymphocytes T, et dans une moindre mesure B, suggérant une relocalisation ou une délétion de ces lymphocytes de la circulation, l'expression de l'ARNm codant pour Bcl-2, une protéine impliquée dans la régulation de l'apoptose a été étudiée par RT-PCR dans les PBMC des patients de Booué. Tandis que

l'expression de Bcl-2 est similaire à celle observée chez les contrôles au début de la maladie, les derniers jours avant la mort sont caractérisés par une diminution de la synthèse de l'ARNm

Figure 36. **Détection de l'ARNm codant pour Bcl-2.** Les ARNm spécifiques de l'actine et de Bcl-2 ont été amplifiés par RT-PCR dans les PBMC de patients de Booué en phase symptomatique et représentés en fonction du nombre de jours avant le décès. 2 témoins endémiques sont figurés (10 testés).



spécifique de Bcl-2 par les PBMC.

Une protéine nucléaire clivée et solubilisée lors des processus d'apoptose, la protéine de matrice nucléaire 41/7 (NMP 41/7) (234), apparaît dans le plasma des patients fatalement infectés de Mayibout et Booué à partir de 4-6 jours avant la mort, des taux élevés étant observés jusqu'au décès (figure 37). Cette protéine n'est cependant pas détectée dans les prélèvements obtenus les premiers jours de la phase symptomatique (9 et 8 jours avant le décès), ni chez les témoins endémiques et les patients survivants, en phase symptomatique et en proche convalescence (résultats non présentés).

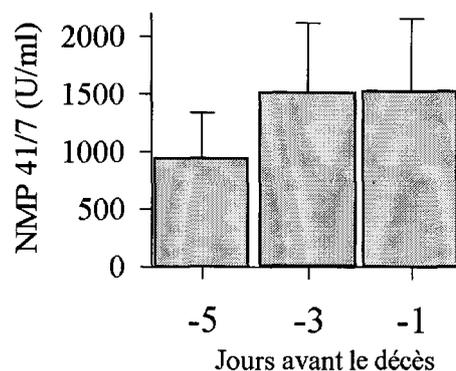
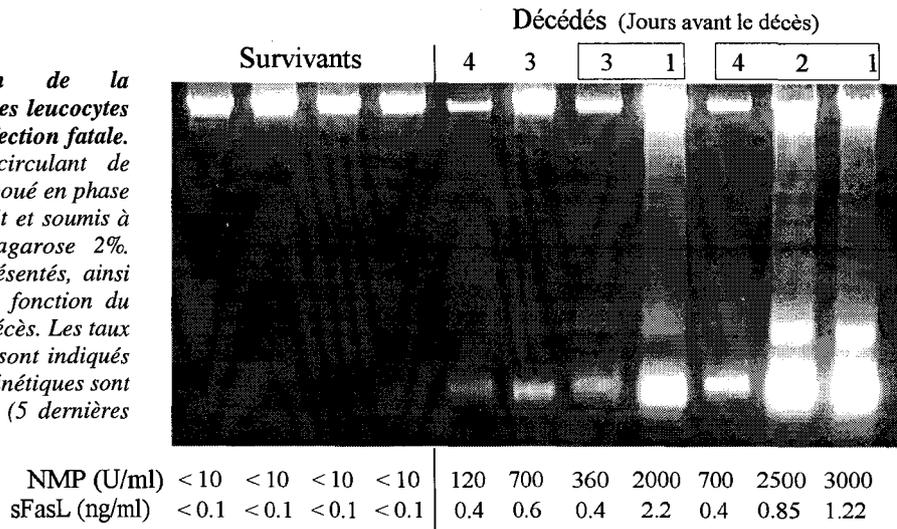


Figure 37. **Détection de la NMP 41/7 dans le plasma au cours de l'infection fatale.** La NMP 41/7 a été dosée par ELISA dans le plasma de patients de Mayibout et Booué (5 jours avant la mort, n=5 ; 3 jours, n=6 ; 1 jour, n=6). Les taux de NMP dans les plasmas de témoins endémiques (n=10) et de patients survivants (n=7) sont en dessous des limites de détection (40 U/ml) (résultats non présentés).

Afin de confirmer l'existence de phénomènes massifs de mort cellulaire intravasculaire par apoptose au cours de l'infection fatale, l'ADN des leucocytes du sang circulant a été extrait chez les patients de Booué, survivants et décédés, et soumis à une électrophorèse sur agarose. Tandis que l'ADN extrait des leucocytes de survivants en phase symptomatique, mais aussi de témoins endémiques (n=10, résultats non présentés), migre sous une forme intègre non fragmentée, l'ADN des patients décédés présente des fragments multiples de 200 pb, caractéristiques de la fragmentation induite par les endonucléases au cours de la mort cellulaire par apoptose (figure 38). Ainsi, la fragmentation est détectée chez les patients fatalement infectés au moins 4 jours avant le décès et jusqu'à la mort. De plus, les concentrations élevées de NMP 41/7 et l'accumulation de fragments d'ADN de 200 pb observées les derniers jours avant la mort suggèrent une corrélation entre la fragmentation de

Figure 38. Détection de la fragmentation de l'ADN des leucocytes circulant au cours de l'infection fatale. L'ADN des leucocytes circulant de survivants et décédés de Booué en phase symptomatique a été extrait et soumis à une électrophorèse sur agarose 2%. Quatre survivants sont présentés, ainsi que 4 décédés figurés en fonction du nombre de jours avant le décès. Les taux de NMP 41/7 et de sFasL sont indiqués pour chaque patient. Des cinétiques sont présentées pour 2 patients (5 dernières pistes).



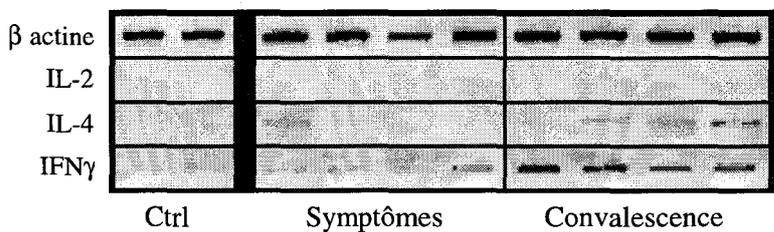
l'ADN et la présence de cette protéine dans le plasma. De même, les taux de NMP 41/7, qui peuvent être considérés comme un indicateur de l'intensité de la mort cellulaire, sont corrélés à ceux de sFasL ($r = 0,71$, $p < 0,05$, $n = 12$, résultats non présentés) (figure 38).

2. L'activation de lymphocytes T cytotoxiques est corrélée à la disparition de l'antigénémie chez les patients survivants.

Détection de cytokines dédiées aux lymphocytes T.

L'ARNm codant pour l'IL-2 n'est pas détecté dans les PBMC de survivants provenant de Booué, à l'exception d'un très faible signal enregistré chez un patient convalescent (figure

Figure 39. Analyse de l'expression des ARNm de l'IL-2, IL-4 et IFN γ chez les survivants. Les ARNm spécifiques ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de témoins endémiques ($n=10$, 2 présentés) et de patients de Booué en phase symptomatique et 2-8 jours après les symptômes.

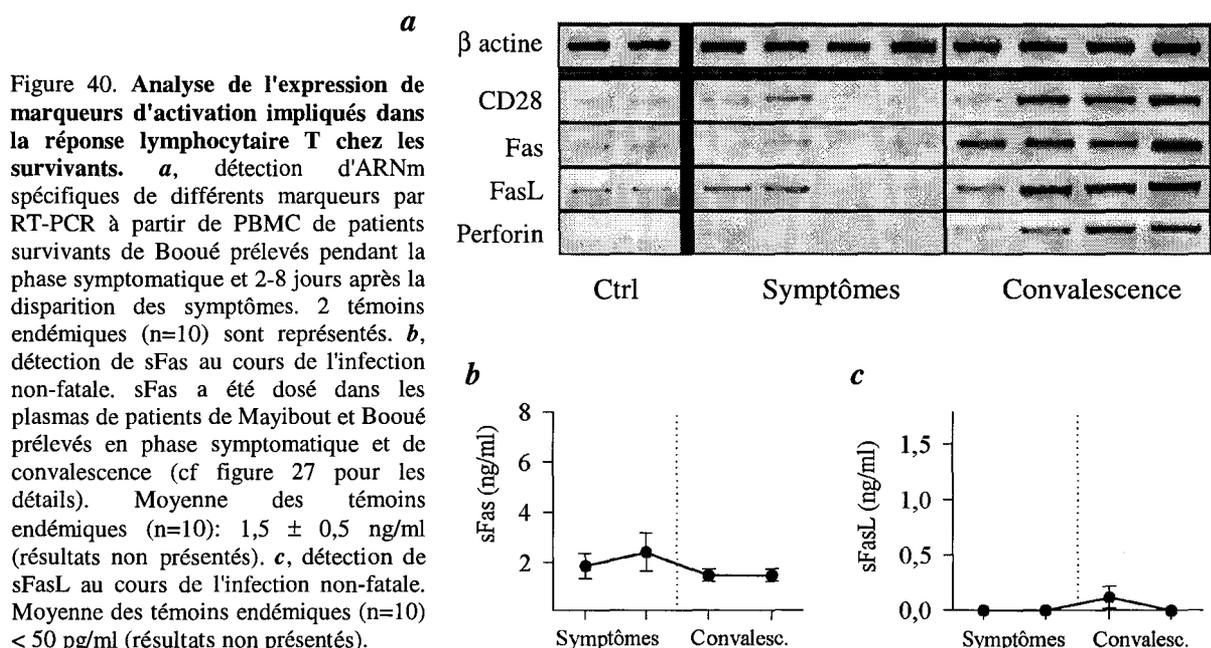


39). De même, l'ARNm spécifique de l'IL-4 n'est que faiblement détecté, chez un patient en phase symptomatique et chez certains patients convalescents. Par contre, l'ARNm de l'IL-5 n'est jamais détecté dans les PBMC de ces patients (résultats non présentés). Tandis que le niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'IFN γ chez les patients en phase symptomatique est similaire aux témoins endémiques, une synthèse prononcée de ce messenger est détectée juste après la disparition des symptômes et pendant la première semaine de la convalescence (figure 39).

Ces cytokines, y compris l'IFN γ , ne sont par contre pas détectées dans le plasma des survivants, pendant la phase symptomatique et la proche convalescence (résultats non présentés), contrastant ainsi avec l'expression de certains messagers comme celui de l'IFN γ .

Analyse de marqueurs d'activation associés à la réponse lymphocytaire T.

Contrairement aux patients décédés, l'analyse de l'expression des ARNm spécifiques de différentes molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T ne montre pas d'expression précoce de ces marqueurs (figure 40a). En effet, l'expression des ARNm est



similaire à celle des témoins endémiques pendant la phase symptomatique. Une forte expression de ces ARNm est d'ailleurs notée juste après la disparition des symptômes, mais cette synthèse diminue rapidement quelques jours après. Par contre, une forte expression des ARNm spécifiques de CD28, Fas, FasL, et perforine est observée dès la disparition des symptômes et jusqu'à une semaine après. De même, une forte expression de l'ARNm codant pour Bcl-2 est également observée après la disparition des symptômes, après s'être maintenue au niveau des témoins endémiques pendant la période symptomatique (figure 40a).

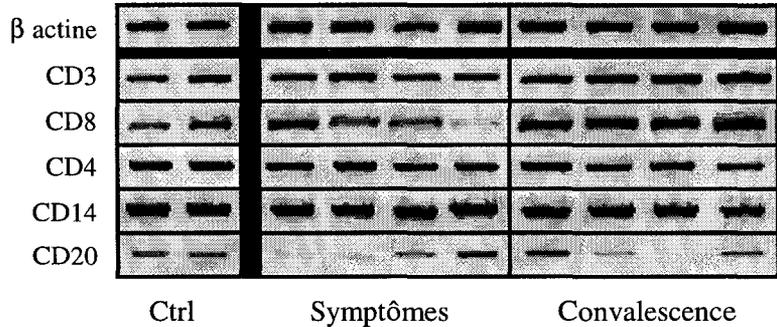
Tandis qu'une légère augmentation de la concentration de sFas, cependant non-significative par rapport aux témoins endémiques, est observée pendant la phase symptomatique chez ces patients, les taux retrouvent des valeurs normales après la disparition des symptômes (figure 40b). Par contre, les concentrations de sFasL sont inférieures au seuil

de sensibilité du test pendant la phase symptomatique, mais de faibles taux transitoires sont détectés quelques jours après la disparition des symptômes (figure 40c).

Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC.

L'expression de l'ARNm codant pour le CD3 est similaire à celle observée chez les témoins endémiques pendant la période symptomatique des survivants, mais semble

Figure 41. Détection d'ARNm spécifiques de sous-types de PBMC au cours de l'infection non-fatale. Les ARNm codant pour le CD3, CD8, CD4, CD14 et CD20 ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de patients de Booué en phase symptomatique ou 2-8 jours après la disparition des symptômes. 2 témoins endémiques sont présentés (Ctrl, 10 testés).

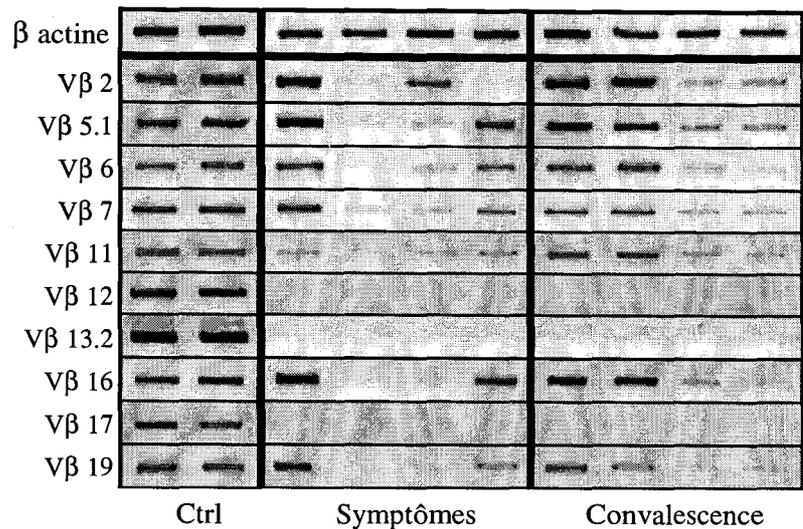


légèrement augmentée pendant la convalescence (figure 41). De même, tandis que la synthèse de l'ARNm du CD8 est équivalente pendant les symptômes à celle des témoins, à l'exception d'un patient l'exprimant faiblement, la convalescence est caractérisée par une forte expression de cet ARNm. Par contre, les ARNm codant pour le CD4 et le CD14 présentent des niveaux constants et similaires aux témoins quelle que soit la période. Enfin, l'expression de l'ARNm du CD20, bien qu'irrégulière, semble cependant un peu plus élevée que celle des témoins, de manière transitoire, à la fin de la période symptomatique et quelques jours après (figure 41).

Etude du répertoire V β par RT-PCR dans les PBMC de survivants.

Le répertoire V β a été étudié chez les survivants de Booué de la même manière que pour les patients décédés. Deux types de cinétique sont là encore observés en ce qui concerne l'expression des ARNm codant pour les 22 différentes familles de TCR-V β (figure 42). Pour la grande majorité des V β étudiés (tous sauf le 12, le 13.2 et le 17), l'expression est diminuée pendant la phase symptomatique, particulièrement chez un patient (2^{ème} des 4 patients en symptômes), tandis qu'une expression soutenue, mais transitoire, est notée juste après la disparition des symptômes (figure 42).

Figure 42. Détection d'ARNm spécifiques de différentes familles de TCR-V β au cours de l'infection non-fatale. Différents ARNm ont été amplifiés par RT-PCR à partir de PBMC de patients de Booué en phase symptomatique ou 2-8 jours après les symptômes. Les ARNm codant pour un fragment de la partie variable de la chaîne β du TCR (22 différentes familles de V β ont été testées (10 sont figurées, représentatives des autres). Deux témoins endémiques sont présentés (5 testés).



Par contre, les ARNm codant pour les V β 12, 13.1 et 17 ne sont, à l'instar des patients décédés, jamais détectés chez les patients survivants pendant la phase symptomatique et la proche convalescence (figure 42). Par contre, l'expression de ces 3 familles de V β est similaire à celle des autres chez les témoins endémiques ($n=10$).

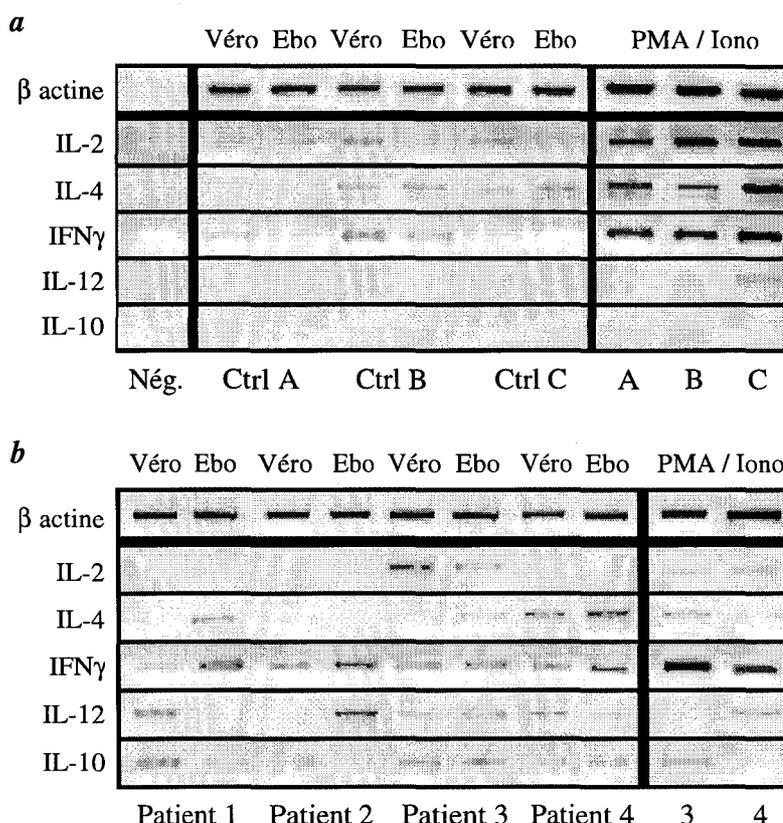
Stimulation *in vitro* de PBMC de convalescents par des Ag Ebo-Z.

Lors de l'épidémie de Mayibout, des PBMC ont été obtenus chez 4 cas primaires 17 jours après le contact infectieux (8 jours après l'apparition des symptômes), 0-3 jours après la disparition des symptômes. Dans le but d'étudier leur réactivité par rapport aux Ag viraux, ces PBMC, mais également ceux de 3 témoins endémiques, ont été stimulés *in vitro* par des Ag Ebo-Z (Mayinga) ou par un mitogène. L'expression de différents ARNm codant pour des cytokines et des marqueurs d'activation a été analysée 16 h après la stimulation antigénique.

Expression de cytokines en réponse à la stimulation.

Les Ag Ebo-Z n'induisent aucune augmentation de l'expression des ARNm spécifiques de l'IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 et IL-10 dans les PBMC des témoins endémiques par rapport à la stimulation contrôle (surnageant cellule Véro E6), tandis que des signaux de forte intensité sont observés pour les ARNm de l'IL-2, IL-4 et IFN γ en réponse au phorbol myristate acétate (PMA) et ionomycine (figure 43a).

Figure 43. Stimulation *in vitro* de PBMC de survivants et de témoins par des Ag Ebo-Z, analyse des cytokines. Les PBMC de 4 survivants de l'épidémie de Mayibout, prélevés juste après la disparition des symptômes, mais aussi ceux de 3 témoins endémiques, ont été stimulés par des Ag Ebo-Z, un surnageant Véro E6 (négatif Ag) ou un mélange de PMA (1 µg/ml) et de ionomycine (0,4 µg/ml). Les ARN ont été extraits après 16h à 37°C et les ARNm codant pour la β actine, l'IL-2, l'IL-4, l'IFNγ, l'IL-12 et l'IL-10 ont été amplifiés par RT-PCR. *a*, stimulation des PBMC des témoins endémiques. Le contrôle négatif d'amplification sans ADNc est figuré à gauche (Nég.). *b*, stimulation des PBMC de survivants. L'expression des ARNm en réponse aux Ag Ebo-Z est présentée pour 4 patients, tandis que les réponses à la stimulation mitogénique ne sont figurées que pour 2 d'entre eux.

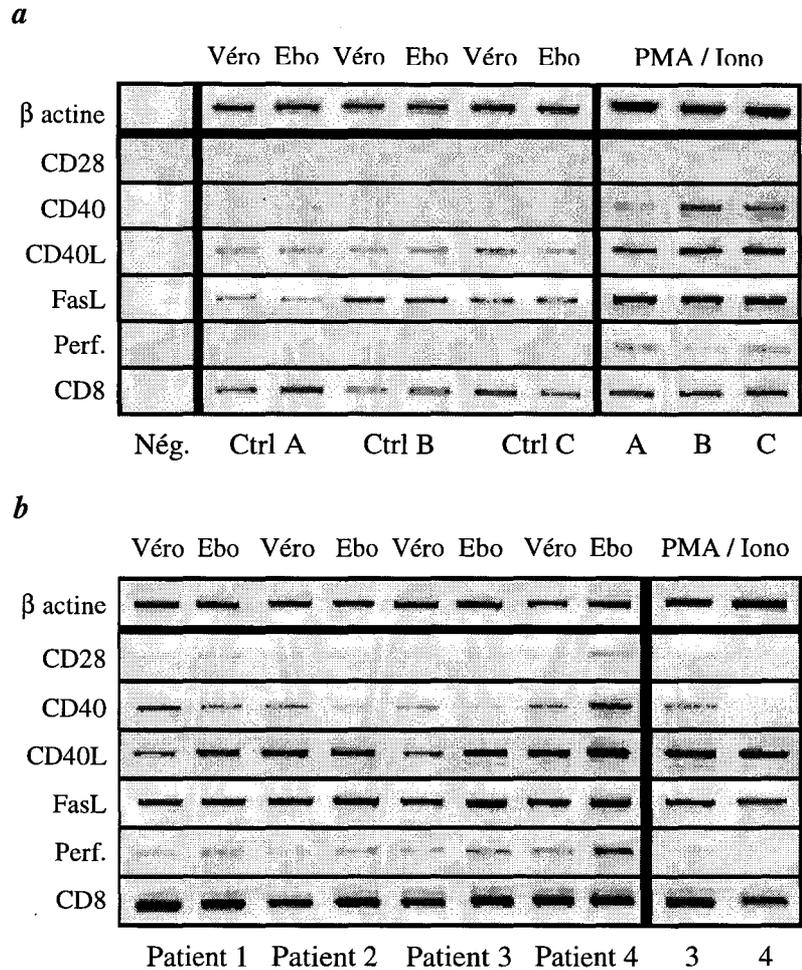


Par contre, cette stimulation mitogénique n'induit, dans les PBMC des patients survivants, qu'une forte expression de l'ARNm de l'IFNγ, la synthèse des ARNm codant pour l'IL-2 et l'IL-4 étant faible et celle de l'IL-12 et l'IL-10 modérée ou inexistante (figure 43b). Aucune modification de l'expression des ARNm de l'IL-2 et de l'IL-10 n'est observée en réponse aux Ag Ebo-Z, tandis que la synthèse de l'ARNm spécifique de l'IL-12 est diminuée chez les patients 1 et 2 et stable chez les 2 autres. Une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour l'IL-4 est notée chez les patients 1 et, dans une moindre mesure, 4. Enfin, la synthèse de l'ARNm de l'IFNγ augmente nettement chez 2 patients et également chez un 3^{ème} en réponse aux Ag Ebo-Z, en dépit d'une expression basale relativement élevée de ce messenger. Cette expression constitutive de certains messagers chez les survivants comparativement aux témoins endémiques est d'ailleurs probablement liée au moment du prélèvement, qui coïncide avec l'activation des lymphocytes T observée précédemment chez les patients de Booué.

Expression de marqueurs d'activation en réponse à la stimulation.

Plusieurs ARNm codant pour des molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T ont été analysés par RT-PCR après stimulation des PBMC des témoins endémiques et des survivants. Aucune expression de l'ARNm codant pour le CD28 n'est détectée dans les PBMC des témoins endémiques, y compris en réponse au mitogène (figure

Figure 44. Stimulation *in vitro* de PBMC de survivants et de témoins par des Ag Ebo-Z, analyse des marqueurs d'activation. Les détails concernant les patients et les stimulations sont les mêmes que pour la figure 43. Les ARNm codant pour le β actine, CD28, CD40, CD40L, FasL, perforine et CD8 ont été amplifiés par RT-PCR. *a*, stimulation des PBMC des témoins endémiques. Le contrôle négatif d'amplification sans ADNc est figuré à gauche (Nég.). *b*, stimulation des PBMC de survivants. L'expression des ARNm en réponse aux Ag Ebo-Z est présentée pour 4 patients, tandis que les réponses à la stimulation mitogénique ne sont figurées que pour 2 d'entre eux.

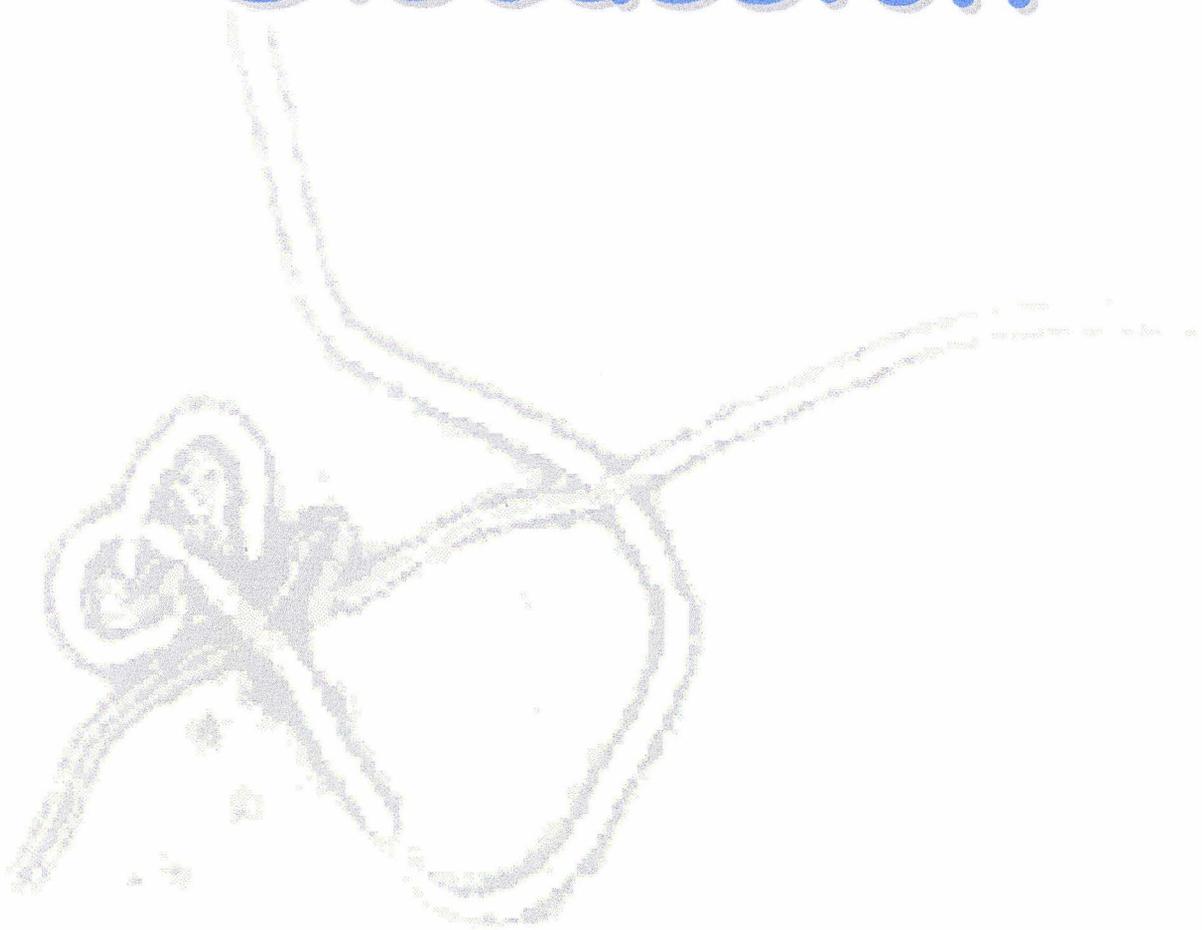


44 a). Les ARNm du CD40 et de perforine sont quant à eux détectés uniquement en réponse à la PMA/ionomycine, aucune synthèse n'étant observée suite à la stimulation antigénique. Les ARNm codant pour le CD40L, FasL et CD8 sont détectés de façon constitutive dans les PBMC des témoins endémiques, mais leur expression n'augmente pas lors de la stimulation par les Ag Ebo-Z (figure 44a).

L'ARNm du CD28 est exprimé très faiblement de façon constitutive dans les PBMC des patients et la synthèse augmente légèrement en réponse à la stimulation par les Ag Ebo-Z chez 2 survivants (figure 44b). L'ARNm codant pour le CD40 est exprimé de façon irrégulière chez les convalescents, tant en réponse aux Ag Ebo-Z qu'à la PMA/ionomycine. Par contre,

l'expression des ARNm spécifiques du CD40L et de FasL, bien qu'élevée de façon constitutive, augmente chez 3 patients sur 4, mais ce dernier patient (patient 2 pour CD40L et 1 pour FasL) présente néanmoins un très fort signal constitutif. Enfin, l'ARNm codant pour le CD8 est exprimé très fortement dans tous les cas (figure 44b).

Discussion



Les fièvres hémorragiques à virus Ebo-Z (souche Gabon).

Silencieux en Afrique depuis plus de 15 ans après une première période d'activité entre 1976 et 1979, le virus Ebola est brutalement réapparu dans les années 1994 à 1996 ; d'abord en Côte d'Ivoire et au Gabon, puis en RDC et 2 fois encore au Gabon. La survenue d'épidémies de FHV à virus Ebola ne semble donc pas aléatoire mais plutôt cyclique, certaines périodes semblant propice à la circulation virale. Le réservoir du virus Ebola étant encore inconnu à ce jour, il est difficile de savoir quels facteurs favorisent cette circulation ou la rencontre entre l'homme ou les PNH et le réservoir. Des modifications climatiques comme le degré de pluviométrie (par exemple, la survenue d'épidémies de fièvre de la vallée du Rift au Kenya est corrélée aux périodes de fortes pluviométrie favorisant l'expansion du moustique vecteur (235)) ou bien des pressions écologiques intervenant sur la densité du réservoir pourraient expliquer cette cyclicité dans la transmission des FHV à virus Ebola.

Aucune indication concernant le réservoir du virus Ebola n'a pu être déduite des observations concernant les 3 épidémies Gabonaises. En effet, les cas index de l'épidémie de Mayibout, et probablement également de Mekouka (16), se sont contaminés au contact d'un PNH, et celui de l'épidémie de Booué n'a pu être documenté. La transmission inter-humaine du virus Ebo-Z a été causée, comme pour les autres épidémies, par des contacts (soins aux malades, cérémonies funéraires) avec des patients en période symptomatique (9, 40, 128). Les mesures adéquates de protection du personnel soignant ayant été mises en place dès la première épidémie, aucune transmission nosocomiale (à l'exception du médecin Librevillois et de l'infirmière Sud-Africaine) n'est survenue lors de ces 3 épidémies. Enfin, l'expérience a montré, comme lors d'autres épidémies de FHV à virus Ebo-Z (75) que des mesures très strictes d'isolement des patients étaient indispensables à l'éradication rapide des épidémies, afin d'éviter, comme à Booué, la dispersion des patients et la survenue de foyers épidémiques secondaires.

Les cas primaires de l'épidémie de Mayibout, décédés et survivants, ont présenté une période d'incubation d'environ 8 jours (6-9), ce qui est similaire à celle observée lors des épidémies d'Ebo-Z de Yambuku (6,3 jours par voie cutanée ou parentérale) (9) et de Kikwit (6,2 jours ; 5-8) (128), mais aussi lors d'infections par Ebo-S (7-14 jours) (11) ou Ebo-CI (8 jours) (129). Les symptômes et signes observés au cours des épidémies Gabonaises se sont

révélés similaires à ceux rencontrés à Yambuku (9) et Kikwit (128). Les taux de mortalité enregistrés lors des 2 derniers épisodes Gabonais, respectivement 68 et 75%, sont légèrement inférieurs à ceux des épidémies Congolaises (respectivement 88 et 81% pour Yambuku et Kikwit), mais la mortalité très élevée observée lors de l'épisode de Yambuku peut être attribuée à la transmission par voie parentérale pour de nombreux patients, connue pour sa grande létalité. Le taux de mortalité plus faible enregistré lors du premier épisode Gabonais (59%) peut provenir de la présence de patients atteints de fièvre jaune, cette pathologie étant caractérisée par une mortalité inférieure (environ 15-20 %) (236). Les symptômes et signes observés au cours de ces 2 épidémies sont similaires et les différences apparaissant dans les tableaux IV & V sont liées aux méthodes très différentes de recueil des informations cliniques. En effet, le tableau clinique des patients de Mayibout a été décrit spontanément par le médecin tandis qu'un questionnaire pré-établi relativement exhaustif était rempli par le praticien lors de l'épisode de Booué. Le tableau clinique induit par le virus Ebo-Z (souche Gabon) est d'ailleurs très voisin de celui observé lors des épidémies Congolaises de FHV à virus Ebo-Z. Les symptômes et signes identifiables de façon objective comme la température élevée, les diarrhées et vomissements, les hyperémies conjonctivales, et les signes hémorragiques ont en effet été observés à des fréquences similaires, seuls certains symptômes comme les céphalées, arthralgies, myalgies et douleurs abdominales ont été enregistrés à des fréquences différentes (9, 16, 40, 128). La durée de la phase symptomatique des patients décédés ($6,8 \pm 1,6$ jours) semble légèrement inférieure à celle observée lors de l'épisode de Kikwit (10,1 jours, 3-21) (128). Cependant, cette différence ne semble pas significative, et peut également provenir de l'appréciation délicate du moment de l'apparition des premiers symptômes.

La RT-PCR du gène L d'Ebo-Z, un puissant outil de diagnostic.

Le rôle prépondérant du CIRMF en matière de diagnostic des FHV lors des différentes épidémies survenues au Gabon, mais également dans le cadre de la surveillance épidémiologique des cas cliniques suspects, a rendu nécessaire l'acquisition de méthodes de diagnostic des FHV à virus Ebola. La détection des Ag circulants d'Ebo-Z et des IgM et IgG spécifiques d'Ebo-Z (souche Mayinga) étaient les seules techniques dont disposait le CIRMF lors des épidémies Gabonaises. Le lot d'Ag utilisé pour le test d'immuno-capture des IgM

spécifiques du virus Ebo-Z étant dégradé, il n'a pu être utilisé lors de l'épidémie de Booué, et la détection des IgM spécifiques a été réalisée par l'équipe du CDC (Atlanta) pour les patients de cette épidémie. Cependant, ces outils (fournis gracieusement par le CDC d'Atlanta) étaient alors relativement nouveaux et aucune validation de leur utilisation sur le terrain n'était à ce moment disponible. L'évaluation de ces différentes méthodes de dépistage a donc été nécessaire et a permis de mettre en évidence plusieurs limites majeures de ces techniques, mais surtout la valeur de la RT-PCR du gène L du virus Ebo-Z comme outil de diagnostic.

La détection des Ag circulants, technique très sensible pendant la phase symptomatique de la maladie (24 patients positifs sur 26 présentant des symptômes spécifiques) et d'une bonne spécificité, perd très rapidement sa sensibilité dès la disparition des symptômes. Les Ac IgM et IgG, bien que détectés chez tous les survivants très précocement au cours de la phase symptomatique et plusieurs semaines après la disparition des symptômes, ne permettent de dépister qu'un patient décédé sur 3 en ce qui concerne les IgM, et aucun pour les IgG spécifiques. Ces limitations majeures font de la détection des Ac un outil plutôt adapté au diagnostic rétrospectif des patients survivants. De plus, ces techniques nécessitent pour leur utilisation l'obtention de réactifs spécifiques non commercialisés (Ag Ebo-Z, Ac anti Ebo-Z), ce qui représente une limitation supplémentaire.

La RT-PCR du gène L d'Ebo-Z à partir d'ARN extraits des PBMC de patients a été développée à l'aide d'amorces qui nous ont été communiquées par A. Sanchez (CDC, Atlanta), et publiées récemment (54). L'application au diagnostic des FHV à virus Ebola de la RT-PCR a donné des résultats très intéressants, tant sur le plan de la sensibilité que de la spécificité. En effet, le fragment spécifique de 420 pb est détecté chez tous les patients en phase symptomatique (y compris le premier jour de la maladie), décédés ou survivants, et même chez quelques patients quelques jours après la disparition des symptômes. La positivité en RT-PCR semble donc coïncider avec la période pendant laquelle les Ag circulants sont détectés dans le plasma, ce qui a récemment été démontré par A. Sanchez (54). La RT-PCR est donc un outil très sensible pendant la phase symptomatique, et très spécifique, puisque sur 10 témoins endémiques sains et 20 patients fébriles, dont l'étiologie n'était pas liée à Ebo-Z, un seul résultat faussement positif a été noté chez un témoin sain (E.M. Leroy, S. Baize *et al*, *J. Med. Virol.*, sous presse). Une 2^{ème} étape de PCR, destinée à amplifier un fragment de 298 pb

interne au premier produit de PCR de 420 pb, permet une augmentation substantielle de la sensibilité, sans perte de spécificité. En effet, cette étape supplémentaire permet de détecter le fragment de 298 pb chez tous les survivants pendant au moins 15 jours après la disparition des symptômes, et surtout chez des personnes ayant eu des contacts très proches avec des patients mais demeurées asymptomatiques. Ces personnes, infectées par le virus Ebola mais ne développant pas de symptôme, possèdent par ailleurs des IgM et IgG spécifiques du virus Ebo-Z 3 semaines après le premier contact potentiellement infectieux (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis). La valeur de la RT-PCR pendant la période d'incubation n'a malheureusement pu être évaluée par manque d'échantillon. D'autres avantages de ce nouvel outil de diagnostic des FHV à virus Ebola sont la facilité et la rapidité de mise en œuvre, nécessitant néanmoins quelques équipements de laboratoire, et surtout l'utilisation de réactifs très communs. De plus, la RT-PCR ne présente pas de risque infectieux, le virus étant inactivé dès les premières étapes par l'isothiocyanate de guanidium utilisé pour l'extraction de l'ARN. Enfin, cette technique, aisément applicable à d'autres virus responsables de FHV, est un outil de choix dans le cadre d'une surveillance épidémiologique des FHV.

Le virus Ebo-Z (souche Gabon).

Les différentes études génétiques réalisées sur les virus responsables des épidémies Gabonaises les ont placés sans ambiguïté parmi le sous-type Zaïre, avec lequel ils présentent de grandes homologies (237). Ainsi, le séquençage de 156 pb du gène L de souches provenant de Mekouka et Booué a mis en évidence une homologie supérieure à 99% par rapport à Ebo-Z (Mayinga), tandis que ce fragment ne présentait que 77,3% d'homologies avec Ebo-S (Maleo) (233). De même, des études réalisées sur le gène de la GP ont montré une homologie de 98% avec celui d'Ebo-Z (Mayinga) (17). Enfin, il est intéressant de noter que les souches Gabonaises sont plus proches de la souche de Kikwit (1995) que de celle de Mayinga (1976) (53).

Les souches responsables des 3 épidémies Gabonaises sont très proches les unes des autres, mais néanmoins distinctes, indiquant que ces épisodes étaient bien indépendants (17, 233). Les séquences des gènes codant pour la GP des souches provenant d'une même épidémie sont strictement identiques entre les patients, quelle que soit l'issue de la maladie, y

compris chez les sujets asymptomatiques (E.M. Leroy & S. Baize, résultats non présentés), après de nombreux passages inter-humains (17) et après 3 mois de persistance chez un même patient (94). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'épisode de Kikwit, les séquences d'un fragment de la GP, mais aussi de la NP et de la polymérase étant identiques chez tous les patients, décédés ou survivants, quel que soit le nombre de passages (54, 94). L'adaptation du virus Ebo-Z chez la souris ne s'accompagne, au niveau du gène de la GP, que de quelques mutations sans changement d'acide aminé (157). Des modifications du gène de la VP24, qui conduisent à des changements d'acide aminé non conservatifs, ont été décrites au cours de l'adaptation du virus Ebola chez le cobaye, les autres gènes, comme la GP, la NP et la polymérase, ne subissant que des changements conservatifs (185). Ces résultats suggèrent que la VP24 pourrait être impliquée dans la pathogenèse chez le cobaye. Cependant, ces modifications n'ont pas été observées chez l'homme, puisque les séquences du gène de la VP24 obtenues chez les patients provenant d'une même épidémie (Mayibout ou Booué) ne présentent aucune différence, y compris chez les sujets asymptomatiques (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis).

L'ensemble de ces résultats suggère non seulement que ces virus sont extrêmement stables dans le temps au cours des épidémies – ce qui explique l'absence d'atténuation de la pathologie au fil des passages inter-humains, mais surtout que l'issue de la maladie ne dépend pas de mutations du génome viral. Des modifications d'autres protéines, dont les gènes n'ont pas encore été étudiés, ou seulement partiellement, pourraient être impliquées dans la pathogenèse, mais cela est peu probable pour plusieurs raisons: *i*, la GP semblant être le gène le plus variable des filovirus, l'absence de modification de ce gène pendant les épidémies suggère une grande stabilité du génome en général, *ii*, les filovirus sont extrêmement stables génétiquement sur de très longues périodes de temps, les isolats d'Ebo-Z de 1976 présentent en effet 98,5% d'homologies avec Ebo-Z (Kikwit) (54, 87) et Ebo-Z (Gabon) (17), *iii*, les 2 types d'issues, décès ou survie, à l'infection par Ebo-Z sont observées chez des patients ayant contracté la maladie chez le même malade (quelle que soit son évolution), rendant peu probable l'implication de mutations dans la pathogenèse, étant donné la grande stabilité du virus Ebo-Z (18, 94).

L'extrême stabilité génétique des filovirus contraste avec l'idée que la plupart des virus à ARN présentent des taux de mutations élevés à cause de nombreuses erreurs de l'ARN polymérase (93). Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), virus à ARN négatif, présente également une grande stabilité génétique sur de très longues périodes de temps en milieu endémique, tandis qu'il évolue rapidement en condition de culture *in vitro* (238, 239). D'autres virus à ARN, comme le virus rabique ou de la rougeole, sont eux aussi très stables dans leur écosystème (240, 241).

Des paramètres viraux similaires au début de la phase symptomatique.

La présence d'Ag circulants d'Ebo-Z dans le plasma des patients semble être corrélée à la phase symptomatique de l'infection. L'antigénémie est très élevée dès l'apparition des symptômes et similaire entre les patients décédés et survivants. Ces observations rejoignent celles obtenues lors de l'épisode de Kikwit (49, 55), mais également au cours des infections expérimentales de PNH (20, 136) (cf Introduction, Chapitre III-2, p57-58). La période d'incubation étant de surcroît équivalente entre les patients, et les souches virales apparemment identiques, ces résultats indiquent que les patients présentent une même évolution sur le plan virologique jusqu'aux premiers jours de la maladie. La majorité des patients évoluent ensuite vers la mort, tandis qu'environ un-tiers d'entre eux contrôlent la dissémination virale et deviennent convalescents. Le contrôle de la réplication virale au cours de FHV à virus Ebo-Z semble donc dépendre de l'hôte. La diminution rapide de la charge virale circulante au cours de la maladie en dépit d'une antigénémie élevée (49) (Introduction, *op. cit.*) et l'apparente diminution de la quantité d'ARN viral dans les PBMC dès la disparition des symptômes (une 2^{ème} PCR est en effet nécessaire à ce moment pour détecter le fragment du gène L chez ces patients) sont également en faveur d'un contrôle de l'hôte. Bien qu'une possible variation du taux de monocytes sanguins, seules cellules infectables parmi les PBMC (122, 146, 156, 157), puisse être impliquée dans la diminution de l'intensité de détection de l'ARN viral, le fort signal observé pour l'ARNm du CD14 dans les PBMC pendant la proche convalescence indique la présence de monocytes dans la circulation.

La réponse humorale et l'issue des FHV à virus Ebo-Z.

Des réponses humorales radicalement différentes sont observées en fonction de l'issue des FHV à virus Ebo-Z. Les survivants produisent des Ac dès le début de la phase symptomatique, tandis que les patients fatalement infectés présentent une réponse humorale déficiente. Des IgM spécifiques du virus Ebo-Z ne sont en effet détectées que chez un tiers d'entre eux et les IgG spécifiques jamais observées chez ces patients, quelle que soit la technique employée. Il semble donc que la réponse humorale ne se mette pas en place chez les malades fatalement infectés. Le délai entre le contact infectieux et la mort ne semble pas être impliqué dans cette déficience, puisque les IgG spécifiques sont détectées à partir de 10 jours après l'infection chez les survivants de Mayibout et que les patients décédés présentent un délai moyen de 15 jours, et parfois jusqu'à un mois, entre le contact et la mort, ce qui leur laisse un temps suffisant pour la production des IgG spécifiques. Ces observations rejoignent celles obtenues par ELISA chez les patients de Kikwit (49) ainsi que les données obtenues lors des infections expérimentales de PNH par les virus de Marburg, Ebo-Z, Ebo-CI et Ebo-R (20, 33, 34, 188, 195) (cf Introduction, chapitre IV-1, p82-83). De même, la suppression de la réponse humorale spécifique d'Ebo-S ou Ebo-CI, induite par une infection non-létale préalable, au cours de la réinfection par le virus Ebo-Z est un argument en faveur d'une altération de la réponse humorale au cours des infections fatales par Ebo-Z (20). Les différentes hypothèses permettant d'expliquer l'absence de réponse humorale chez ces patients seront évoquées plus loin.

Au contraire des patients fatalement infectés, les survivants présentent tous une réponse humorale très précoce, apparaissant pour les IgM probablement dès la période d'incubation et pour les IgG dès le début de la phase symptomatique. Des titres élevés d'IgM et d'IgG sont détectés au moment de la diminution puis de la disparition de la charge antigénique circulante et des symptômes, suggérant que la réponse humorale pourrait être impliquée dans le contrôle de l'infection et la guérison. Une réponse humorale précoce, composée d'IgM et d'IgG spécifiques, a également été observée chez les patients ayant survécu à l'infection par les virus de Marburg, Ebo-Z et Ebo-CI (15, 49, 55, 153), mais également chez les PNH survivant à une infection filovirale (20, 56) (cf Introduction, chapitre IV-2, p87-88). L'ensemble de ces résultats démontre une association étroite entre le contrôle

de l'infection par les filovirus et l'induction d'une réponse humorale précoce et vigoureuse. La rapidité avec laquelle cette réponse se met en place chez les patients pourrait suggérer un contact préalable avec le virus Ebo-Z, ou un autre virus induisant des réactions croisées. Bien que la récente démonstration de l'existence, lors des épidémies de FHV à virus Ebo-Z, de cas d'infection asymptomatique (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis) soit un argument en faveur de cette hypothèse, celle-ci est cependant très peu probable pour plusieurs raisons: *i*, les enquêtes de séroprévalence des IgG spécifiques des filovirus réalisées en dehors des épisodes épidémiques dans les régions concernées montrent environ 1% de sujets séropositifs parmi la population générale, ce qui est très inférieur aux 20-30% de survivants parmi les patients infectés par le virus Ebo-Z ; *ii*, la proportion importante et constante, quelle que soit l'épidémie, de patients survivant aux infections filovirales rend improbable un contact préalable, même asymptomatique d'un tel nombre de personnes, avec le virus sans épidémie sous-jacente (ce qui serait connu) ; *iii*, les modèles primates d'expérimentation, par définition naïfs de tout contact avec le virus, présentent également une proportion constante de survivants aux infections filovirales ; *iv*, dans de nombreux modèles d'infection virale, la réponse humorale apparaît également 10-15 jours après la primo-infection (242), ce qui est compatible avec les observations obtenues chez les survivants.

La NP, contre laquelle des IgG spécifiques apparaissent précocement chez tous les survivants, semble être la protéine virale la plus immunogène. Par la suite, la VP40, puis, à partir de la convalescence, la VP35 sont reconnues par les IgG des survivants de Mayibout et Booué. Aucun signal spécifique de la GP ou de la GPs n'est détecté chez ces patients. Bien que les quantités de GP et de GPs dans le surnageant de culture de la souche Gabon semblaient négligeables, un signal conséquent a été obtenu avec un sérum hyper-immun de lapin anti GP d'Ebo-Z (Mayinga) (fournis par V.E. Volchkov) après migration de la préparation d'Ag d'Ebo-Z (Mayinga) (résultats non présentés). Le manque de réactivité des plasmas des survivants vis à vis de la GP et de la GPs peut être, au moins en partie, lié à l'utilisation d'Ag hétérologues (Mayinga). Ces protéines sont en effet fortement glycosylées et la partie exposée à l'extérieur du virion présente une zone de grande variabilité génétique. Toutefois, les PNH et les patients ayant survécu à l'infection par le virus de Marburg présentent principalement des IgG spécifiques de la NP, mais aussi de la VP40, 35 et 30 et

dans une moindre mesure de la VP24 ; tandis que la GP et la protéine L ne sont jamais reconnues (63). De même, une forte réponse humorale est observée après l'immunisation de cobaye par des plasmides codant pour la NP tandis que la GP induit plutôt une réponse cellulaire (220). Des Ac spécifiques de la NP, GP et GPs ont été obtenus par recombinaison génétique chez des survivants de Kikwit (228) – cette méthode ne reflétant cependant pas la production *in vivo* d'Ac chez les patients – et naturellement au cours d'infections expérimentales non-fatales de PNH par Ebo-R et Ebo-S (20).

Le rôle des Ac dans le contrôle des infections filovirales n'est pas encore clairement déterminé. Des résultats très irréguliers ont été obtenus lors des transferts passifs d'Ac spécifiques des filovirus (211, 221, 223-226) et le pouvoir neutralisant *in vitro* de la réplication virale de sérums de survivants est généralement faible (cf Introduction, chapitre V-2, p93-94). La GP membranaire, seule protéine exprimée à la surface des virions permettant de surcroît la fixation du virus et l'entrée dans la cellule, représente une cible majeure des Ac neutralisants. Cependant, cette protéine semble peu immunogène, ce qui peut être lié à son grand degré de glycosylation. Les transferts passifs de sérum hyper-immuns, présentant de fort titres d'Ac neutralisants *in vitro*, ne protègent complètement l'hôte que lorsqu'ils sont administrés au moment de l'infection, et ne font que retarder le moment de la mort si la virémie est déjà installée (221, 223, 224). Les IgG spécifiques apparaissent chez les survivants à un moment où la virémie est très élevée, et chez les sujets asymptomatiques, tardivement après le contact infectieux potentiel (environ 15-21 jours après l'infection) et à de faibles titres (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis). Ces résultats suggèrent que la réponse humorale n'est pas seule à intervenir dans le contrôle de la réplication virale, particulièrement dans le cas de l'infection asymptomatique, d'autres acteurs du système immunitaire étant probablement impliqués.

La réponse humorale des survivants de Booué et Mayibout est, pendant la phase symptomatique, majoritairement composée d'IgG₁ et d'IgG₃, les IgG₂ n'apparaissant de façon significative qu'après la disparition des symptômes. Ces 2 isotypes d'IgG sont connus pour être majoritairement induits au cours des infections virales (243-245), et l'activité neutralisante de sérums humains est souvent associée à la fraction IgG₃ (246-248), un des isotypes majoritairement induits chez les survivants. De même, l'activité inhibitrice de la

réplication virale *in vitro* d'un sérum hyper-immun anti-Ebo-Z obtenu chez la chèvre était contenue dans la fraction IgG₂, correspondant aux IgG₃ de l'homme (221). Par ailleurs, ces isotypes très cytophiles présentent d'importantes propriétés biologiques, telles que la lyse médiée par le complément, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'Ac (ADCC), et l'opsonisation (249). L'ADCC joue un grand rôle dans les fonctions effectrices des Ac. En effet, la fixation d'Ac sur les récepteurs aux IgG présents à la surface de certaines cellules immunitaires, comme les monocytes/macrophages, les cellules NK et les granulocytes (250) est connue, après pontage des IgG par l'Ag, pour activer les fonctions cytotoxiques et régulatrices de ces cellules. Ainsi, la fixation de complexes immuns sur le CD16 (FcγR-III) exprimé à la surface des cellules NK active les fonctions cytotoxiques, la production de cytokines et la prolifération de ces cellules (251, 252), ce qui a également été démontré au cours d'infections virales (253). Les monocytes et les macrophages sont également, via le CD64 (FcγR-I) et le CD32 (FcγR-II), des acteurs majeurs de l'ADCC anti-virale, les Ac permettant de surcroît, comme pour les granulocytes, d'augmenter considérablement les propriétés phagocytaires de ces cellules (254-258). Les Ac peuvent également avoir un rôle dans l'augmentation des fonctions de présentation d'Ag et l'induction de la réponse immune cellulaire. En effet, l'internalisation de complexes Ag-Ac par l'intermédiaire du CD64 et du CD32 exprimés à la surface des cellules dendritiques augmente considérablement l'efficacité de la présentation ultérieure de l'Ag par ces cellules (259), tandis que le pontage d'Ac par des Ag à la surface de monocytes induit la sécrétion par ces derniers de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1β et le TNFα (260). L'induction de la commutation isotypique et la différenciation des lymphocytes B nécessitant une coopération avec des cellules T helper (Th) spécifiques (261), l'induction d'une réponse humorale chez les survivants implique une activation très précoce de ces lymphocytes au cours de l'infection. Cependant, la production précoce d'Ac neutralisants peut également être T-indépendante, comme cela a été observé dans certaines infections virales (262, 263), et peut être induites lorsque la structure virale présentent des motifs répétitifs (242, 264).

La réponse humorale précoce semble donc essentielle au contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z, mais l'induction d'une immunité à médiation cellulaire, inflammatoire et

lymphocytaire, est probablement indispensable à l'élimination du virus Ebo-Z, ce qui peut expliquer les résultats irréguliers observés lors des sérothérapies.

Une réponse inflammatoire défectueuse caractérise l'infection fatale.

La réponse inflammatoire étant essentielle dans l'induction et la régulation de la réponse immune, mais également dans les défenses immunitaires non-spécifiques et spécifiques, différents médiateurs solubles représentatifs de l'état d'activation des cellules impliquées dans cette réponse ont été analysés chez les patients, révélant de grandes différences en fonction de l'issue de la maladie.

Au contraire des survivants qui présentent une synthèse significative de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines au début de la phase symptomatique, aucune augmentation de la production de ces médiateurs inflammatoires n'est observée à ce moment chez les patients fatalement infectés par le virus Ebo-Z. En effet, l'IL-1 β n'est jamais détectée chez ces sujets, tandis que des taux significatifs de TNF α , et dans une moindre mesure d'IL-6, n'apparaissent que dans les stades terminaux de la maladie. Par contre, des concentrations croissantes et élevées d'antagoniste comme l'IL-1RA et de récepteurs solubles comme ceux du TNF α apparaissent à partir de 5 jours avant le décès. A l'exception de MCP-1, les concentrations plasmatiques de chemokines sont équivalentes à celle des témoins endémiques. Les taux de nitrites, reflet de la production *in vivo* du NO $^{\cdot}$, sont légèrement supérieurs à ceux des témoins jusqu'à la veille du décès, où des quantités élevées sont détectées. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'épidémie de Kikwit, les patients décédés ne présentant que de faibles concentrations plasmatiques de TNF α et une absence de production d'IL-6 (191). Ces résultats suggèrent qu'aucune réponse inflammatoire précoce n'est induite au cours de l'infection fatale. L'activation d'une telle réponse pendant la période d'incubation de la maladie, pour laquelle aucun prélèvement n'a été obtenu, est peu probable, car des taux résiduels de médiateurs impliqués dans cette réponse, en particulier les récepteurs solubles comme les sTNF-RI & II et les antagonistes comme l'IL-1RA, seraient probablement détectés dans les prélèvements les plus précoces (environ 8-10 jours après l'infection pour quelques uns). En effet, ces molécules qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires sont connues pour être produites peu après la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et pour

être encore détectées dans les sérums après la disparition de ces cytokines (265-267). De plus, des médiateurs solubles suggérant une réponse inflammatoire sont détectés chez les survivants et les sujets asymptomatiques infectés par le virus Ebo-Z respectivement 4-7 et 12 jours après l'infection et leurs récepteurs solubles plus d'une semaine après (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis). Ces résultats rejoignent les observations histopathologiques réalisées au cours des FHV à filovirus chez les PNH et l'homme, où aucune infiltration de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes ou granulocytes) n'est détectée autour des cellules infectées (11, 36, 37, 146, 148, 155) (cf Introduction, chapitre IV-1, p80).

Les fortes concentrations de molécules anti-inflammatoires retrouvées pendant la phase symptomatique dans les plasmas des patients fatalement infectés peuvent être impliquées dans l'altération de cette réponse innée. Des taux élevés de cortisol sont ainsi détectés au cours de la maladie. Les glucocorticoïdes (GC), en inhibant l'activité du facteur de transcription NF κ B par l'induction de la synthèse de la protéine inhibitrice I κ B, suppriment la synthèse de cytokines comme l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-2 et l'IFN γ (268). De plus, les GC sont connus pour augmenter la production du récepteur soluble à l'IL-1, du sIL-6R et des sTNF-RI et II, qui neutralisent pour certains les fonctions biologiques de leur cytokine respective, mais également pour induire la synthèse de protéines de phase aiguë, comme la SAA (269). Enfin, ces médiateurs inhibent l'adhésion et la migration des cellules inflammatoires à travers l'endothélium (270, 271). Cependant, la réponse inflammatoire observée chez les survivants en dépit de taux similaires, voire plus élevés, de cortisol pendant la phase symptomatique suggère que cette production reflète plutôt la réponse de l'hôte à l'infection aiguë. En effet, les GC sont souvent sécrétés lors des infections virales et protègent l'hôte des effets immunopathogènes de certaines cytokines comme le TNF α , l'IL-12 et l'IFN γ (272-274). Il semble que l'IL-6, que l'on retrouve à des taux modérés mais pouvant être potentialisés par la présence du sIL-6R (275), soit un stimulus majeur de la synthèse des GC (272).

Les patients fatalement infectés sont également caractérisés par une augmentation de la synthèse de l'ARNm de l'IL-10 dans les PBMC et par des concentrations plasmatiques d'IL-10 très élevées pendant la phase symptomatique. De grandes quantités d'IL-10 sérique ont également été observées chez les patients fatalement infectés de Kikwit (191). L'IL-10,

majoritairement produites par les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les neutrophiles (276-278) et est impliquée dans la désactivation du macrophage (279-281) et l'inhibition de ses propriétés microbicides (282). La présence de grandes quantités d'IL-10 chez les patients fatalement infectés peut ainsi expliquer l'absence de sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires en dépit de taux élevés d'IFN γ , un puissant activateur du macrophage (276). En supprimant l'expression d'importantes molécules impliquées dans la présentation de l'Ag comme le CMH, ou dans la costimulation des cellules T comme le CD80, l'IL-10 inhibe les fonctions de présentation d'Ag par les CPA professionnelles comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans (283-285). Non seulement les altérations induites par l'IL-10 sur les CPA provoquent une suppression de l'activation des lymphocytes T et de la synthèse de cytokines Th1 (IL-2 & IFN γ) par ces derniers (286, 287) ; mais l'IL-10 agit par ailleurs directement sur les lymphocytes Th en inhibant la synthèse d'IL-2, l'activation via le TCR-CD3 et la prolifération cellulaire (288-290). L'IL-10 est également connue pour activer le relargage des récepteurs du TNF α de la membrane des monocytes/macrophages et des fibroblastes et induire la production d'IL-1RA par les monocytes (291-294), et peut donc être impliquée dans l'augmentation des concentrations plasmatiques d'IL-1RA et de sTNF-RI & II observée au cours de la maladie chez les patients décédés. Enfin, la seule chemokine dont la concentration plasmatique soit élevée chez les patients fatalement infectés, MCP-1, est également l'une des rares dont une activation de la synthèse par l'IL-10 a été décrite, la production d'autres chemokines par les monocytes/macrophages comme l'IL-8 et MIP-1 α étant inhibée par cette dernière (294, 295). Les taux significativement plus élevés que les témoins endémiques de TGF β détectés au cours de l'infection fatale peuvent également avoir une implication dans la suppression de l'inflammation et des propriétés cytotoxiques des macrophages (296, 297), les effets de cette cytokine anti-inflammatoire étant additionnels à ceux de l'IL-10 (279, 298). Les concentrations élevées de molécules anti-inflammatoires, et plus particulièrement d'IL-10, présentes dans la circulation sont probablement impliquées dans la réponse inflammatoire défectueuse observée au cours de l'infection fatale ; la désactivation des monocytes/macrophages, mais aussi des cellules endothéliales, par ces

molécules pouvant peut-être rendre ces cellules permissives à la réplication du virus Ebo-Z comme cela a déjà été observé pour d'autres infections virales (299-301).

Les taux croissants et très élevés de néoptérine détectés pendant la phase symptomatique suggèrent une activation des monocytes/macrophages au cours de l'infection fatale. En effet, la néoptérine est principalement sécrétée par ces cellules en réponse à l'IFN γ (302, 303), ce qui est compatible avec les données obtenues chez les patients décédés de Mayibout et Booué, mais aussi de Kikwit (191). Ces monocytes/macrophages activés sont probablement à l'origine du TNF α (191), de l'IL-6, du NO $^{\cdot}$ et de la sécrétion massive d'IL-1RA et de sTNF-RI & II observés dans les stades terminaux. De même, l'IL-10 peut également provenir de ces monocytes/macrophages activés et être en partie induite par le TNF α , connu pour en activer la synthèse (304-307). Les monocytes/macrophages sont les premières et principales cibles virales, et les derniers jours avant le décès sont caractérisés, dans les modèles expérimentaux et chez l'homme, par l'infection généralisée de ces cellules (146, 155, 156) (cf Introduction, chapitre III-2, p60-61). De plus, l'infection *in vitro* de monocytes par le virus de Marburg ou Ebo-Z induit une activation cellulaire accompagnée de la sécrétion de TNF α (142, 143, 179). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation des monocytes/macrophages, qui s'accroît jusqu'au décès des patients, est induite par l'infection, de plus en plus massive, de ces cellules par le virus Ebo-Z, mais également par l'IFN γ . Bien que l'infection *in vitro* des cellules endothéliales par le virus Ebo-Z inhibe la production par ces dernières de cytokines pro-inflammatoires, l'expression de marqueurs d'activation et la réponse aux interférons (206, 207) ; les cellules endothéliales infectées participent peut-être, dans les stades terminaux, à la sécrétion de certains médiateurs détectés chez les patients décédés, comme le TNF α , l'IL-6, ou MCP-1 (201).

Des études de neutralisation réalisées dans les modèles expérimentaux ont suggéré que le TNF α était impliqué dans la pathogenèse des FHV à filovirus (192, 193) (cf Introduction, chapitre IV-1, p81-82). Des taux sériques élevés de médiateurs pro-inflammatoires sont associés aux chocs septiques et endotoxiques (266) et les effets immunopathogènes du TNF α sont bien connus (308). Les taux de TNF α observés dans les stades terminaux (150 ± 70 pg/ml) chez les patients fatalement infectés sont cependant relativement faibles par rapport à ceux détectés 4-7 jours après l'infection chez les sujets asymptomatiques (700 pg/ml) (EM

Leroy, S Baize *et al*, soumis) et également par rapport à ceux enregistrés au cours des chocs septiques ($> 1,5$ ng/ml) (309, 310). De plus, aucune production d'IL-1 β n'est observée chez les patients décédés, et des quantités très élevées d'IL-1RA sont détectées dans les stades terminaux. L'IL-1RA, inhibiteur compétitif produit par les macrophages et les neutrophiles qui se fixe sur le récepteur de l'IL-1 sans induire de signal (311), protège l'hôte des effets pathogènes de l'IL-1 β (312). Enfin, des concentrations pondérales 100 fois supérieures de sTNF-RI & II par rapport à celles de TNF α sont détectées simultanément chez ces patients. Les récepteurs solubles au TNF α – et plus particulièrement le sTNF-RI – par leur forte affinité, inhibent les fonctions biologiques du TNF α lorsqu'il sont produits en excès, mais potentialisent et allongent la durée des effets du TNF α en le relargant lentement lorsqu'ils sont sécrétés à des taux plus faibles, ceci étant plutôt attribué au sTNF-RII (313-316). Une grande partie des récepteurs relargués dans la circulation étant clivée de la membrane des cellules, ces dernières deviennent moins sensibles aux effets du TNF α . Les infections virales sont souvent associées à des concentrations plasmatiques élevées en sTNF-R (317-319), y compris les FHV avec syndrome rénal liées à des hantavirus (l'IL-10 est également détectée en grande quantité) (320) et celle liée au virus de la dengue (321). Les taux très élevés de récepteurs solubles associés aux concentrations relativement faibles de TNF α suggèrent que cette cytokine n'est pas, comme lors des chocs septiques ou endotoxiques, responsable du choc mortel. Néanmoins, le TNF α peut être impliqué dans les troubles de la circulation par l'augmentation de la perméabilité et de l'activité procoagulante de l'endothélium (142, 166, 180, 322) (cf Introduction, chapitre III-2, p74-76). De plus, l'intensité d'expression du TNF α membranaire, qui possède les mêmes propriétés que le TNF α soluble, n'est pas connue et pourrait également participer à la pathogenèse. D'autres médiateurs retrouvés chez les patients décédés, comme l'IFN γ , l'IL-2 (191), l'IL-6 (323, 324) et les NO $^{\cdot}$, peuvent également participer à ces changements pathologiques, de façon cumulative au TNF α .

Ainsi, l'infection fatale de l'homme par le virus Ebo-Z est caractérisée par une absence de réponse inflammatoire précoce tandis que l'infection non contrôlée des monocytes/macrophages semble induire la synthèse de molécules anti-inflammatoires participant probablement à la suppression de l'inflammation et de médiateurs potentiellement impliqués dans la pathogenèse. La suppression de l'inflammation ne semble pas directement

résulter de la réplication virale, puisqu'une réponse inflammatoire précoce est détectée chez les survivants en dépit de paramètres viraux similaires au début de la phase symptomatique. Une diminution de la prolifération cellulaire des PBMC en réponse au LPS et à la ConA apparaît rapidement après l'infection de PNH par le virus de Marburg (187, 188). Certaines protéines virales, comme la GPs qui semble se fixer sur le CD16b des neutrophiles et inhiber leur activation (126), la GP₁ soluble qui semble avoir un rôle dans la pathogenèse ou la GP₂ qui possède une séquence immunosuppressive (115), pourraient être impliquées dans la suppression de la réponse inflammatoire (cf Introduction, chapitre IV-1, p83).

Les macrophages, mais également d'autres CPA comme les cellules dendritiques, sont atteints par la réplication virale très précocement après l'infection de cobaye ou de souris par Ebo-Z, le nombre de cellules infectées et détruites augmentant jusqu'au décès (146, 156). Il est de surcroît probable que l'infection de ces cellules et la réplication virale altèrent les fonctions de phagocytose et de présentation d'Ag des CPA (cf Introduction, chapitre IV-1, p84-85). Ces altérations ainsi que la réponse inflammatoire défectueuse ont sans doute un rôle crucial dans l'absence de production d'IgG spécifiques qui caractérise l'infection fatale ; l'activation de CPA et la production de médiateurs pro-inflammatoires étant en effet essentielles à l'induction de lymphocytes Th spécifiques et à la différenciation des lymphocytes B.

Réponse inflammatoire précoce et contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z.

Des quantités significatives de médiateurs pro-inflammatoires, IL-1 β , TNF α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α et MIP-1 β , sont retrouvées dans le plasma des survivants dès le début de la phase symptomatique, les concentrations diminuant par la suite pour atteindre pendant la convalescence les valeurs des témoins endémiques. Ces résultats indiquent l'induction d'une réponse inflammatoire précoce au cours de l'infection non-fatale par le virus Ebola. En effet, les cinétiques de production de l'IL-1 β , du TNF α et de MIP-1 β observées au cours de la maladie suggèrent que la production de médiateurs pro-inflammatoires est probablement initiée dès la période d'incubation. De plus, les sujets asymptomatiques présentant des taux très élevés de ces médiateurs 4-7 jours après l'infection (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis), il est possible que la production de cytokines pro-inflammatoires soit plus élevée pendant la

période d'incubation. Des taux modestes, mais significatifs, de TNF α et d'IL-6 ont également été détectés dans les sérums de survivants de Kikwit (191).

Ces résultats indiquent une activation de cellules inflammatoires environ une semaine après l'infection virale chez les patients survivants, mais également chez les sujets infectés de manière asymptomatique. Les monocytes/macrophages sont probablement à l'origine de cette réponse inflammatoire, bien que les neutrophiles et les cellules endothéliales puissent également être impliqués (201, 257, 278, 325, 326). En effet, les concentrations de néoptérine augmentent au cours de la phase symptomatique, suggérant l'activation de monocytes/macrophages. Cependant, ces concentrations sont très inférieures à celle observées chez les patients décédés, ce qui peut s'expliquer par l'absence de sécrétion massive d'IFN γ chez ces patients (302, 303). La disparition de la réponse inflammatoire au cours de l'adaptation des filovirus chez le cobaye (127) (cf Introduction, chapitre IV-2, p86-87), mais également la corrélation entre la réponse inflammatoire précoce et les infections asymptomatiques ou non-létales suggèrent que cette réponse immune non-spécifique est cruciale au contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z, bien que son rôle ne soit pas encore connu.

Certaines cytokines pro-inflammatoires présentent des propriétés anti-virales leur permettant d'inhiber la réplication de certains virus et de conférer un état 'anti-viral' aux cellules voisines non-infectées (327). Le rôle crucial de l'IL-1 β , l'IFN α/β , l'IFN γ et du TNF α/β dans le contrôle de certaines infections virales a ainsi été démontré (328-334). L'IFN α et γ n'étant pas détectés dans les plasmas des patients survivants et des sujets asymptomatiques, l'IL-1 β et surtout le TNF α pourraient être impliqués dans le contrôle de la réplication virale chez ces patients. Cependant, d'autres cytokines, comme l'IFN β et le TNF β , restent à doser chez ces patients. Bien que pathogène en cas de production excessive (335), le NO $^-$ est une molécule effectrice cruciale pour les fonctions cytotoxiques des macrophages et neutrophiles (336) et dans les défenses non-spécifiques contre certains virus à ARN ou à ADN (337-343) plus particulièrement contre ceux utilisant des protéases contenant une cystéine dans le site enzymatique (158). Les taux élevés – mais cependant variables entre les patients et similaires à ceux des patients décédés – de NO $^-$ détectés à la fin de la maladie chez les survivants jouent peut-être un rôle dans l'inhibition de la réplication du virus Ebo-Z.

Les cytokines pro-inflammatoires induisent également l'activation et la prolifération des cellules inflammatoires (344, 345) et l'expression par les macrophages de molécules de surface comme le TNF α , FasL ou TRAIL, essentielles aux fonctions cytotoxiques de ces cellules (297, 346-350). D'ailleurs, l'activation de ces cellules par les cytokines pro-inflammatoires est souvent associée au contrôle de la réplication de certains virus monocytotropiques (351). Enfin, en augmentant l'expression des récepteurs aux IgG à la surface des cellules effectrices, l'IL-1 β et le TNF α favorisent les phénomènes d'ADCC (260, 352).

Les cytokines pro-inflammatoires jouent également un rôle majeur dans l'induction et la régulation de la réponse immune spécifique. L'IL-1 β est importante dans l'installation de la réponse inflammatoire en induisant sa propre synthèse (353), mais également celle d'autres médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF α (354) et l'IL-6 (355). Ces cytokines sont également impliquées dans l'expression du CMH I et II et de molécules de costimulation comme le CD40 et le CD80 à la surface des CPA (351, 356, 357), et jouent un grand rôle dans l'initiation de la réponse lymphocytaire T CD4+ spécifique, en apportant un 3^{ème} signal d'activation complémentaire de ceux induits par le TCR-CD3 et les molécules de costimulation telle le CD28, mais également en induisant l'expression du CD25 (IL-2R) (358-360). De plus, ces cytokines induisent la différenciation, la prolifération et la migration de ces lymphocytes T CD4+ spécifiques activés vers les zones riches en lymphocytes B des ganglions lymphatiques (361). L'IL-1 β et le TNF α jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes Th et l'induction de la réponse humorale (361, 362). De même, l'IL-6 induit la différenciation de lymphocytes Th favorables à la genèse de la réponse humorale et est un facteur de différenciation des lymphocytes B activés en plasmocytes producteurs d'Ac (359, 363, 364). La production d'IgG spécifiques du VSV est ainsi considérablement réduite chez la souris déficiente en IL-6, tandis que les IgM spécifiques ne dépendant pas de l'aide de lymphocytes Th sont produits à des taux similaires (365). Les effets biologiques de l'IL-6 sont probablement potentialisés par les quantités notables de sIL-6R présentes dans le plasma (275). Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires jouent un grand rôle dans l'induction des lymphocytes Th et de la réponse humorale. Enfin, ces 3 cytokines ont également un rôle dans

l'induction et l'activité des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques au cours de nombreuses infections virales (358, 363, 365-367).

De grandes quantités de β (CC) chemokines (ne possédant, contrairement aux CXC ou α chemokines comme l'IL-8, aucun acide aminé entre les 2 premières cystéines), MCP-1, MIP-1 α et MIP-1 β sont retrouvées pendant la phase symptomatique chez les patients survivants. Les chemokines, produites localement lors de situations pathologiques par de nombreuses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales (368), et surtout les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, sont cruciales pour la réponse inflammatoire et l'induction de l'immunité spécifique. En effet, ces molécules sont impliquées dans l'adhésion des monocytes, neutrophiles, lymphocytes et cellules NK sur l'endothélium vasculaire et dans l'extravasation et la migration des cellules immunitaires vers les tissus infectés (369-371). Les interactions entre les cellules inflammatoires et l'endothélium peuvent également induire la production de ces chemokines (372). De plus, certaines chemokines comme MIP-1 β , exposées à la surface des cellules endothéliales par l'intermédiaire des protéoglycanes, favorisent l'adhésion des leucocytes (373). MIP-1 α et MIP-1 β présentent des propriétés chemotactiques différentes selon les sous-types lymphocytaires. Ainsi, MIP-1 α semble plutôt agir sur les lymphocytes T CD8+ tandis que MIP-1 β est impliquée dans la chemo-attraction des lymphocytes T CD4+ (374, 375). Ces 2 chemokines sont par ailleurs impliquées dans la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques drainant le site inflammatoire (376). Enfin, ces molécules sont connues pour induire un signal de costimulation sur les lymphocytes T et pour activer les propriétés cytotoxiques des cellules NK, et contribuent ainsi à l'activation lymphocytaire (377, 378).

Des concentrations élevées et croissantes de SAA sont, comme pour les patients décédés, détectées pendant la phase symptomatique ; et retournent aux valeurs de base après la disparition des symptômes. Ces résultats indiquent l'induction de la synthèse de protéines de phase aiguë pendant la phase symptomatique de la maladie. La réponse de phase aiguë représente une constellation complexe de modifications de la concentration plasmatique de certaines protéines et est induite par la réaction inflammatoire. Cette réponse est nécessaire à la prévention des dommages et aux processus de réparation tissulaires permettant un retour à fonctionnement normal de l'organisme (379). Les protéines de phase aiguë sont synthétisées

par le foie en réponse aux médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF α et plus particulièrement l'IL-6 (380-382). De nombreux effets biologiques sont liés à la réponse de phase aiguë: augmentation de la perméabilité vasculaire, extravasation leucocytaire vers les tissus atteints, régulation de l'homéostasie, induction de la fièvre et de sensations douloureuses (379).

La production de médiateurs pro-inflammatoires est suivie quelques jours après par la sécrétion dans le plasma de molécules anti-inflammatoires. En effet, des taux significatifs – cependant très inférieurs à ceux observés au cours de l'infection fatale – d'IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII, sIL-6R sont détectés à la fin de la période symptomatique et retournent à des valeurs normales une semaine après la disparition des symptômes. De même, des concentrations très élevées de cortisol, équivalentes à celles détectées chez les patients fatalement infectés, sont mesurées à la fin de la période symptomatique. L'extinction de la réponse inflammatoire s'effectue d'une part par l'arrêt de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires, mais également par la sécrétion de molécules neutralisant l'action de ces médiateurs. L'IL-6, dont les effets sont potentialisés par le sIL-6R, et les protéines de phase aiguë possèdent de nombreuses propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, elles inhibent la synthèse d'IL-1 β et de TNF α par les monocytes (383), et induisent la synthèse d'IL-1RA et la sécrétion de sTNF-RI (267, 311, 380). L'IL-1 β , le TNF α , et plus particulièrement l'IL-6 peuvent être à l'origine de la production élevée de cortisol à la fin de la maladie, ce dernier inhibant la synthèse de ces médiateurs en retour (380, 384). En plus de son rôle anti-inflammatoire, le cortisol protège probablement l'hôte des effets pathogènes des cytokines pro-inflammatoires (cf p152). En dépit d'une expression modeste de son ARNm respectif, l'IL-10 n'est pas détectée dans le plasma des patients survivants, contrairement aux patients décédés, et les taux de TGF β ne sont pas significativement différents de ceux des témoins endémiques, ce qui contraste avec les concentrations élevées de ces molécules au cours de l'infection fatale.

Activation précoce de cellules cytotoxiques, apoptose intravasculaire massive et pathogenèse de l'infection fatale.

Des ARNm codant pour l'IFN γ , et dans une moindre mesure l'IL-4, mais également pour Fas, FasL et perforine sont détectés dans les PBMC dès l'apparition des symptômes, et des concentrations croissantes et élevées d'IFN γ sont retrouvées dans le plasma des patients fatalement infectés. De même, des taux sériques significatifs d'IFN γ , mais aussi d'IL-2, ont été détectés chez les patients décédés de Kikwit (191), mais aussi au cours des infections fatales de cobaye et de PNH (188-190). L'expression d'ARNm codant pour l'IFN γ , FasL et perforine et la sécrétion massive d'IFN γ et de sFasL suggèrent l'activation de cellules cytotoxiques au cours de l'infection fatale par le virus Ebo-Z, les fonctions cytotoxiques de ces cellules étant en effet médiées par FasL et perforine et associées à une synthèse d'IFN γ (385). De même, sFasL est principalement relargué par les cellules NK et les lymphocytes T activés, après un clivage membranaire dépendant des métalloprotéinases (386). Les lymphocytes T activés peuvent également participer à la production de TNF α , de TGF β et surtout d'IL-10 observée au cours de l'infection fatale. Bien que les macrophages puissent être une source d'IFN γ , la présence de l'ARNm codant pour ce dernier dans les PBMC suggère une origine lymphocytaire, la production d'IFN γ par les monocytes n'étant pas décrite (387). L'expression et le relargage de FasL par les monocytes/macrophages activés ayant été démontrés (348, 388), y compris au cours de l'infection de macrophages par HIV (349), la participation des monocytes/macrophages infectés par Ebo-Z dans la production de FasL est possible.

Cette activation de cellules cytotoxiques peut être innée et provenir de cellules NK ou met en jeu des CTL spécifiques d'Ag viraux. En effet, les cellules NK sont activées quelques jours après une infection virale et jouent un rôle crucial dans les défenses non-spécifiques (389, 390). Ces cellules sont également une source précoce et majeure d'IFN γ et sont impliquées dans l'initiation de la réponse immune spécifique (391). La précocité de la réponse cytotoxique (détectée à partir d'une semaine après l'infection) et la production très élevée d'IFN γ comparativement aux survivants, chez qui il n'est pas détecté dans le plasma en dépit de l'activation d'une réponse cytotoxique, sont en faveur de l'activation de cellules NK. L'IL-12, principal inducteur d'IFN γ par les cellules NK (392) n'est pas détectée chez les patients, mais il est possible que ce médiateur, produit précocement et principalement par les

macrophages et les autres CPA, soit sécrété pendant la phase d'incubation et/ou de manière localisée. D'autres cytokines, comme l'IL-15 (393), l'IL-18 (387, 394) – qui n'ont pas été dosées – ou le TNF α (395, 396) et l'IL-10 (397, 398), retrouvés dans le plasma des patients, peuvent cependant être impliquées dans l'activation et la production d'IFN γ par les cellules NK. Enfin, une augmentation de l'activité NK a été notée au cours de l'infection létale de cobaye, de singes rhésus et de babouins infectés par le virus de Marburg (187, 188, 190). Les cellules NK disparaissent rapidement au cours des infections virales pour laisser la place aux CTL, cellules induites de manière spécifique de l'Ag, le plus souvent des lymphocytes CD8 $^{+}$ restreints par le CMH I (399). Les CTL représentent également une source majeure d'IFN γ (400). L'activation de CTL une semaine après l'infection n'est cependant pas impossible. Ainsi, des CTL spécifiques d'Ag viraux sont retrouvés 11-13 jours après l'infection de singes rhésus par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (401). De même, des souris infectées par de fortes doses de LCMV présentent un pic d'activité CTL 3 jours après l'infection, tandis que ces cellules n'apparaissent que 9 jours après lors d'une infection par de faibles doses (402). L'altération de la réponse inflammatoire et la faible expression de l'ARNm du CD28 ne sont pas incompatibles avec l'induction de CTL. En effet, il semble que ces voies d'activation, voire même l'aide de lymphocytes Th, ne soient pas indispensables à l'induction et à l'activité de CTL, les cellules ainsi activées disparaissant cependant très rapidement sans induction de mémoire immunologique (264, 365, 403, 404), .

Cette activation lymphocytaire pourrait également résulter d'interactions entre les lymphocytes et les macrophages (ainsi que les autres CPA) infectés et/ou de l'effet de certaines cytokines sécrétées par les cellules infectées comme le TNF α , comme cela a été suggéré lors d'infections expérimentales de cobaye et de PNH par le virus de Marburg ou Ebo-Z (187, 188, 190) (cf Introduction, chapitre IV-1, p81-82). L'activation non-spécifique de lymphocytes a été observée au cours de certaines infections virales dont la fièvre porcine, causée par un flavivirus (405), et résulte parfois de l'interaction entre les cellules immunitaires et une protéine virale activatrice (406, 407).

L'activation précoce de cellules cytotoxiques ne parvient cependant pas à endiguer la dissémination virale, et est suivie dans les jours précédant la mort par la disparition complète des ARNm relatifs aux lymphocytes T des PBMC, y compris les ARNm codant pour le CD3

et le CD8 ; tandis que les concentrations plasmatiques d'IFN γ diminuent considérablement. De même, l'analyse du répertoire V β par RT-PCR montre une disparition des ARNm codant pour les différentes familles de TCR-V β les derniers jours avant le décès. Ces résultats, ainsi que la faible expression de l'ARNm codant pour Bcl-2 au moment de l'activation lymphocytaire, suggèrent une délétion des lymphocytes T au cours de l'infection fatale. En effet, la diminution de l'expression des complexes TCR-CD3 à la surface des lymphocytes T précède la mort cellulaire par apoptose (402, 408), et celle de Bcl-2 – une protéine connue pour inhiber l'apoptose – est corrélée à la mort cellulaire (409, 410).

Les ARNm codant pour les TCR-V β 12, 13.2 et 17 ne sont jamais détectés, non seulement dans les PBMC de patients fatalement infectés, mais également chez les patients survivants et les sujets asymptomatiques à partir d'une semaine après l'infection, tandis que l'expression de ces ARNm chez les témoins endémiques est similaire à celle d'autres TCR-V β . Ces ARNm ne sont toujours pas détectés une semaine après la disparition des symptômes chez les survivants, tandis que certains réapparaissent dans les PBMC des sujets asymptomatiques 3 semaines après le premier contact infectieux potentiel (E.M. Leroy & S. Baize, résultats non publiés). L'absence de ces ARNm dans les PBMC suggère une délétion précoce et durable des lymphocytes utilisant ces 3 familles de TCR-V β chez tous les sujets infectés par le virus Ebo-Z (411). L'atteinte préférentielle de familles de TCR-V β pourrait être due à une activité superantigène (SAg) que posséderait une protéine virale. En effet, les SAg sont connus pour activer de manière non-spécifique les lymphocytes T exprimant certaines familles de TCR-V β en se fixant, sous forme native, simultanément sur le CMH-II, ou parfois même le CMH-I, de CPA et le fragment V β du TCR (412, 413). Les lymphocytes ainsi activés prolifèrent et produisent le plus souvent des cytokines de type Th1 (IL-2 & IFN γ) et pro-inflammatoires (414, 415), mais sont rapidement sujets à l'anergie et/ou l'apoptose (416). De nombreux virus codent pour des protéines possédant une activité SAg (417, 418). Cette hypothèse, bien que permettant d'expliquer cette délétion précoce et durable de familles entières de TCR-V β , nécessite cependant de plus amples investigations avant de pouvoir être sérieusement avancée. De nombreux points sont en effet difficilement conciliables avec les effets classiques des SAg: *i*, seul l'ARNm codant pour le V β 12 est exprimé à la surface sous la forme d'un TCR, les 2 autres étant des pseudo-gènes, leur disparition ne peut donc résulter

d'un effet SAg (419) ; *ii*, la disparition très précoce (au plus tard 7-8 jours après l'infection) des ARNm est incompatible avec la phase initiale d'expansion polyclonale précédant la délétion des lymphocytes réactifs (416) ; *iii*, aucune évidence de mort cellulaire par apoptose n'est retrouvée chez les survivants et les sujets asymptomatiques (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis) ; *iv*, l'IFN γ plasmatique est détecté plusieurs jours après la disparition des ARNm spécifiques des TCR-V β , et est en dessous des limites de détection chez les survivants et les asymptomatiques. Il est cependant possible, comme cela a été observé avec certains SAg viraux, que la disparition des lymphocytes concernés soit liée à leur relocalisation vers les organes lymphoïdes où ils s'accumulent et sont activés par le SAg (420). En dehors de l'existence d'un SAg, la disparition sélective de ces ARNm chez les patients, mais aussi chez les sujets infectés de façon asymptomatique, est difficile à expliquer et nécessite de plus amples investigations.

La détection de quantités croissantes et élevées de NMP 41/7 dans le plasma et de fragments d'ADN caractéristiques dans les leucocytes confirme que des phénomènes de mort cellulaire intravasculaire massive par apoptose caractérisent les 5 derniers jours de la vie au cours de l'infection fatale par Ebo-Z. La disparition des ARNm spécifiques des lymphocytes T dans les PBMC et la détection de phénomènes d'apoptose intravasculaire massive suggèrent que ces cellules sont majoritairement impliquées dans cette mort cellulaire. La persistance de la synthèse de l'ARNm codant pour le CD4 peut s'expliquer par l'expression de ce marqueur par les monocytes. De même, la diminution de l'expression de l'ARNm du CD20, molécule spécifiquement exprimée par les lymphocytes B, dans les PBMC de patients fatalement infectés suggère que ces cellules pourraient également être impliquées dans la mort cellulaire. Ces résultats sont en adéquation avec la lymphopénie décrite au cours des infections fatales de l'homme et de PNH par les filovirus (11, 20, 22, 84, 130, 137, 146, 153) (cf Introduction, chapitre III-2, p63). De même, la destruction totale des lymphocytes T et B de la rate et des ganglions lymphatiques dans les modèles animaux (36, 135, 144, 146, 148, 154), mais également chez l'homme (7, 79, 155) (cf Introduction, chapitre III-2, p65-66), suggère que la destruction lymphocytaire observée chez les patients fatalement infectés n'est pas restreinte au compartiment sanguin et concerne probablement les organes lymphoïdes. La probable déplétion des lymphocytes B au cours de l'infection fatale peut expliquer l'altération de la

réponse humorale caractérisant ces patients. La lyse de cellules infectées comme les monocytes/macrophages peut également être impliquée dans ces phénomènes de mort cellulaire, particulièrement dans les stades terminaux. Cependant, les taux croissants de néoptérine et la synthèse soutenue dans les PBMC de l'ARNm codant pour le CD14 indiquent la présence de monocytes jusqu'à la veille du décès. La destruction de cellules endothéliales n'est observée que 1 ou 2 jours avant le décès chez les PNH infectés par les filovirus. De même, les signes hémorragiques apparaissent dans les stades terminaux et seulement chez une partie des patients, tandis que certains malades survivants présentent également des signes hémorragiques sans qu'aucune trace d'apoptose ne soit détectée. Ces observations suggèrent que les cellules endothéliales, bien que pouvant être en partie impliquées dans cette mort massive, ne sont pas les principales cellules touchées par ces phénomènes.

L'apoptose est induite au cours de l'infection fatale à un moment où les patients présentent une antigénémie élevée et des symptômes similaires, quelle que soit l'issue de la maladie. De plus, les lymphocytes ne semblant pas être infectés par les filovirus (122, 146, 156, 157), la déplétion lymphocytaire ne peut résulter d'effets cytopathogènes directement liés à la réplication virale. Cependant, il est possible que l'apoptose des lymphocytes soit induite par une protéine virale soluble, comme la GPs – une protéine connue pour se fixer sur le CD16b (Fc γ RIIIb) des neutrophiles et inhiber leur activation, bien que cela soit aujourd'hui controversé (421) – ou la GP₁ soluble, présente dans le sérum de patients fatalement infectés (108, 112).

L'activation excessive de cellules cytotoxiques (suggérée par les concentrations élevées d'IFN γ) chez les patients fatalement infectés, à un moment où la charge antigénique est très élevée, peut conduire à la diminution de l'expression de Bcl-2 et du complexe TCR-CD3, puis à la mort par apoptose de ces cellules, un phénomène fréquemment observé au cours d'infections virales (402, 410, 422-424) et qui peut être médié par FasL, perforine, le TNF α ou l'IFN γ (402, 423, 425-427). De même, la présence d'Ag circulants peut également induire l'apoptose des lymphocytes réactifs (428). Le manque de costimulation entre les CPA et les lymphocytes telle que les interactions CD80/CD86 – CD28 (360, 429) ou certaines cytokines pro-inflammatoires (430), voire même l'absence de réponse Th, lors de l'activation des CTL conduit rapidement à l'apoptose des cellules effectrices. Enfin, certains phénomènes

normalement impliqués dans l'extinction de la réponse immune, comme l'apoptose des cellules NK activées par certaines cytokines (IFN γ , TNF α) (431, 432), ou au contraire de lymphocytes induite par la privation de facteurs de croissance comme l'IL-2, peuvent être à l'origine de la disparition des cellules cytotoxiques activées.

Cependant, ces hypothèses ne peuvent expliquer la destruction totale des lymphocytes observée dans les modèles expérimentaux, et suggérée dans les PBMC des patients fatalement infectés. La déplétion lymphocytaire dans les organes lymphoïdes de PNH infectés par des filovirus apparaît simultanément à la réplication virale dans les macrophages résidents (146, 148, 156, 433, 434). L'infection extensive des macrophages et autres CPA à l'intérieur du micro-environnement lymphoïde pourrait induire une activation non-spécifique des lymphocytes suivie de l'apoptose massive de ces derniers. Il est probable que certains médiateurs solubles sécrétés, ou molécules de surface exprimées, par les lymphocytes T activés ou les macrophages infectés soient responsables de ces destructions sévères de cellules immunitaires, comme cela a été observé dans de nombreuses infections virales (405, 434-439). Les concentrations de sFasL sont corrélées à l'intensité de la mort cellulaire, représentée par les taux plasmatiques de NMP 41/7. Bien que certaines études aient mis en évidence une activité apoptogène de sFasL sur des cellules exprimant Fas (440-443), des travaux récents ont au contraire montré que sFasL était peu actif et pouvait même inhiber la mort induite par FasL membranaire (444, 445). Les taux de sFasL se prouvent donc pas l'implication de cette voie dans la destruction lymphocytaire, mais démontrent néanmoins l'activation du système Fas/FasL et sous-tendent une forte expression membranaire de FasL à la surface des cellules cytotoxiques, qui peut quant à elle être responsable de la déplétion lymphocytaire, y compris des lymphocytes B activés (405, 446-451). L'expression de FasL membranaire par les monocytes/macrophages activés et la sécrétion de la forme soluble ont été démontrées récemment (348, 388), et l'infection de monocytes/macrophages par certains virus induit l'expression de FasL par ces derniers et provoque la délétion des lymphocytes exprimant Fas (388, 439, 452). L'expression de FasL par certains tissus comme le foie ou l'épithélium intestinal a été décrite et peut également participer à la délétion lymphocytaire (453). D'autres médiateurs détectés dans le plasma des patients infectés – TNF α , IFN γ et NO $^{\cdot-}$ – peuvent également induire l'apoptose de cellules immunitaires. En effet, le TNF α est une molécule

essentielle dans la cytotoxicité et la mort cellulaire induite par l'activation (activation-induced cell-death, AICD) (274, 427, 432, 452, 454-457). Bien que les concentrations de TNF α soient relativement modestes chez les patients fatalement infectés, le TNF α membranaire, s'il est exprimé par les monocytes/macrophages infectés, peut également être impliqué dans ces phénomènes, considérant que l'infection *in vitro* de ces cellules conduit à la production de ce médiateur cytotoxique (142, 143). L'IFN γ , retrouvé en grandes quantités dans le plasma des patients fatalement infectés, est connu pour être une des molécules effectrices de l'AICD et pourrait donc participer à la destruction lymphocytaire (458, 459). Le NO $^{\cdot}$, bien que retrouvé en quantité équivalente chez les survivants, est connu pour son important rôle dans la mort cellulaire (460). Il en est de même pour les GC, qui jouent un rôle important dans l'AICD (274, 461-463). Enfin, d'autres médiateurs solubles qui n'ont pas été étudiés, comme l'IFN β ou le TNF β , voire certaines molécules de surface comme TRAIL (464), pourraient également participer à l'induction de la mort cellulaire.

Il semble que l'activation de cellules immunitaires, macrophages et/ou lymphocytes cytotoxiques, par l'intermédiaire de médiateurs solubles ou de molécules de surface, conduise à une destruction totale des lymphocytes et probablement des macrophages et autres CPA au cours de l'infection fatale par le virus Ebo-Z. Cependant, il est probable que cette activation cellulaire et la production de ces différents médiateurs soient également impliquées dans la pathogenèse de l'infection fatale. Les études de neutralisation de cytokines réalisées dans les modèles expérimentaux, mais aussi certains protocoles vaccinaux, ont mis en évidence un rôle pathogène de ces médiateurs (188, 190, 193, 194, 465) (cf Introduction, chapitre IV-1, p81-82). En effet, le TNF α , l'IFN γ , et les radicaux de l'oxygène peuvent être impliqués dans la CIVD et les troubles de la coagulation, l'augmentation de la perméabilité endothéliale et les désordres hépatiques (142, 147, 466) ; tandis que leur rôle dans la pathogenèse de certaines maladies virales a été décrit (274, 437, 467). Enfin, les concentrations élevées de sFasL peuvent avoir un rôle dans la neutrophilie caractérisant les infections filovirales, cette molécule possédant en effet des propriétés chemotactiques pour ces granulocytes (468, 469).

Ainsi, les interactions précoces entre le virus Ebo-Z et le système immunitaire au cours de l'infection fatale conduisent à des réponses immunes défectueuses et à l'apoptose massive de lymphocytes et probablement de macrophages et autres CPA. Ces phénomènes

favorisent non seulement la réplication virale, mais sont probablement impliqués, par l'intermédiaire de la production excessive et incontrôlée de médiateurs solubles et/ou de molécules de surface, dans les changements physiopathologiques aboutissant à la mort.

Activation de lymphocytes T cytotoxiques 'protecteurs' au cours de l'infection non-fatale.

Contrairement aux patients fatalement infectés, aucune activation cellulaire n'est détectée chez les survivants pendant la phase aiguë de la maladie. Au contraire, une diminution de l'expression des ARNm codant pour les différentes familles de TCR-V β est notée pendant la phase symptomatique, additionnellement à l'absence totale des 3 familles de TCR-V β précédemment évoquée. Une lymphopénie transitoire, cependant moins prononcée que lors de l'infection fatale, est associée à l'infection non-létale de PNH par les virus Ebo-Z, Ebo-S et Ebo-R (20, 139), mais aussi à l'infection de l'homme par Ebo-CI (129). Ces résultats suggèrent qu'une relocalisation ou une délétion de lymphocytes T circulants survient de manière temporaire chez ces patients. L'absence de détection de marqueurs d'apoptose, tant dans le plasma que dans les leucocytes indique que la mort cellulaire ne semble pas, comme chez les patients fatalement infectés, massivement impliquée dans cette diminution de l'expression des ARNm dans les PBMC. Il est cependant possible que des phénomènes de mort cellulaire surviennent de manière localisée et mineure, à l'intérieur des organes lymphoïdes, les macrophages et d'autres cellules phagocytaires pouvant rapidement éliminer les débris cellulaires via le CD36 si la mort n'est pas trop massive et les macrophages fonctionnels (470, 471). La relocalisation transitoire de certains lymphocytes T vers les organes lymphoïdes – sites privilégiés de la réplication virale – et/ou les tissus infectés pourrait expliquer ces phénomènes, et a déjà été décrite dans le cas de la primo-infection par HIV (472). La réponse inflammatoire précoce observée chez ces patients, et plus particulièrement la sécrétion précoce et massive de chemokines, peut être à l'origine de l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, permettant ensuite l'extravasation et la migration des cellules immunitaires (370, 376, 378, 473). Une légère élévation des concentrations de sFas est notée pendant la phase symptomatique, cette sécrétion provenant probablement des macrophages infectés.

Les ARNm codant pour la plupart des familles de TCR-V β sont à nouveau détectés dans les PBMC au moment de la diminution de l'antigénémie et de la disparition des symptômes, environ 12-15 jours après l'infection. De plus, une augmentation de l'expression des ARNm spécifiques de l'IFN γ , CD28, Fas, FasL et perforine est observée à ce moment et pendant la proche convalescence, tandis que des concentrations modérées de sFasL sont détectées de façon transitoire. Le relargage de sFasL provient probablement des lymphocytes T activés et non des monocytes/macrophages infectés. En effet, la réplication virale semble déjà contrôlée à ce moment, étant donné les titres antigéniques décroissants et la moindre quantité d'ARN viral dans les PBMC. Ces résultats suggèrent l'activation de CTL chez les patients survivants. En effet, le délai observé entre l'infection et l'activation cellulaire est compatible avec l'induction de CTL plutôt que de cellules NK (390, 401). La présence de lymphocytes T spécifiques d'Ebo-Z dans les PBMC de survivants pendant la proche convalescence est confirmée par la stimulation *in vitro* de ces cellules par des Ag d'Ebo-Z. Les PBMC ayant été prélevés pendant la phase d'activation cellulaire précédemment décrite, les niveaux d'expression basale des ARNm concernés ainsi que le CD40 et le CD40L, à l'exception du CD28, sont plus élevés que ceux des témoins endémiques. Bien que la RT-PCR réalisée ne soit pas quantitative en dépit de l'homogénéisation des quantités d'ARNm grâce à l'amplification parallèle d'un gène constitutif, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'IFN γ , le CD40L, FasL et perforine est néanmoins observée en réponse à la stimulation antigénique chez la plupart des survivants, et non les témoins endémiques. Il est par contre intéressant de noter que seuls les PBMC de témoins expriment les ARNm de l'IL-2 et de l'IL-4 en réponse à la stimulation mitogénique. Cette différence résulte probablement de l'état d'activation préalable des cellules qui peut modifier leur réponse à une seconde activation. La forte expression des ARNm spécifiques du CD40L *in vitro* et du CD28 dans les PBMC des survivants suggère l'implication de ces 2 voies de costimulation dans l'activation lymphocytaire. Les interactions CD40/CD40L entre les lymphocytes T et les CPA ou les lymphocytes B sont en effet essentielles à l'induction de l'immunité cellulaire et humorale (474, 475), et la fixation du CD80 ou du CD86, exprimés par les CPA, sur le CD28 des lymphocytes T est un important signal de costimulation pour l'induction de la réponse Th, mais aussi des CTL (476-478). La réponse inflammatoire, par l'intermédiaire des cytokines

pro-inflammatoires, des chemokines et probablement d'interactions cellulaires, joue sans doute aussi un rôle dans l'induction de la réponse lymphocytaire observée chez les patients survivants, comme cela a été suggéré précédemment.

Aucune trace d'apoptose n'est détectée dans les PBMC au moment de l'activation des lymphocytes. Contrairement à l'infection fatale, l'activation des lymphocytes T ne conduit pas à la sécrétion massive d'IFN γ ni de sFasL, tandis que les médiateurs pro-inflammatoires ne sont déjà plus observés. La stimulation du CD28 est connue pour promouvoir la survie des lymphocytes activés (360, 429, 479), et une expression soutenue de l'ARNm codant pour Bcl-2 est détectée dans les PBMC au moment de l'activation lymphocytaire (409, 410). Enfin, contrairement aux patients décédés, les CTL apparaissent chez les survivants à un moment où l'antigénémie se trouve dans la phase déclinante, évitant peut être ainsi la mort cellulaire induite par l'excès d'Ag.

L'apparition des lymphocytes T activés dans les PBMC coïncide avec la diminution de l'antigénémie et des quantités d'ARN viral dans les cellules circulantes. Une réponse lymphocytaire T similaire est également observée chez les sujets asymptomatiques environ 2 semaines après le premier contact infectieux et est corrélée à la disparition de l'ARN viral des PBMC (EM Leroy, S Baize *et al*, soumis) (E.M. Leroy, S. Baize *et al*, manuscript en préparation). Le rôle crucial des CTL dans le contrôle de nombreuses infections virales est connu et peut s'effectuer par des mécanismes cytotoxiques, mais également non-lytiques (401, 480, 481). Enfin, l'importance de cette réponse a récemment été démontrée chez le cobaye préalablement immunisé par des plasmides codant pour la GP ou la NP du virus Ebo-Z (220). L'ensemble de ces résultats suggère que la réponse CTL est impliquée dans le contrôle de la réplication virale et l'élimination des cellules infectées ; et représente sans doute un paramètre indispensable de l'issue favorable des FHV à virus Ebo-Z.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les données virologiques obtenues au cours des différentes épidémies Gabonaises ont permis de confirmer l'extrême stabilité génétique de ce virus, et surtout suggèrent que les virus sont identiques quelle que soit l'issue de l'infection. De plus, les paramètres viraux et les symptômes sont similaires entre les patients au début de la maladie, indiquant que l'issue de la FHV à virus Ebo-Z dépend plutôt de la réponse de l'hôte que de l'infection par différentes souches virales.

De profondes altérations du système immunitaire surviennent au cours de l'infection fatale. En effet, la réponse humorale est déficiente, les IgG spécifiques n'étant jamais détectées chez les patients fatalement infectés. Tandis qu'aucune réponse inflammatoire précoce ne semble induite, des quantités élevées de médiateurs solubles majoritairement anti-inflammatoires, résultant probablement de l'infection extensive des monocytes/macrophages, sont détectées dans les stades terminaux et jouent probablement un grand rôle dans les dysfonctionnements immunitaires. Enfin, l'activation précoce de cellules cytotoxiques dans les PBMC est suivie par l'apoptose intravasculaire massive de lymphocytes T, mais probablement aussi de lymphocytes B et peut être de monocytes/macrophages, qui pourrait être médiée par FasL, le $TNF\alpha$ et/ou l' $IFN\gamma$. L'interaction précoce du virus Ebo-Z avec le système immunitaire, par l'intermédiaire des monocytes/macrophages, est probablement à l'origine de ces altérations. Cet effondrement des défenses de l'hôte permet non seulement au virus de se répliquer sans entraves, mais semble être également impliqué, par l'intermédiaire de médiateurs solubles et/ou de molécules de surface, dans les changements physiopathologiques aboutissant à la mort.

Les patients survivant à l'infection par le virus Ebo-Z sont au contraire caractérisés par l'induction d'une réponse inflammatoire précoce, suivie d'une forte production d'IgG₁ et d'IgG₃ dirigées contre plusieurs protéines virales et de l'activation de CTL spécifiques du virus Ebo-Z au moment de la disparition de l'antigénémie, tandis qu'aucune évidence de mort cellulaire n'est détectée chez ces patients. Ainsi, le contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z dépend de la prompt installation d'une immunité spécifique à médiation cellulaire et humorale bien régulée. Ces résultats, alliés à l'extrême stabilité génétique du virus, confirment qu'une

approche vaccinale des FHV à virus Ebo-Z est envisageable, bien que les risques d'immunopathogénèse – déjà observée au cours d'infections de cobaye ou de PNH préalablement immunisés par Ebo-Z – ne soient pas à négliger.

L'ensemble de ces résultats indique qu'au cours de l'infection par le virus Ebo-Z, des évènements très précoces, pour le moment inconnus, déterminent l'issue éventuelle de la maladie. Cette dichotomie pourrait provenir: *i*, de la voie d'inoculation (cutanée, muqueuse, lésions cutanées/muqueuses), ce qui est supporté par la très grande mortalité associée à l'infection par voie parentérale, et, au contraire, par la résistance de souris BALB/C à l'inoculation par voie sous-cutanée ou intra-musculaire d'une souche adaptée d'Ebo-Z ; *ii*, de la dose infectieuse, qui, en dépit de la similitude des paramètres virologiques au début de la maladie pourrait néanmoins être impliquée ; *iii*, de différences génétiques (CMH) ou dans la réponse immune innée entre les patients ; *iv*, d'un contexte immunologique (profil cytokinique) différent dans les organes lymphoïdes dans les premiers temps de l'infection ; *v*, de l'état d'activation des cellules – monocytes, macrophages ou autre CPA – précocement infectées ; *vi*, d'une réponse immune mémoire vis à vis d'un autre virus présentant des réactions croisées avec Ebo-Z, cette dernière hypothèse étant cependant peu probable.

Bien que ces résultats constituent une avancée notable dans la compréhension des changements physiopathologiques conduisant à la mort et des mécanismes immunitaires permettant le contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z, de nombreuses interrogations demeurent et plusieurs axes de recherche découlent de ces travaux.

Surveillance épidémiologique des fièvres hémorragiques virales.

Tout d'abord, il est indispensable et urgent, étant donné les risques d'émergence d'épidémies de FHV en Afrique Centrale et plus particulièrement au Gabon, de mettre en place une surveillance épidémiologique permettant le diagnostic rapide et exhaustif d'éventuels cas. Cette surveillance nécessite, au niveau du CIRMF, l'acquisition du label de l'OMS pour le diagnostic et la recherche sur les FHV et de disposer des outils nécessaires au dépistage des différentes FHV. Outre l'obtention de réactifs spécifiques (Ag, Ac) des différentes FHV auprès de centres collaborateurs du CIRMF, il sera également nécessaire,

considérant les nombreux avantages que cette technique procure, de développer des méthodes de diagnostic par RT-PCR spécifiques de ces infections.

Pathogénèse de l'infection fatale par Ebo-Z et réponses immunes défectueuses.

L'effondrement des défenses immunitaires et l'implication probable des altérations immunologiques dans les changements physiopathologiques aboutissant à la mort nécessitent de plus amples investigations afin de disséquer les mécanismes aboutissant à l'apoptose massive de cellules immunitaires. Un modèle d'infection *in vitro* de PBMC naïfs par le virus Ebo-Z a déjà été développé, les résultats préliminaires étant très encourageants. En effet, il semble que ce modèle reproduise différents aspects de l'infection fatale, comme l'activation de cellules cytotoxiques et des monocytes/macrophages infectés, la sécrétion de certains médiateurs solubles observés *in vivo* et enfin l'apoptose massive des lymphocytes T. L'analyse des mécanismes immunitaires induits au cours de l'infection, à l'aide de la cytométrie en flux, de la RT-PCR et du dosage de cytokines, permettra : *i*, d'analyser la réponse des monocytes/macrophages à l'infection virale ; *ii*, de caractériser les cellules cytotoxiques activées au cours de l'infection ; *iii*, de disséquer les interactions cellulaires et les médiateurs impliqués dans la destruction lymphocytaire massive ; *iv*, de caractériser précisément les cellules touchées par la mort cellulaire ; *v*, de préciser le rôle de différentes molécules de surfaces et de médiateurs solubles par la neutralisation de ces molécules (Ac bloquant ou récepteur soluble) ou, au contraire, par l'utilisation de cytokines recombinantes.

La stimulation de PBMC naïfs, ou préactivés par un mitogène, par des préparations virales ou des Ag d'Ebo-Z inactivés de manière non-dénaturante permettra de mettre en évidence les effets éventuels de protéines virales sur les cellules immunitaires (activité superantigénique ou mitogénique, apoptose, immunosuppression ou au contraire activation cellulaire).

Les cellules endothéliales, et plus particulièrement les monocytes/macrophages, étant les principales cellules cibles du virus, il sera important d'étudier les effets des différents médiateurs solubles retrouvés au cours de l'infection fatale sur l'intensité de la réplication virale dans ces cellules ; et d'une manière plus générale l'état d'activation des cellules cibles induit par l'infection *in vitro* par le virus Ebo-Z.

La réponse immune et le contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z.

Le contrôle de l'infection par le virus Ebo-Z étant associé à l'induction d'une immunité à médiation humorale et cellulaire, il est nécessaire de connaître les mécanismes conduisant à l'installation de cette réponse, mais également de préciser le rôle de chacune de ses composantes dans le contrôle de la réplication virale et la guérison.

L'obtention de prélèvements sanguins des personnes ayant survécu à l'infection par le virus Ebo-Z lors des épidémies Gabonaises permettra l'analyse de la réponse immune mémoire spécifique de ce virus. Il sera en effet intéressant de comparer l'infection *in vitro* des PBMC des survivants, mais également leur stimulation par des Ag Ebo-Z, selon les méthodes précédemment décrites, avec les réponses obtenues avec les PBMC naïfs. Une collaboration est déjà en place avec une équipe présente sur le terrain, et le projet a obtenu l'aval des autorités sanitaires Gabonaises. A ce jour, le recensement et le consentement éclairé de plus de deux-tiers des survivants a déjà été obtenu, et une première série de prélèvements est déjà stockée au CIRMF.

Le rôle apparemment crucial des Ac dans le contrôle des FHV à virus Ebo-Z nécessite cependant de plus amples investigations afin de connaître les mécanismes par lesquels ils interviennent: neutralisation, ADCC, opsonisation, activation cellulaire liée au pontage par l'Ag d'Ac fixés sur les récepteurs aux IgG. Ces études pourront être effectuées à partir des plasmas de survivants des épidémies de Mayibout et Booué et de différents types cellulaires – monocytes, macrophages, cellules NK ; et permettront également de préciser les implications respectives de chacun des isotypes d'IgG constituant la réponse humorale de ces patients.

Enfin, l'importance probable de la réponse inflammatoire précoce dans le contrôle de l'infection, symptomatique ou non, par le virus Ebo-Z incite à étudier le rôle des cytokines inflammatoires dans le contrôle de la réplication virale par les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales et dans les fonctions de présentation d'Ag des cellules monocytaires.

Matériel et Méthodes



Le laboratoire et les équipements de protection.

En raison de leur contagion et de la mortalité qu'ils induisent, les filovirus nécessitent pour leur manipulation des conditions de sécurité maximales, de type BSL-4. Le laboratoire du CIRMF, qui nécessite encore quelques modifications pour répondre aux normes de sécurité, a néanmoins permis la manipulation de prélèvements biologiques de patients, plasmas ou PBMC, et d'isoler les souches virales sur cultures de cellules Véro. La pièce principale du laboratoire, soumise à une dépression et à un renouvellement constant de l'air, expulsé après filtration absolue, contient différents matériels de laboratoire: hotte à flux laminaire, incubateur à CO₂, congélateurs à -80°C et -20°C, container de stockage à azote liquide, microscope inversé, centrifugeuses, bain-marie et enfin, l'isolateur qui constitue la zone répondant aux normes de sécurité maximales. L'accès au laboratoire s'effectue par l'intermédiaire de 2 sas, celui jouxtant le laboratoire étant également soumis à une dépression. Les équipements de protection, revêtus dans le premier sas, consistent en une combinaison intégrale étanche aux particules et aux éclaboussures, des surchausses (X 2), 3 paires de gants en latex, un masque chirurgical et un masque respiratoire à pression positive. Tous ces équipements, à l'exception du masque respiratoire, sont à usage unique et jetés dans le 2^{ème} sas lors de la sortie du laboratoire. Les déchets biologiques solides et liquides sont décontaminés par autoclavage (autoclave à double entrée-sortie), puis incinérés par la suite. Les équipements indispensables du laboratoire (système d'extraction d'air, isolateur, serrure électrique du sas d'entrée) sont préservés des coupures d'électricité du réseau général par l'adjonction d'un onduleur de grande autonomie.

Les prélèvements sanguins et le transport des échantillons.

Lors des prélèvements sanguins des patients symptomatiques, une combinaison identique à celle utilisée dans le laboratoire, des bottes, un masque chirurgical, des lunettes de protection et enfin 2 paires de gants en latex étaient systématiquement portés. Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'aide du système Vaicutainer[®] (Becton-Dickinson, San Jose, USA) dans des tubes contenant de l'EDTA ou parfois du citrate. Les tubes étaient désinfectés à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 2%, emballés dans un emballage anti-choc et hermétique, puis stockés dans la glace jusqu'à l'arrivée au laboratoire où les échantillons étaient traités immédiatement.

Lors de l'épidémie de Mayibout, la plupart des patients en phase symptomatique ont été prélevés dans les villages de Mayibout I & II, puis à l'hôpital de Makokou pendant la convalescence. Six heures de pirogue ont été nécessaires pour acheminer les échantillons de

Mayibout à Makokou, puis encore 6 h de route pour arriver à Franceville. Lors de l'épidémie de Booué, les patients hospitalisés étaient prélevés régulièrement, puis les échantillons transportés par la route (7h) ou, le plus souvent, par voie aérienne (1h30). Dans tous les cas, il ne s'est pas écoulé plus de 12h entre le prélèvement du patient et le traitement des échantillons au laboratoire.

2. Détection des Ag circulants d'Ebo-Z.

Les plasmas sont inactivés par la chaleur (1h à 60°C) avant le dépistage des Ag d'Ebo-Z, ce qui permet de réaliser ces dosages sans aucun risque infectieux. Des plaques de microtitration 'Maxisorp' (Nunc, Copenhague, Danemark) sont incubées une nuit à 4°C avec un 'cocktail' de 7 AcMc spécifiques d'Ebo-Z (fournis gracieusement par P.E. Rollin & T.G. Ksiazek, Special Pathogen Branch, CDC, Atlanta, USA) ou une ascite normale de souris (utilisée comme contrôle négatif pour chaque plasma), dilués au 1/1000^{ème} dans du PBS. Plusieurs dilutions de chaque plasma (de 1/4 à 1/256 pour le diagnostic courant et de 1/4 à 1/6400 pour la cinétique des patients) dans un tampon composé de PBS, de lait écrémé en poudre 5% et de Tween 20[®] 0,1% (Sigma, Deisenhofen, Allemagne) sont ensuite incubées 1h30 à 37°C suivies par un sérum polyclonal de lapin anti Ebo-Z (P.E.R. & T.G.K., CDC, Atlanta) dilué au 1/1500^{ème} dans le même tampon, 1h à 37°C. Enfin, un sérum de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (HRP) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA) est incubé 1h à 37°C, dilué au 1/10000 dans le même tampon supplémenté de 2% de sérum normal de chèvre. Le substrat TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) est utilisé pour la révélation, et les DO sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaques (Diagnostic Pasteur, Marne-la-Coquette, France). Trois lavages en PBS-Tween 20 0,1% sont effectués entre chaque incubation à l'aide d'un laveur de plaques LP35 (Diagnostic Pasteur).

3. Isolement viral.

Des isollements viraux ont été réalisés à plusieurs reprises à partir de prélèvements sanguins de patients fatalement infectés en phase symptomatique. Les cellules Véro E6 sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm² (Nunc) dans du milieu RPMI 1640/HEPES 25mM (Gibco BRL, Eragny, France) supplémenté par 5% de sérum de veau foetal (SVF), Glutamine 1 mM (Gibco), acides aminés non-essentiels 1mM (Gibco) et gentamicine 10 µg/ml (Sigma) à 37°C sans CO₂. Les cultures sont entretenues par repiquage après

trypsinisation des cellules. Le milieu de culture est vidé du flacon, puis 3 ml de versène dilué au 1/5000^{ème} (Gibco) sont ajoutés 3 fois de suite et incubés 1 mn. Enfin, 1 ml d'une solution de trypsine-EDTA (Gibco) est ajouté et le flacon de culture est incubé 1mn à 37°C. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube, centrifugées 10 mn à 500g, remises en suspension dans du milieu de culture et réparties dans plusieurs flacons.

L'inoculation des cellules est effectuée dans l'isolateur en remplaçant le milieu de culture par 200 µl d'un plasma de patient dilué au 1/10^{ème} dans du RPMI, incubé 1h à 37°C. Cinq ml de milieu de culture à 2% de SVF sont alors ajoutés et les cellules incubées à 37°C. Une surveillance microscopique quotidienne est ensuite effectuée afin d'observer les effets cytopathogènes, ballonisation (3-5 jours après l'inoculation) et lyse (5-9 jours). Le surnageant est prélevé lorsque le tapis cellulaire est complètement lysé et stocké à -80°C.

4. Amplification d'un fragment du gène L d'Ebo-Z.

Les PBMC sont obtenus après centrifugation à 1300 g pendant 15 mn de 3 ml de sang total sur ficoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) dans des tubes Leucocep[®] (Becton-Dickinson). Après 2 rinçage en RPMI, les ARN sont extraits des PBMC à l'aide du kit RNeasy[®] (extraction à l'isothiocyanate de guanidium, Qiagen, Düsseldorf, Allemagne) et stockés à -80°C.

Les culots sanguins, obtenus chez les patients de Mayibout après séparation du plasma, ont été conservés à -80°C préalablement à l'extraction. Cent µl de suspension homogénéisée par agitation sont mélangés à 700 µl de la solution d'isothiocyanate de guanidium, la suite de l'extraction étant identique à celle des PBMC.

Transcription inverse.

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu en incubant 1h30 à 42°C un mélange composé de 200 ng d'ARN total (quantité évaluée par absorbance à 260 nm sur un spectrophotomètre Genquant[®], Pharmacia), inhibiteur de RNase 250 U/ml (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne), dithiothréitol 0,1 M (Gibco), hexanucléotides aléatoires 1 µM (Boehringer Mannheim), désoxynucléotides tri-phosphates (dNTP) 1mM (Pharmacia), transcriptase inverse SuperScript II[®] 250 U/ml (Gibco). Le mélange est ensuite chauffé à 65°C pendant 5 mn afin d'inactiver l'enzyme.

Amplification par PCR du fragment du gène L.

10% du volume réactionnel de transcription inverse est utilisé comme matrice pour l'amplification dans un mélange composé de dNTP 1mM, de *Taq* polymérase 10 U/ml (Appligène Oncor, Illkirch, France) et des oligonucléotides suivants (0,4 μ M) (communiqués par A. Sanchez, CDC, Atlanta): 5'-ACATCACTTTGAGCGCCCTCA-3' et 5'-AGCTGGCTTACAGTGAGGATT-3'. Le témoin négatif consiste à amplifier le mélange réactionnel sans ajouter d'ADNc (résultats non présentés). Le mélange est ensuite incubé dans un thermocycleur PE4800 (Perkin-Elmer, Rotkreuz, Suisse) pour 45 ou 35 cycles, selon que la PCR sera unique ou suivie par une seconde, respectivement, à 94°C (30"), 55°C (1') et 72°C (1'30") ; suivis d'une phase d'extension finale à 72°C (5'). Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire (Φ 174 DNA Hae III Digest, Sigma) et visualisés par la fluorescence aux ultra-violets du bromure d'éthidium incorporé dans les fragments d'ADN.

'Nested'-PCR du gène L d'Ebo-Z.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection du fragment du gène L d'Ebo-Z, une 2^{ème} PCR, destinée à amplifier un fragment de 298 pb à partir des produits de première PCR a été développée. Le mélange réactionnel est similaire à celui de la première PCR, à l'exception de la matrice qui est ici le produit de première PCR et des amorces, qui sont les suivantes: 5'-GCGCAAGGTTTCAAGGTTGAA-3' et 5'-TTGAGTCAGCATATATGAGTT-3'. Les conditions thermiques sont les mêmes que précédemment. Là encore, le mélange réactionnel sans produit de première PCR est amplifié comme contrôle de contamination.

5. Immuno-capture des IgM spécifiques d'Ebo-Z.

Des plaques de micro-titration 'Maxisorp' (Nunc) sont incubées une nuit à 4°C avec un sérum hyper-immun de chèvre spécifique des IgM humaines (BioSource, Camarillo, CA, USA). Plusieurs dilutions en PBS-Tween 0,1%-Lait 5% de chaque plasma (de 1/100^{ème} à 1/6400^{ème}) sont incubées sur la plaque 1h30 à 37°C, puis, après 3 lavages en PBS-Tween 0,1%, des Ag Ebo-Z (fournis par P.E.R. & T.G.K., CDC, Atlanta) ou un surnageant de culture négatif sont ensuite appliqués pendant 1h à 37°C, suivis, après 3 lavages, par un sérum hyper-immun de lapin anti Ebo-Z dilués au 1/1500^{ème} dans le même tampon. Un sérum hyper-immun de chèvre spécifique des IgG de lapin et couplé à la HRP est ensuite ajouté et la révélation est effectuée à l'aide d'un substrat TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories).

6. Détection des IgG spécifiques d'Ebo-Z par ELISA.

Détection des IgG spécifiques totales.

Des plaques de microtitration 'MaxiSorp' (Nunc) sont incubées une nuit à 4°C avec des Ag Ebo-Z (fournis par P.E.R. & T.G.K., CDC, Atlanta) ou un surnageant de cellule Véro (contrôle négatif d'Ag), dilués au 1/1000^{ème} en PBS. Différentes dilutions en PBS-Tween 0,1%-lait 5% des plasmas sont ensuite incubées sur les 2 types d'Ag pendant 2h à 37°C. Un sérum hyper-immun de chèvre spécifique de la chaîne γ des IgG humaines, couplé à la HRP (Sigma) est ensuite ajouté, dilué dans le même tampon au 1/4000^{ème}, pendant 1h30 à 37°C. La révélation est effectuée par le substrat TMB.

Détection des isotypes d'IgG spécifiques d'Ebo-Z.

La procédure est la même à l'exception de l'incubation, après les plasmas des patients, d'AcMc spécifiques des différents isotypes d'IgG humaines (IgG1 à 4) couplés à la biotine (Sigma), dilués dans un tampon composé de PBS, Tween 0,1% et de sérum albumine bovine (SAB) 3%, respectivement au 1/200^{ème}, 1/3000^{ème}, 1/3000^{ème} et 1/1000^{ème}, suivie par une solution de streptavidine-peroxidase (Sigma) diluée au 1/1000^{ème} en PBS-Tween 20 0,1% et de la révélation par le substrat TMB.

7. Analyse par western blot de la réponse IgG spécifique.

Deux approches différentes ont été utilisées pour l'analyse en western blot de la réponse IgG des patients, l'une utilisant des Ag d'Ebo-Z homologues (souche Gabon) et l'autre des Ag d'Ebo-Z provenant d'une autre souche (Mayinga).

Un surnageant de culture de cellules Véro E6 inoculées 9 jours auparavant par une souche provenant d'un patient de Booué a été séparé par électrophorèse sur gel d'acrylamide (BioRad, Hercules, CA, USA) (SDS-PAGE) à 9% en condition non-réductrice, en même temps que des témoins de poids moléculaires standards (Amersham, Les Ulis, France), puis transférés sur membrane de nitrocellulose à 55V pendant 4h à 4°C. Les bandelettes de nitrocellulose sont ensuite saturées par une incubation de PBS-Lait 5% pendant 1h à température ambiante. Les plasmas sont dilués au 1/25^{ème} en PBS-Tween 20 0,1%-Lait 2,5% et incubés une nuit à 4°C sous agitation. Les IgG spécifiques des Ag d'Ebo-Z sont détectées par un sérum hyper-immun de chèvre spécifique de la chaîne γ des IgG humaines couplé à la HRP (Sigma) et révélées par un substrat diaminobenzidine (*SigmaFast*[®], Sigma). Une ascite

de souris immunisée contre des Ag d'Ebo-Z (fournie par P.E.R. & T.G.K, CDC, Atlanta) est utilisée comme contrôle positif, diluée au 1/1000^{ème}.

Dans le but d'augmenter la sensibilité de détection, une préparation concentrée et purifiée, comme cela a été précédemment publié (107), de virus Ebo-Z (Mayinga) (généreusement fournie par V.E. Volchkov) a été séparée par SDS-PAGE 10% en condition réductrice, puis transférée sur membrane de fluorure de polyvinylidène à 55V pendant 3h à 4°C. Les plasmas sont ici dilués au 1/1000^{ème} dans le même tampon, et incubés sur la membrane 1h à température ambiante. Le sérum hyper-immun anti IgG humaine couplé à la HRP est dilué au 1/50000^{ème} et incubé 1h. La révélation est effectuée à l'aide d'un substrat chemiluminescent (SuperSignal *Ultra*[®], Pierce, Rockford, USA), les signaux lumineux générés étant enregistrés sur film photographique (Amersham).

8. Dosages immuno-enzymatiques (ELISA).

La plupart des tests ELISA utilisés pour la détection des différents médiateurs ou marqueurs solubles étant des kits commerciaux, un résumé des caractéristiques de ces tests est présenté dans le tableau VI. Le dosage du monoxyde d'azote a été réalisé à l'aide d'un test

molécule dosée	fabricant	Sensibil.	Témoins endém.	molécule dosée	fabricant	Sensibil.	Témoins endém.
IFN α	R&D Sys	20 pg/ml	< seuil	Néoptérine	Immuno	0,2 ng/ml	2,2 ng/ml
IL-12	R&D Sys	10 pg/ml	< seuil	SAA	BioSource	5 ng/ml	< seuil
IL-1 β	R&D Sys	10 pg/ml	< seuil	IL-13	R&D Sys	100 pg/ml	< seuil
IL-1RA	R&D Sys	100 pg/ml	1,6 ng/ml	TGF β	R&D Sys	0,5 ng/ml	22,8 ng/ml
TNF α	R&D Sys	10 pg/ml	< seuil	IL-10	Amersham	20 pg/ml	< seuil
"	Immuno	20 pg/ml	< seuil	"	Immuno	20 pg/ml	< seuil
sTNF-RI	R&D Sys	40 pg/ml	1,8 ng/ml	IL-2	Amersham	20 pg/ml	< seuil
sTNF-RII	R&D Sys	40 pg/ml	5 ng/ml	"	Immuno	20 pg/ml	< seuil
IL-6	Immuno	10 pg/ml	< seuil	IL-4	Amersham	10 pg/ml	< seuil
sIL-6R	R&D Sys	150 pg/ml	20 ng/ml	IL-5	Pharmingen	40 pg/ml	< seuil
MIP-1 α	R&D Sys	40 pg/ml	0,2 ng/ml	IFN γ	R&D Sys	20 pg/ml	< seuil
MIP-1 β	R&D Sys	80 pg/ml	0,93 ng/ml	"	Immuno	20 pg/ml	< seuil
IL-8	Immuno	40 pg/ml	< seuil	sFas	MBL	0,5 ng/ml	1,5 ng/ml
RANTES	R&D Sys	0,5 ng/ml	40 ng/ml	sFasL	MBL	50 pg/ml	< seuil
MCP-1	R&D Sys	25 pg/ml	0,12 ng/ml	NMP 41/7	Calbioch..	10 U/ml	< seuil

Tableau VI. **Caractéristiques des kits ELISA commerciaux utilisés.** La molécule dosée, le fabricant, le seuil de sensibilité des différents kits sont figurés, ainsi que la moyenne de 10 témoins endémiques, quand cette dernière est supérieure au seuil de sensibilité. Les différents fabricants sont: R&D System Europe, Abingdon, UK ; Immunotech, Marseille, France ; BioSource, Camarillo, CA, USA ; Amersham, Les Ulis, France ; Pharmingen, San Diego, CA, USA ; Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan et Calbiochem, La Jolla, CA, USA. Les dosages sont effectués selon les instructions du fabricant.

colorimétrique commercial (Boehringer Mannheim). Brièvement, les plasmas sont dilués 2 fois dans un tampon phosphate de potassium et filtrés par centrifugation, à 2000g pendant 45 mn, sur une membrane retenant les molécules de poids supérieur à 10 kDa (Macrosep, Filtron,

Northborough, MA, USA). Le filtrat est recueilli et testé selon les instructions du fabricant. Le seuil de détection est de 0,3 μ M.

9. Détection dans les PBMC d'ARNm spécifiques de marqueurs d'activation par RT-PCR.

Les ARN sont extraits des PBMC de patients infectés par Ebo-Z à l'aide du kit RNeasy[®] (Qiagen), puis les ARNm sont purifiés par chromatographie sur colonne poly-dT (QuickPrep[®], Pharmacia Biotech) afin d'éliminer les risques d'amplification de l'ADN génomique lors de la PCR (les ARN totaux étant contaminés par de l'ADN génomique après la première extraction), possible lorsque les amorces sont localisées dans le même exon.

Les ADNc sont synthétisés comme cela a été décrit pour la PCR virale, à l'exception de l'utilisation d'oligo-dT₍₁₅₎ 1 μ M (Boehringer Mannheim) comme amorce de transcription inverse au lieu des hexanucléotides aléatoires. La réaction est également réalisée sur certains échantillons d'ARNm sans ajout de transcriptase inverse, ces échantillons étant par la suite soumis à une PCR afin de confirmer l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

Dix pour cent du volume réactionnel est utilisé comme matrice pour la PCR, réalisée dans les mêmes conditions que la PCR virale. L'ARNm codant pour la β actine est utilisé

ARNm	Amorce 'sens' (5'-3')	Amorce 'antisens' (5'-3')	T°
β actine	CAGGCACCAGGGCGTGAT	GCCAGCCAGGTCCAGACG	60
IL-10	TGCCTGGTCCTCCTGACTGG	GCCTTGCTCTTGTTTTCA	60
IL-12	CGGATGCCCCTGGAGAAATG	CTCTTGCCCTGGACCTGAAC	60
IL-2	TACAACTGGAGCATTTACTG	GTTTCAGATCCCTTTAGTTC	50
IL-4	GCCTCACAGAGCAGAAGACT	TCAGCTCGAACACTTTGAAT	50
IL-5	CTGATAGCCAATGAGACTCT	TATTATCCACTCGGTGTTCA	60
IFN γ	TGGAAAGAGGAGAGTGAC	ATTGCTTTGCGTTGGACA	60
CD28	TTTCCTGTACAGGCCAAGTCT	TTGAGGGATCCCTCATTGA	55
CD40	CTGCCACCAGCACAAATACTG	GGGTCCCTACCGTTTCTCT	55
CD40L	CAAACCTTCTCCCGATCTGC	AATGGAGCTTGACTCGAAGC	55
Fas	GGGATTGGAATTGAGGAAGAC	TTGGTGTGCTGGTGAGTGTG	55
Fas-L	GATGGAGGGGAAGATGATGAG	ATGCTGTGTTAGGAATGAAAT	55
Perforine	CTACAGTTTCCATGTGGTAC	TTATTGTCCCACACGGTGCT	55
CD3	TTAGGGCTGAAAGTCTCTCTG	AAAAATGGAATCTGGGAAGTA	50
CD8	CCCCTTTGTAGCCCCATCAC	TCAGTCCCTCCAGCACACTCTG	58
CD4	TCCTTCCCCTCGCCTTTACA	AGCACCCACACCGCCTTCTCC	58
CD14	CTCCCGCCTCAAGGAAGTAC	AGCCCAGCGAACGACAGATTG	55
CD20	TTGGGCATTTTGTGAGTGATG	TCTGTTTCTTCTTCTCTCT	55
Bcl-2	CGACGACTTCTCCCGCGCTACCGC	CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTCC	45

comme gène constitutif afin de vérifier l'intégrité des ARNm et d'homogénéiser les quantités d'ARNm utilisées pour la transcription inverse. Les couples d'amorces utilisés ont été publiés par L. Imberti *et al* (411).

En ce qui concerne la détection des ARNm codant pour les différentes familles de TCR-V β , une région de 18 nucléotides située dans la partie constante de la chaîne β du TCR a été utilisée comme amorce 'anti-sens' et présente la séquence suivante: 5'-GTGCACCTCCTTCCCATT-3'. Les amorces 'sens' sont spécifiques de chaque famille et sont les suivantes:

TCR	Amorce 'sens' (5'-3')	TCR	Amorce 'sens' (5'-3')
V β 1	GCACAACAGTTCCTGACTTGCAC	V β 11	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
V β 2	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT	V β 12	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
V β 3	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC	V β 13.1	CAAGGAGAAGTCCCCAAT
V β 4	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT	V β 13.2	GGTGAGGGTACAACCTGCC
V β 5.1	ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC	V β 14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
V β 5.2	TTCCCTAACTCTCGCTCTGAGCTG	V β 15	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
V β 6	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC	V β 16	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
V β 7	CCTGAATGCCCAACAGCTCTC	V β 17	CAGATAGTAAATGACTTTTCAG
V β 8	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG	V β 18	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
V β 9	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC	V β 19	CAATGCCCAAGAACGCACCCTGC
V β 10	CTCCAAAACTCATCTGTACCTT	V β 20	AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC

L'amplification de l'ADN est réalisée comme pour la PCR virale par 35 (actine) ou 40 cycles (autres amorces) à 94°C pour 30', température d'hybridation spécifique pour 1' et 72°C pour 1'30, suivie d'une étape d'extension finale à 72°C pendant 5'. Les produits de PCR sont visualisés par marquage au bromure d'éthidium après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% simultanément à un marqueur de poids moléculaire (Φ 174, Sigma). Les résultats sont représentatifs de 4 expérimentations différentes pour chaque patient et chaque ARNm.

10. Détection de la fragmentation de l'ADN des leucocytes circulants.

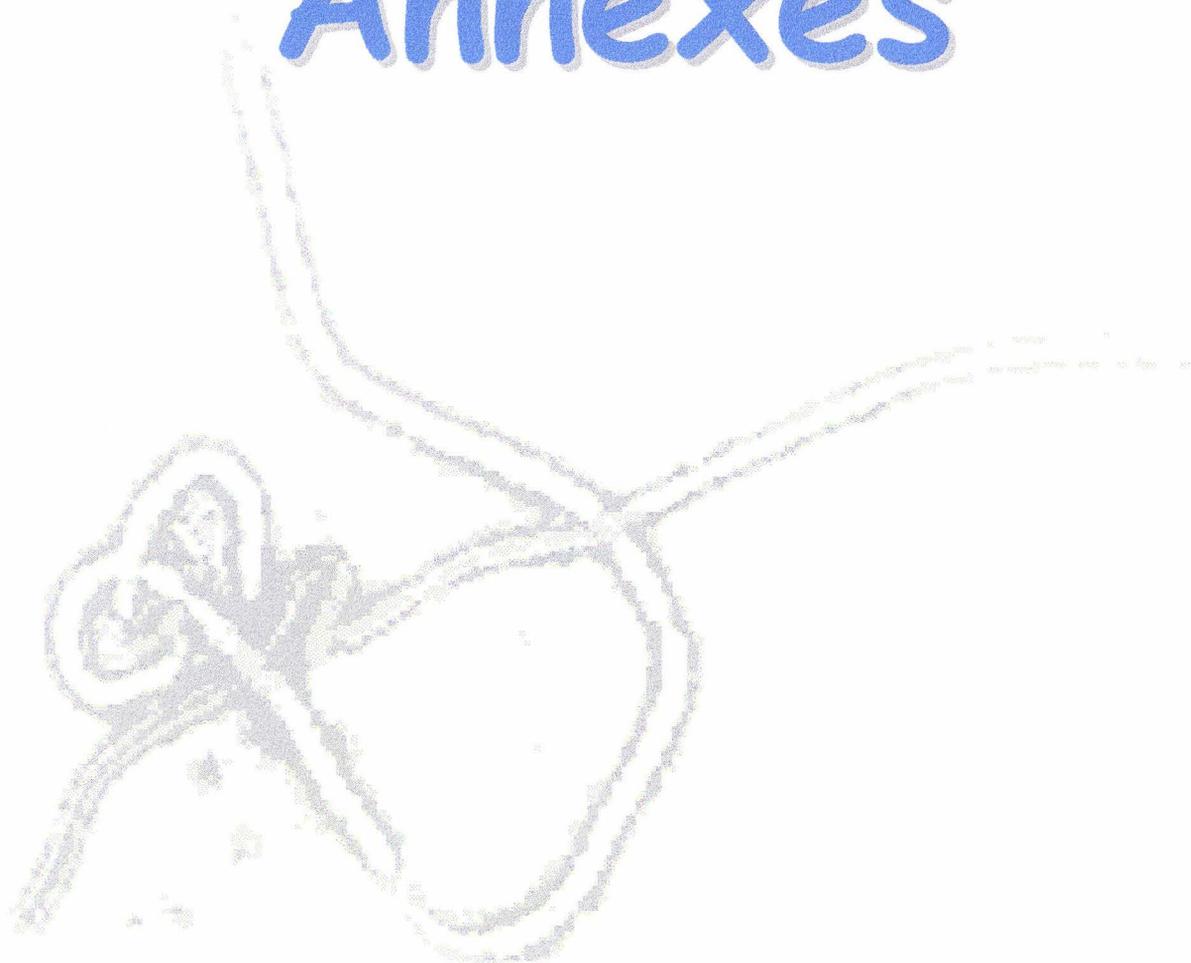
Le sang a été prélevé sur tube citraté, le plasma séparé et le culot sanguin conservé à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique. Les culots sont lysés dans un tampon Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, EDTA 10 mM, sodium lauryl sarcosinate 0,5%, protéinase K 0,5 mg/ml, et incubés 1h à 50°C. La RNase A est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg/ml et une autre incubation d'1h à 50°C est effectuée. L'ADN est ensuite extrait par la

méthode au phénol/chloroforme, mélangé à un tampon de charge composé de glycérol (40% du volume), EDTA 1mM et bleu de bromophénol (0,4% poids/volume), puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire (Φ 174, Sigma) et visualisé par marquage au bromure d'éthidium.

11. Stimulation *in vitro* de PBMC de survivants.

Les PBMC de 4 patients ayant survécu à l'infection par le virus Ebo-Z au cours de l'épisode de Mayibout, obtenus à partir de prélèvements sanguins (tubes EDTA) réalisés 3 semaines après le contact infectieux (10-12 jours après l'apparition des symptômes), mais également de 3 témoins endémiques sains, ont été stimulés *in vitro* par un mitogène et des Ag Ebo-Z (Mayinga). Les PBMC des patients et des témoins sont réparties à 5 millions/puits dans des plaques de culture à 24 puits (Nunc) en milieu RPMI supplémenté d'HEPES 25 mM, SVF 10%, glutamine 1 mM, acides aminés non essentiels 1 mM et gentamicine 10 μ g/ml et stimulées par 10 μ g/ml (micro BCA protein assay, Pierce) d'Ag obtenus à partir de surnageants de culture de cellules Véro infectées par Ebo-Z ou non (témoins pour les Ag non spécifiques d'Ebo-Z), ou par un mitogène (PMA 1 μ g/ml et ionomycine 400 ng/ml) pendant 16 h à 37°C (sans CO₂). Après ce temps, les PBMC sont récoltées, y compris les cellules adhérentes (le fond des puits est raclé à l'aide d'un racleur stérile à usage unique, Falcon, Becton Dickinson), dans du PBS et centrifugées 10 mn à 800g. Les ARNm sont ensuite extraits et traités selon la procédure décrite dans le paragraphe 9.

Annexes



Isolation and partial molecular characterisation of a strain of Ebola virus during a recent epidemic of viral haemorrhagic fever in Gabon

M C Georges-Courbot, C Y Lu, J Lansoud-Soukate, E Leroy, S Baize

Between 1994 and 1996, three successive outbreaks of haemorrhagic fever have occurred in the tropical forest region of north-eastern Gabon with a high fatality rate (57% in Minkouka, 66% in Mayibout¹; final figures not yet available for Booué). Data concerning the first two Gabonese epidemics, as well as Ebola virus isolation carried out at Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), have been previously reported.¹ It is clear from these and from results of serological surveys that the Ebola virus is present in Gabon¹ and widespread throughout equatorial Africa.¹

The third epidemic started on July 13, 1996, in Booué, north-eastern Gabon. There have been no new cases reported since Oct 30. 24 cases presenting with high fever, diarrhoea, vomiting, and haemorrhagic symptoms have been reported to date, one of which was a Gabonese doctor who contracted the disease when treating a patient and who subsequently sought medical care in South Africa, where it is believed he contaminated the nursing personnel. Among these confirmed cases, 17 have died; a 68% fatality rate. On Oct 4, the Gabonese health authorities sent CIRMF sera from two clinically confirmed cases and three exposed individuals. These sera were tested by Ebola antigen virus capture ELISA assay (using reagents kindly provided by the Special Pathogens Branch, CDC, Atlanta, GA, USA). The two clinical cases had high titres (16 and >256) of virus antigen but the three others were negative. The five sera were also screened by indirect immunofluorescence for antibodies (IFA) to Crimean-Congo Fever, Rift Valley Fever, Ebola, Lassa, and Marburg ("CRELM" test). All gave negative results as did sera from the first Ebola epidemic in Gabon, demonstrating the lack of sensitivity of IFA during the acute phase of Ebola virus infection.

On Oct 27, sera from two other cases taken during the

acute symptomatic phase (titres >256 for Ebola virus antigen) were used to inoculate Vero cell cultures. Infected Vero cells showed cytopathogenic features 7 days after inoculation with a high titre of viral antigen as shown by immunocapture. In order to compare both strains we extracted viral RNA from Gabon strain 1996/2 (Booué) and 1994 (Minkouka) from peripheral blood mononuclear cells of patients and supernatants of Vero cultures with RNeasy kit (Qiagen). The first strands of cDNA were synthesised with GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer). The amplification was carried out using the DNA thermal cycler 480 (Perkin-Elmer) with degenerate primers from a conserved region of the L gene, selected using sequences of the Sudan strain, and two Marburg strains (GenBank data). The PCR products of both 1994 and 1996/2 Gabon strains were directly sequenced using Sequenase II kit (Amersham).

The Gabonese strains are very similar: in the first 156 bp sequence, a single base (position 110, A→G substitution) differentiated the two strains. This result indicates that Ebola viruses circulating in Gabon were stable during these two outbreaks which occurred at an 18-month interval. Molecular characterisation of the nuclearprotein and glycoprotein gene regions is in progress in our laboratory, as well as comparison (on the basis of our first results) with Ebola Zaire strain to which Ebola Gabon strains seem to present high homology (>99%) compared with Sudan Maleo strain (77.3%), Marburg Popp strain (71.3%), and Marburg Musoke strain (69.4%).

- 1 Georges AJ, Renaut AA, Bertherat E, et al. Recent Ebola virus outbreaks in Gabon from 1994 to 1996: epidemiologic and control issues. Report of International Colloquium on Ebola virus research, Antwerp, 1996.
- 2 Ivanoff B, Duquesnoy P, Languillat G, et al. Hemorrhagic fever in Gabon: incidence of Lassa, Ebola and Marburg viruses in Haut-Ogooué. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 719–20.
- 3 Johnson E, Gonzalez JP, Georges AJ. Eilovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 536–38.

Unité de Biologie des Rétrovirus et des Pathogènes viraux spéciaux (M-C Georges-Courbot), Unité de Génétique et de Pharmacogénétique, and Unité de Recherche sur les Maladies Emergentes Réémergentes, Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769 Franceville, Gabon



Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients

SYLVAIN BAIZE^{1,2}, ERIC M. LEROY¹, M.-C. GEORGES-COURBOT¹, MONIQUE CAPRON²,
JOSEPH LANSOUD-SOUKATE¹, PATRICE DEBRÉ³, SUSAN P. FISHER-HOCH⁴,
JOSEPH B. MCCORMICK⁵ & ALAIN J. GEORGES¹

¹Centre International de Recherches Médicales de Franceville, B.P. 769, Franceville, Gabon

²Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U 167, Institut Pasteur de Lille,
1 rue du Professeur Calmette, 59019, Lille, France

³Laboratoire Central d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire, CNRS U 625, hôpital de la Pitié-Salpêtrière,
Paris, France

⁴Fondation Marcel Mérieux, 17 rue Bourgelat, 69002 Lyon, France

⁵Pasteur/Mérieux/Connaught, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69260 Marcy l'Etoile, France
S.B. and E.M.L. contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to S.B.; email: sbaize@cirmf.sci.ga or E.M.L.; email: eleroy@cirmf.sci.ga

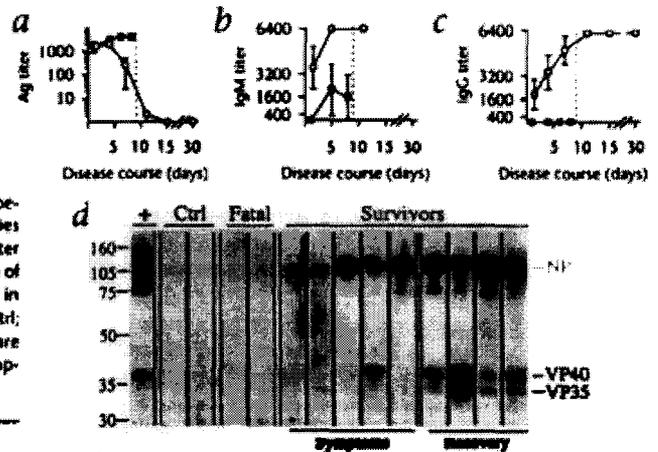
Ebola virus is very pathogenic in humans. It induces an acute hemorrhagic fever that leads to death in about 70% of patients¹. We compared the immune responses of patients who died from Ebola virus disease with those who survived during two large outbreaks in 1996 in Gabon. In survivors, early and increasing levels of IgG, directed mainly against the nucleoprotein and the 40-kDa viral protein, were followed by clearance of circulating viral antigen and activation of cytotoxic T cells, which was indicated by the upregulation of FasL, perforin, CD28 and gamma interferon mRNA in peripheral blood mononuclear cells. In contrast, fatal infection was characterized by impaired humoral responses, with absent specific IgG and barely detectable IgM. Early activation of T cells, indicated by mRNA patterns in peripheral blood mononuclear cells and considerable release of gamma interferon in plasma, was followed in the days preceding death by the disappearance of T cell-related mRNA (including CD3 and CD8). DNA fragmentation in blood leukocytes and release of 41/7 nuclear matrix protein in plasma indicated that massive intravascular apoptosis proceeded relentlessly during the last 5 days of life. Thus, events very early in Ebola virus infection determine the control of viral replication and recovery or catastrophic illness and death.

Ebola virus infection was confirmed in patients with fulminating hemorrhagic fever from outbreaks in Mayibout and Boué. by detection of circulating Ebola virus antigen¹. Patients were then defined by outcome as survivors or fatalities. Healthy individuals without Ebola infection from the same region were defined as uninfected controls. Multiple blood samples were taken from patients during the course of their disease and, in survivors, during recovery. Specimens were stored on ice and immediately transported to our laboratory; less than 6 hours elapsed from patient to laboratory. Blood components were then separated and stored at -80 °C. Ebola antigen was detected in plasma drawn from all patients during the acute phase of the disease (Fig. 1a). Titers were similar in fatalities and survivors on day 2 of disease, but were 200% higher in fatalities on day 4. In survivors, a diminution then a disappearance of viral antigen load coincident with

recovery characterized the final days of disease, whereas antigen titer rose until death in fatalities. Given the consistency of circulating antigen load and clinical manifestations early in disease regardless of outcome, resolution of infection in these patients probably was not related to initial viral antigen load or, by inference, infectious dose. However, we have no information concerning viral load in infected tissues. Ebola-specific IgM and IgG were detected by ELISA in all survivors early in disease (Fig. 1b and c), with titers increasing during the disease course. Modest levels of specific IgM were observed in only one-third of fatalities, and specific IgG was never detected. These data were confirmed by western blot analysis (Fig. 1d). IgG directed against viral nucleoprotein (NP) (100–110 kDa) was detected in all survivors during the symptomatic phase. IgG against the 40-kDa viral protein (VP40) was found during illness in only a few eventual survivors (two of seven) but was present in most during early convalescence (six of seven), as were antibodies against VP35 (35 kDa) in five of seven patients. Responses to the 140-kDa transmembrane glycoprotein were never detected. The mechanism of viral control is unclear, but protection has been achieved against lethal challenge in guinea pigs by vaccine-induced NP-specific IgG, whereas protective vaccine-induced responses against glycoprotein and soluble glycoprotein were chiefly cell-mediated². Prompt and vigorous humoral responses may help survivors to limit and finally control viral dissemination. We also confirmed the absence of specific IgG in fatalities by western blot analysis (Fig. 1d). These defective responses could not be related to an elevated circulating antigen load, as specific IgG appeared early in survivors with antigen titers comparable to fatalities. Moreover, the incubation period (about 4–7 days, based on definite evidence of exposure) and the duration of the symptomatic phase (about 5–9 days) were identical in fatalities and survivors. Finally, the observation that about 30% of patients survived the acute phase of an Ebola outbreak both in Congo and Gabon, where the viruses are identical and seem equally virulent, is inconsistent with a prior exposure of survivors. This would require 30% of the local population to have had inapparent Ebola infection, which, given the observed mor-

ARTICLES

Fig. 1 Circulating Ebola antigen levels and humoral responses in Ebola-infected patients. **a-c**, Vertical dotted lines indicate the time of death for fatalities (●) and recovery for survivors (○). **a**, Detection of circulating Ebola antigen. Results are expressed as mean \pm s.d. of individual values according to, for fatalities, time before death (8 ± 1 d, $n = 3$; 5 ± 1 d, $n = 5$; 3 ± 1 d, $n = 6$; 1 ± 0.5 d, $n = 6$); and for survivors, symptomatic phase (time after onset of symptoms: 2 ± 1 d, $n = 6$; 5 ± 1 d, $n = 5$; 8 ± 1 d, $n = 4$) and recovery (time after disappearance of symptoms: $1-5$ d, $n = 5$; $7-12$ d, $n = 5$; 3 weeks, $n = 5$). **b**, Detection of specific IgM, expressed as mean \pm s.d. of individual values of three fatalities (time before death: 8 ± 1 d, 4 ± 2 d, 1 ± 0.5 d) and three survivors (time after onset of symptoms: 2 ± 1 d, $n = 3$; 5 ± 2 d, $n = 4$; time after disappearance of symptoms: $1-5$ d, $n = 3$). **c**, Detection of specific IgG; results presented as in **a**. **d**, Western blot analysis of specific IgG in plasmas from ten controls (Ctrl; two are shown), eight fatalities (Fatal; Mayibout, three; Booué, five; two are shown) and seven survivors (Survivors; Mayibout, three; Booué, four) during symptoms (five are shown) and recovery (four are shown).



tality, is inconceivable. Thus, humoral responses are severely impaired in fatalities, and this is an important predictor of failure to control virus replication and fatal outcome.

Because interactions with T cells are essential to antibody production by B cells⁴, we assessed T-cell functions by following the expression of several mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) during the course of the disease. IL-2 and IL-4 mRNA were never (or barely) detected in PBMC (Fig. 2a), and protein expression was below the sensitivity of the ELISA in all plasma samples (data not shown). In survivors, expression of gamma interferon (IFN- γ), CD28, Fas, FasL and perforin mRNA during the symptomatic phase of the disease was similar to that in endemic controls (Fig. 2a), indicating that T cells were not activated at this time. In contrast, the period corresponding to antigen clearance and clinical recovery was characterized by up-regulation of IFN- γ , CD28, Fas, FasL, perforin and, to a lesser extent, CD8 mRNA synthesis (Fig. 2a). Upregulation of FasL and perforin mRNA indicates there was activation of cytotoxic cells during recovery in survivors, as both molecules mediate cytotoxic functions in these cells⁵. T-cell activation was observed at the time of viral clearance from blood, indicating that cytotoxic responses may also be implicated in the resolution of infection. Coinciding with onset of symptoms in fatalities, there was up-regulation of IFN- γ , Fas, FasL and, to a lesser extent, perforin, but no increase in CD28 mRNA synthesis (Fig. 2a). Although

IFN- γ , soluble (s)Fas and soluble (s)FasL levels were not substantially elevated in survivors, increasing levels of these proteins were seen in fatalities as symptoms progressed (Fig. 2b-d). The substantial release of IFN- γ and sFasL and synthesis of the respective mRNA in fatalities are further indication that massive activation of cytotoxic cells developed early in disease. Although sFasL is mainly released by activated T and NK cells after metalloproteinase-mediated shedding⁶, activated monocytes are a source of sFasL (ref. 7), and we cannot exclude the possibility of sFasL release by macrophages, as these cells are a chief target of filoviruses⁸. This early activation was followed in the days preceding death by complete disappearance of T cell-related mRNA, including CD3 and CD8, and a considerable decrease in the production of IFN- γ (Fig. 2a and b). RT-PCR analysis of the T-cell receptor (TCR)-V β repertoire in PBMC of fatalities showed a disappearance of all TCR-V β mRNA the last days before death (E.M.L. & S.B., unpublished data), indicating that T cells were deleted or relocated. We therefore studied expression of the mRNA coding for Bcl-2, a protein known to inhibit apoptosis and whose downregulation correlates with cell death⁹. Although a strong synthesis of Bcl-2 mRNA was detected in survivors at the time of T-cell activation (Fig. 2a), fatalities were characterized by a diminution their a disappearance of Bcl-2 mRNA expression in PBMC during the disease.

41/7 nuclear matrix protein (NMP), a nuclear protein cleaved and solubilized during apoptosis¹⁰, was detected in plasma of fatalities, further supporting the idea that apoptosis is involved in a fatal outcome (Fig. 3a). Levels increased up to death, indicating that apoptosis proceeded relentlessly during the last 5 days of life. In contrast, 41/7 NMP was never detected in survivors or uninfected controls (data not shown). We confirmed this by analy-

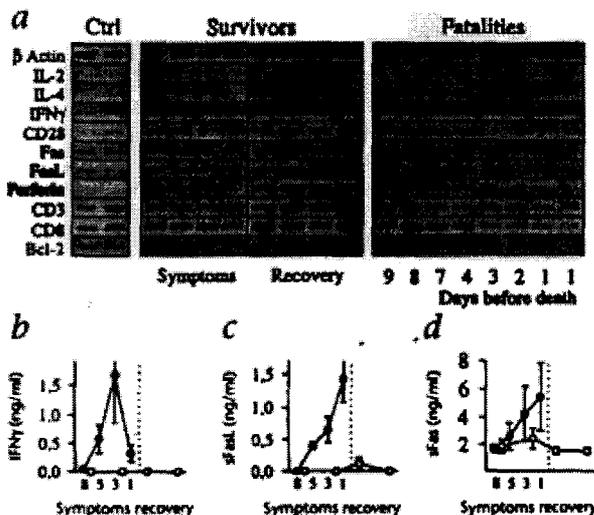
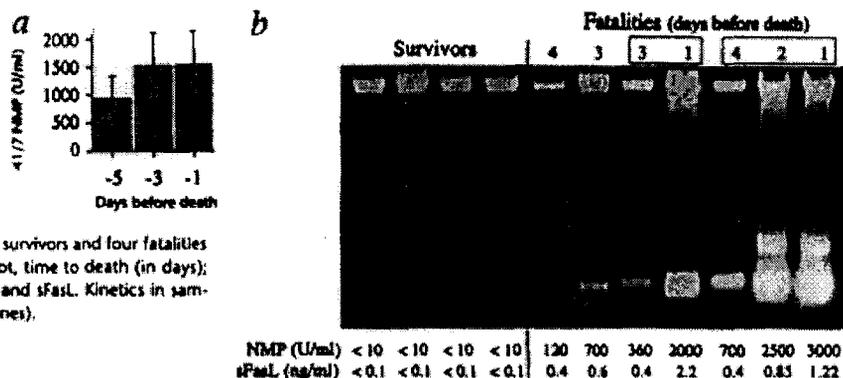


Fig. 2 Analysis of T-cell responses in Ebola-infected patients. **a**, RT-PCR analysis of mRNA in PBMC of four survivors during the symptomatic phase and four during recovery (a few days after symptoms ended); eight fatalities (time before death is indicated below blot); and ten controls (Ctrl; two are shown). Detection of IFN- γ (**b**), sFasL (**c**) and sFas (**d**) in plasma by ELISA. Vertical dotted lines indicate the time of death for fatalities (●) and recovery for survivors (○). Results are expressed as mean \pm s.d. of individual values, and for fatalities were plotted according to the time before death (8 ± 1 d, $n = 3$; 5 ± 1 d, $n = 5$; 3 ± 1 d, $n = 6$; 1 ± 0.5 d, $n = 6$); and for survivors, by symptomatic phase (first half, $n = 7$; second half, $n = 6$) and recovery (a few days after symptoms ended, $n = 5$; 1 week after, $n = 4$). **b**, IFN- γ was below the limits of sensitivity in controls ($n = 10$; not shown). **c**, sFasL was below the level of sensitivity in controls ($n = 10$; not shown). **d**, Mean of controls ($n = 10$): 1.5 ± 0.5 ng/ml.

ARTICLES

Fig. 3 Detection of apoptosis in fatalities. **a**, Detection of 41/7 NMP in plasma by ELISA. Only fatalities are shown, as 41/7 NMP was below the detectable limit in survivors and controls ($n = 10$). Results are expressed as the mean \pm s.d. of individual values at different times before death: 5 ± 1 d, $n = 5$; 3 ± 1 d, $n = 6$; 1 ± 0.5 d, $n = 6$. **b**, Detection of DNA fragmentation in leukocytes. Blood was obtained from four survivors and four fatalities during the symptomatic phase. Above blot, time to death (in days); below blot, concentrations of 41/7 NMP and sFasL. Kinetics in samples from 2 patients are shown (last five lanes).



sis of DNA fragmentation in leukocytes (Fig. 3b). There was considerable fragmentation of DNA in fatalities compared with that in survivors at the same time of disease. Apoptosis was induced in two patients with fatal outcome very soon after the onset of disease, increasing up to death, characterized by strong release of 41/7 NMP and accumulation of short DNA fragments in the final stages (Fig. 3b).

The simultaneous disappearance of CD3, CD8 and TCR- β mRNA in PBMC and evidence of extensive intravascular apoptosis indicate that T cells were dying, as expression of TCR-CD3 complexes is reduced during T-cell apoptosis¹¹. Our observations are consistent with the considerable lymphopenia and severe destruction in spleen, lymph nodes and bone marrow seen during infection of rhesus monkeys by Ebola virus¹²⁻¹⁴. However, lysis of Ebola-infected cells such as monocytes and macrophages may partially account for cell death. Endothelial cells have been described as binding Ebola transmembrane glycoprotein¹⁷, and evidence of replication has been reported *in vivo* in humans¹⁸ and non-human primates¹⁹. This may account for some of the NMP release, but the massive fragmentation of DNA observed in blood is inconsistent with endothelial origin. Furthermore, apoptosis was observed early during disease in all fatalities studied, whereas hemorrhagic signs indicating endothelial destruction (petechiae, ecchymoses, rash, gum bleeding and frank hemorrhages) were observed only in some terminal patients. Apoptosis was induced in fatal infections at a time when both fatalities and survivors presented similar clinical signs and had equally elevated viral antigen, which indicates that cell death was not a direct consequence of viral replication. However, we cannot exclude the possibility that apoptosis was related to different amounts of secreted viral proteins such as soluble glycoprotein. In fatalities, excessive activation of T cells (as indicated by considerable release of IFN- γ) during the acute phase of the disease, when viral antigen was very high, may lead to downregulation of TCR and apoptosis, as in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus¹⁶. The concentration of 41/7 NMP, as an indicator of the extent of cell death, correlated with the level of sFasL (Fig. 3b and $r = 0.71$, $n = 12$, data not shown). This in itself is not evidence of Fas-mediated death, as sFasL has been shown to be poorly active and even to inhibit death mediated by transmembrane FasL (refs. 20,21).

Thus, recovery from Ebola virus infection is related to orderly and well-regulated humoral and cellular immune responses, characterized by the early appearance of specific IgM and IgG followed by activation of cytotoxic cells at the time of antigen clearance from blood. In contrast, fatal outcome is associated

with impaired humoral responses with no detectable specific IgG. Early activation of T cells unable to control viral dissemination is followed by considerable intravascular apoptosis. Given these preliminary insights into the pathogenesis of Ebola infection, factors or events very early in infection determine the eventual outcome.

Methods

Patients and outbreaks. We obtained specimens from patients (with verbal informed consent) in two Ebola epidemics²². The first epidemic occurred in February 1996 in Mayibout, an isolated village on the Ivindo river in a dense tropical rainforest (northeast Gabon). The population has little access to healthcare; patients were hospitalized in the nearest town, Makokou, 7 h away. Eighteen of twenty primary cases had contact with a single chimpanzee found dead in the forest, presumably from Ebola infection, which they dismembered, cooked and ate. As we could not determine the source of contamination of the two other primary cases, we excluded them of the study. After these primary infections, ten secondary cases and one tertiary case (contaminated by human-to-human contact) were observed but not included here. Thus, the patients we studied for this outbreak were presumably infected by the same Ebola virus strain but were definitely infected at the same time.

A second, distinct epidemic occurred 6 months later in the town of Booué, 300 km from Mayibout. The single primary case was a hunter from the surrounding rainforest, and the epidemic resulted from subsequent human-to-human transmission in the community. All secondary cases gave a history of direct contact with biological fluids (blood, sweat, urine, feces) of sick patients. Patients were hospitalized at the Booué Medical Center, where their symptoms were treated.

Mortality was similar for both epidemics (66% for Mayibout and 75% for Booué), and was constant throughout the Booué outbreak (5 months in duration). During the Mayibout outbreak, we were only able to collect plasma, and these patients are included only in studies of antibody response and circulating antigen (six patients and five controls). During the Booué outbreak, we obtained specimens suitable for analysis in all our experiments (twelve patients and ten controls).

Detection of circulating-Ebola antigen and humoral responses against Ebola virus. Biological samples were obtained and handled according to the WHO recommendations for management of viral hemorrhagic fevers²³. Blood samples were obtained from both fatalities and survivors sequentially during the course of illness, and during the recovery period of survivors. Plasma samples were stored at -80°C . Ebola circulating antigen and specific IgM and IgG were detected in plasma from fatalities and survivors using reagents furnished by the Special Pathogen Branch of the CDC (Atlanta, Georgia); IgM detection was done by the CDC team.

For the detection of Ebola-circulating antigen, 'maxisorp' plates (Nunc, Copenhagen, Denmark) were coated overnight with a 'cocktail' of seven monoclonal antibodies against Ebola Zaire or with a normal mouse ascitic fluid. Several dilutions of each plasma were incubated on each coating for 1 h at 37°C followed by incubation with rabbit anti-Ebola Zaire polyclonal

ARTICLES

serum for 1 h at 37 °C and then peroxidase (HRP)-conjugated goat antibodies against rabbit IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) for 1 h at 37 °C. TMB substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) was used, and results are expressed as antigen titer.

For IgM detection, 'maxisorp' plates were coated overnight with goat antibody against human IgM (BioSource, Camarillo, California). Several dilutions of each plasma were incubated on the plate for 1 h at 37 °C, then Ebola-Zaire antigen or irrelevant culture supernatant was applied, followed by rabbit anti-Ebola Zaire polyclonal serum for 1 h at 37 °C and then HRP-conjugated goat antibody against rabbit IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) for 1 h at 37 °C. Results are expressed as IgM titer.

Specific IgG was detected by coating 'maxisorp' plates overnight with Ebola-Zaire antigen, several dilutions of each plasma were incubated for 1 h at 37 °C, followed by incubation with HRP-conjugated anti-human IgG (γ -specific) (Sigma) for 1 h at 37 °C. Results are expressed as IgG titer.

ELISA. IFN- γ was detected in plasma by ELISA with a sensitivity of 20 pg/ml (Immunotech, Westbrook, Maine); sFas, by ELISA with a sensitivity of 0.1 ng/ml (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan); sFas, by ELISA with a sensitivity of 0.3 ng/ml (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan); and 41/7 NMP, by ELISA with a sensitivity of 10 U/ml (Calbiochem, La Jolla, California).

Western blot analysis. Ebola virus was purified from tissue culture medium as described¹⁸ (furnished by V.E. Volchkov), separated by reducing, 10% SDS-PAGE, with standard molecular weights (Rainbow; Amersham), and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane at 55V for 3 h at 4 °C. Membranes were 'blocked' with 5% milk in PBS for 1 h at room temperature. Plasmas were diluted 1:1,000 in 2.5% milk and 0.1% Tween 20 in PBS and incubated onto membrane 1 h at room temperature. Ebola-specific IgG were detected with HRP-conjugated goat anti-human IgG (γ -specific) (Sigma) at a dilution of 1:50,000, followed by chemiluminescent substrate (SuperSignal[®] ultra; Pierce, Rockford, Illinois). Anti-Ebo-Zaire hyperimmune goat serum (provided by V.E. Volchkov) was diluted 1:3,000 and used as a positive control, and was detected with HRP-conjugated antibody against goat IgG (Sigma).

Detection of mRNA by RT-PCR. Total RNA was isolated from PBMC using RNeasy[®] kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany), and mRNA was further purified using QuickPrep[®] kit (Pharmacia). cDNA was synthesized from 200 ng mRNA using Superscript II[®] reverse transcriptase (Life Technologies) and oligo dT₁₈ (Boehringer); 10% of this reaction was used as a template for PCR. To verify the integrity of the mRNA obtained, β -actin mRNA was amplified from the same cDNA preparation. The following primers were used (annealing temperatures are indicated for each primer pair): β -actin, 5'-CAGGCACCAGGGCGTGAT-3' and 5'-GCCAGCCAGGTCAGACG-3', 60 °C; IL-2, 5'-TACAACTGGAGCATTACTG-3' and 5'-GTTTCAGATCCCTTAGTTC-3', 50 °C; IL-4, 5'-GCCTCACAGAGCAGAAGACT-3' and 5'-TCAGCTCGAACACTTTGAAT-3', 50 °C; IFN- γ , 5'-TGGAAAGAGGAGAGTAC-3' and 5'-ATTGCTTTGGCTTGACA-3', 60 °C; CD28, 5'-TTTCTGTACAGGCCAAGTCT-3' and 5'-TTTGAGGGATCCCTCATTGA-3', 55 °C; Fas, 5'-GGGATGGAATTGAGGAGAC-3' and 5'-TTGGTGTGCTGGTGTGAGTGTG-3', 55 °C; Fas-L, 5'-GATGGAGGGGAAGATGATGAG-3' and 5'-ATGCTGTGTTAGCAATGAAAT-3', 55 °C; Perforin, 5'-CTACAGTTCCATGTGGTAC-3' and 5'-TTATTGTCCACACGGTGTCT-3', 55 °C; CD3, 5'-TTAGGGCTCAAAGTCTCTCTG-3' and 5'-AAAAATGGAATCTGGGAAGTA-3', 50 °C; CD8, 5'-CCCACCTTTGAGCCCATCAC-3' and 5'-TCAGTCTCCAGCACACTCTG-3', 58 °C; Bcl-2, 5'-CGACGACTTCTCCCGCCGTACCGC-3' and 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTC-3', 45 °C. DNA was amplified by PCR with Taq DNA polymerase (Appligene Oncor, Illkirch, France) for 40 cycles (cytokines and activation markers) or 35 cycles (β -actin) at 94 °C for 1 min, annealing temperature for 1 min and 72 °C for 1 min 30 s. PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The results were representative of four experiments.

Detection of DNA fragmentation. Blood was collected in citrated tubes and cell pellets were frozen at -80 °C. For assessment of DNA fragmentation, cell pellets were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.5% sodium lauryl sarcosinate and 0.5 mg/ml proteinase K, and were incubated for 1 h at 50 °C. Then, RNase A was added to a final concentration of 0.1 mg/ml and samples were incubated at 50 °C for another hour. DNA was further extracted by phenol-chloroform method. Loading buffer (40% glycerol, 1 mM EDTA, 0.4% bromophenol blue) was added and DNA was separated by electrophoresis on a 2% agarose gel, and was visualized by ethidium bromide staining.

Acknowledgments

We are grateful to C. Tevi-Benissan and P. Tshipamba for their assistance on fieldwork, and A. Pendy, B. Pamba and P. Obiang for access to patient specimens. We also thank V.E. Volchkov, P.E. Rollin and T.G. Ksiazek for providing Ebola-specific reagents and for their assistance with western blot analysis and IgM detection. S.B. is supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (France). CIRMF is supported by the state of Gabon, ELF-Gabon and the Ministère de la Coopération Française.

RECEIVED 17 DECEMBER 1998; ACCEPTED 17 FEBRUARY 1999

- Peters, C.J. & Khan, A.S. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 85-95 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
- Ksiazek, T.G. et al. Enzyme immunoassay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* 30, 947-950 (1992).
- Xu, L. et al. Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med.* 4, 37-42 (1998).
- Clark, E.A. & Ledbetter, J.A. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425-428 (1994).
- Lowin, B., Hahne, M., Maltzman, C. & Tschopp, J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-653 (1994).
- Kayagaki, N. et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182, 1777-1783 (1995).
- Kiener, P.A. et al. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand. Rapid release following cellular activation. *J. Immunol.* 159, 1594-1598 (1997).
- Feldmann, H. et al. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* 70, 2208-2214 (1996).
- Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 3, 614-620 (1997).
- Miller, T., Beausang, L.A., Meneghini, M. & Lidgard, G. Death-induced changes to the nuclear matrix: the use of anti-nuclear matrix antibodies to study agents of apoptosis. *Biotechniques* 15, 1042-1047 (1993).
- Jeon, S.H. et al. Expression of Tcf-1 mRNA and surface TCR-CD3 complexes are reduced during apoptosis of T cells. *Int. Immunol.* 10, 1519-1527 (1998).
- Fisher-Hoch, S.P. et al. Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J. Int. Dis.* 152, 887-894 (1985).
- Baskerville, A., Bowen, E.T., Platt, G.S., McArdell, L.B. & Simpson, D.I. The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.* 125, 131-138 (1978).
- Baskerville, A., Fisher-Hoch, S.P., Neild, G.H. & Dowsett, A.B. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J. Pathol.* 147, 199-209 (1985).
- Jaax, N.K. et al. Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 120, 140-155 (1996).
- Johnson, E., Jaax, N., White, J. & Jahrling, P. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int. J. Exp. Pathol.* 76, 227-236 (1995).
- Yang, Z.-Y. et al. Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 279, 1034-1037 (1998).
- Zaki, S.R., Greer, P.W., Goldsmith, C.S. & Coffield, L.M. in *International Colloquium on Ebola Virus Research* (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, 1996).
- Callimore, A. et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 183, 1383-1393 (1998).
- Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T. & Nagata, S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* 186, 2045-2050 (1997).
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. & Nagata, S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature Med.* 4, 31-36 (1998).
- Georges-Courbot, M.C. et al. Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 59-62 (1997).
- WHO. Recommendations for management of viral haemorrhagic fevers in Africa. in *Workshop on Viral Haemorrhagic Fevers* (Sierra Leone, 1985).
- Feldmann, H., Nichol, S.T., Schikore, M., Sleniczka, W. & Klenk, H.-D. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology* 182, 353-356 (1991).

Réponse immune précoce et le contrôle de l'infection par le virus Ebola

Le virus Ebola est l'un des plus dangereux pathogènes de l'Homme. Il se transmet par simple contact et induit une fièvre hémorragique le plus souvent mortelle 5 à 10 jours après l'apparition des premiers symptômes. Cependant, 25 à 35% des patients survivent à l'épisode aigu et évoluent spontanément vers la guérison. Le rôle crucial du système immunitaire dans le contrôle de l'infection a été récemment mis en évidence chez l'Homme et des études chez l'animal montrent qu'une approche vaccinale est envisageable. Après avoir brièvement rappelé quelques généralités sur la fièvre hémorragique à virus Ebola, nous nous intéresserons plus particulièrement à la pathogenèse de l'infection et aux réponses immunes observées en fonction de l'issue de la maladie, pour conclure sur les perspectives vaccinales et thérapeutiques.

La fièvre hémorragique à virus Ebola.

Le virus Ebola est un virus à ARN de polarité négative, non segmenté et enveloppé, de la famille des *filoviridae*, dont il existe à ce jour 4 sous-types : Zaïre, Soudan, Côte d'Ivoire et Reston. Son génome de 19 000 bases comprend 7 gènes codant pour 8 protéines : la glycoprotéine (produite sous 2 formes, l'une de 120-150 kDa membranaire et l'autre de 50-70 kDa soluble [1]), les protéines virales de 40 kDa (VP40), de 35 kDa (VP35), de 30 kDa (VP30) et de 24 kDa (VP24), la nucléoprotéine (NP, 90-110 kDa) et l'ARN-polymérase (L) [2]. Le virus Ebola a été initialement décrit en 1976 lors des épidémies de Yambuku (République Démocratique du Congo, RDC) et de Nzara (Soudan). Récemment, plusieurs épidémies de fièvre hémorragique à virus Ebola sont survenues en RDC (Kikwit, 1995, 315 cas) [3] et au Gabon (Mékouka, 1994, 45 cas ; Mayibout, 1996, 29 cas et Booué, 1996, 60 cas) [4]. Le réservoir naturel du virus Ebola n'est pas encore connu, mais l'Homme se contamine souvent par l'intermédiaire de primates non-humains infectés, eux-mêmes très sensibles à la maladie. L'infection se transmet ensuite par simple contact d'une personne avec les fluides biologiques (sueur, sang, vomissures, fèces) de sujets infectés en phase symptomatique. Après une période d'incubation de 5 à 7 jours apparaissent les premiers symptômes, communs à tous les patients quelle que soit l'issue de la maladie : température élevée, asthénie, arthralgie, myalgie, diarrhée, douleurs abdominales, rash cutané et congestion de la conjonctive oculaire. Des signes hémorragiques surviennent en phase terminale, évoquant le plus souvent une issue fatale : gingivorragie, épistaxis, pétéchies, méléna, hématurie [5].

Le seul moyen actuel de contrôle des épidémies, en l'absence de vaccin et de traitement spécifiques, est l'isolement des patients et le port de tenues protectrices par les personnels soignants.

Pathogénèse et réponse immune défectueuse lors de l'infection fatale.

De nombreux modèles animaux (primates non-humains, cobaye, souris) sont sensibles à l'infection par le virus Ebola et reproduisent une pathologie similaire à celle observée chez l'Homme. Cependant, la nécessité de manipuler ces modèles en laboratoire à sécurité maximale (BSL4) a été un frein majeur aux études expérimentales et a limité la compréhension de la physiopathogénèse de l'infection. Les macrophages sont les premières et principales cibles virales, permettant ainsi la dissémination du virus dans la rate, les ganglions lymphatiques, le foie et les poumons où il se réplique activement. La survenue des premiers symptômes est étroitement corrélée à l'apparition de la virémie plasmatique. Enfin, l'infection se généralise à d'autres cellules (fibroblastes, hépatocytes, cellules endothéliales), et induit des changements physiopathologiques sévères (atteinte hépatique, troubles de la coagulation, hypotension, choc hypovolémique et hémorragies multiples) aboutissant à la mort des patients [6-8].

Parallèlement aux effets cytopathogènes directement liés à la réplication virale, l'infection fatale par le virus Ebola s'accompagne de profondes altérations du système immunitaire. Ainsi, des résultats récents montrent qu'au cours de l'infection mortelle de l'Homme, seul un tiers des patients parvient à produire de faible taux d'IgM spécifiques du virus Ebola et aucune réponse IgG spécifique n'est détectée jusqu'à la mort, suggérant que la réponse humorale est altérée chez ces patients [9] (*figure 1*). Des ARN messagers (ARNm) codant pour l'interféron gamma (IFN γ), Fas ligand (FasL) et perforine sont présents dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) dès l'apparition des symptômes et des concentrations croissantes d'IFN γ sont détectées dans le plasma pendant la maladie, suggérant l'activation de cellules cytotoxiques [9, 10]. Ces marqueurs, ainsi que d'autres ARNm transcrits spécifiquement par les lymphocytes T comme le CD3 et le CD8, disparaissent toutefois de la circulation 2 ou 3 jours avant le décès [9]. Des quantités croissantes d'ADN fragmenté et d'une protéine de matrice nucléaire (NMP 41/7) sont retrouvées dans le sang circulant les 5 derniers jours avant la mort, indiquant que les stades terminaux de la maladie se caractérisent par une mort massive de cellules par apoptose [9] (*figure 1*). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T sont majoritairement touchés par l'apoptose, mais d'autres cellules comme les lymphocytes B, les macrophages et les cellules endothéliales peuvent également être impliquées. De même, les infections expérimentales du cobaye, du macaque et du babouin se caractérisent par une déplétion lymphocytaire sévère dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques) et une lymphopénie détectable dans la circulation 48h après l'infection. De plus, aucune réponse immune cellulaire ne semble se mettre en place dans ces modèles, à l'exception d'une neutrophilie précoce [7, 11-13]. Aucune évidence de réplication virale n'étant observée dans les lymphocytes [12], cette destruction cellulaire résulte probablement de l'infection massive du macrophage, qui peut, par l'intermédiaire de certaines cytokines ou protéines de surface, être responsable des altérations observées dans les organes lymphoïdes. Certaines protéines virales, comme la glycoprotéine (GP) qui existe sous forme membranaire ou soluble (sGP), peuvent également être impliquées dans cet effondrement du système

immunitaire. En effet, une récente publication a montré que la sGP, présente en grande quantité dans le sang des malades [14], se fixerait à la surface des neutrophiles via le CD16b (Fc γ RIIIb) et inhiberait leur activation [15]. En outre, la GP possède dans son extrémité C-terminale une région homologue à une séquence immunosuppressive contenue dans les protéines d'enveloppe de plusieurs rétrovirus oncogènes [16]. Enfin, le tropisme privilégié du virus pour le macrophage peut avoir un rôle important dans la pathogenèse. En effet, l'infection du macrophage induit une activation cellulaire et une sécrétion de molécules proinflammatoires comme le TNF- α [10, 17] qui peuvent ensuite agir sur les cellules endothéliales et provoquer une augmentation de la perméabilité vasculaire et une baisse de la pression sanguine, ce qui, associé aux effets cytopathogènes liés à la réplication dans les cellules endothéliales, peut expliquer les changements physiopathologiques observés en phase terminale [18].

L'interaction précoce du virus Ebola avec le système immunitaire, par l'intermédiaire des macrophages, semble donc induire une réponse immune défectueuse et une destruction massive de cellules immunitaires. Cet effondrement des défenses de l'hôte permet non seulement au virus de se propager sans entraves, mais semble être également impliqué dans les changements physiopathologiques conduisant à la mort.

Réponse immune précoce et contrôle de l'infection.

Malgré l'extrême pathogénicité du virus Ebola, 25 à 35 % des patients survivent à l'épisode aigu et guérissent de l'infection en l'absence de tout traitement. Le mode de contamination et la période d'incubation de ces patients sont similaires à ceux des sujets qui succombent. Ces patients ne se distinguent pas non plus sur le plan clinique au début de la maladie. En effet, durant cette période, ils présentent les mêmes symptômes que les patients décédés (fièvre, asthénie, diarrhée, douleurs et vomissements), tandis que certains signes hémorragiques (hématurie, méléna) sont souvent observés [5]. Il en est de même sur le plan virologique, puisque l'antigénémie et la virémie sont semblables les deux premiers jours de la phase symptomatique. Cependant, 3 à 5 jours après l'apparition des symptômes, l'antigénémie et la charge virale circulante commencent à diminuer pour devenir indétectables au moment de la convalescence (*figure 2*) [9, 19]. Ces observations, associées à l'extrême stabilité génétique du virus entre les différents types de patients et au cours du temps [20], suggèrent que la protection résulterait d'une réaction de l'hôte plutôt que de l'infection par une souche virale défectueuse ou atténuée.

De récents travaux ont montré que ces patients présentent une réponse immune radicalement différente de celle observée lors de l'infection fatale. La réponse humorale se met en place très précocement, puisque des taux significatifs d'IgM spécifiques du virus Ebola sont présents dès l'apparition des symptômes. Les IgG spécifiques apparaissent également dès le début de la phase symptomatique et atteignent rapidement des titres élevés (*figure 2*) [9, 21]. Ces IgG sont principalement dirigées contre la NP, mais la VP40 et la VP35 sont également reconnues [9]. Des ARNm, représentatifs de l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (IFN γ , FasL, perforine, CD28),

sont détectés dans les PBMC au moment de la disparition de la charge virale et pendant la première semaine de convalescence (*figure 2*). Cette réponse cellulaire se distingue de celle observée lors de l'infection fatale par son apparition plus tardive et l'absence de sécrétion massive d'IFN γ en dépit d'une forte expression de l'ARNm dans les PBMC [9]. La chute de l'antigénémie étant corrélée à l'apparition des IgG spécifiques, ces anticorps semblent avoir un rôle primordial dans le contrôle de l'infection, tandis que la réponse cellulaire cytotoxique serait probablement impliquée dans l'élimination des cellules infectées. La production d'anticorps IgG dépendant de l'interaction entre les lymphocytes B et T 'helper' spécifiques, la présence d'IgG anti-Ebola une semaine environ après l'infection suggère l'activation de lymphocytes T quelques jours après le contact infectieux. La survie des patients semble donc dépendre de l'induction d'une réponse immune à composante humorale et cellulaire très précoce. Aucune trace de mort cellulaire par apoptose n'est détectée chez ces patients pendant la phase symptomatique et la proche convalescence, ce qui renforce l'hypothèse d'une altération majeure des fonctions immunitaires lors de l'infection fatale.

Ces résultats montrent donc que l'évolution de la maladie, pour des raisons encore inconnues, est déterminée de façon irréversible très peu de temps après l'infection virale. Etant donné l'importance de la réponse inflammatoire dans l'initiation de la réponse immune et le rôle de certaines molécules proinflammatoires dans l'activation des fonctions cytotoxiques du macrophage et l'inhibition de la réplication virale [22, 23], il est possible qu'une réponse inflammatoire précoce soit déterminante dans l'installation de cette immunité et le contrôle de l'infection par le virus Ebola.

Perspectives vaccinales et thérapeutiques.

Même si les mécanismes précoces menant à l'induction *in vivo* d'une réponse immune protectrice ne sont pas encore connus, ces résultats, associés à la grande stabilité génétique du virus Ebola [20], montrent qu'une approche immunoprophylactique est envisageable chez l'Homme. Cependant, les nombreuses études vaccinales réalisées chez l'animal indiquent qu'il est difficile d'obtenir une protection croisée contre les différents sous-types de virus Ebola [24], tandis que l'immunisation avec des antigènes viraux ou du virus entier inactivé n'est pas efficace. Ainsi, l'inoculation de souris BALB/c avec une souche virale non-adaptée n'induisant pas de pathologie sévère – et non avec le même virus inactivé – protège contre une infection par le virus devenu pathogène après de multiples passages [25]. Il semble donc que la transcription de gènes viraux et/ou la réplication virale, probablement pour des raisons de présentation d'antigène, soit indispensable à l'induction d'une immunité protectrice. Une publication récente a d'ailleurs montré que l'injection intra-musculaire de plasmides exprimant uniquement la GP ou la NP protège contre une infection létale chez le cobaye [26]. La protection est liée à une forte réponse humorale dirigée contre la GP ou la NP, mais dépend également de l'activation de lymphocytes T cytotoxiques. Cette approche prometteuse confirme que l'induction d'une réponse immune à composante humorale et cellulaire est indispensable au contrôle de l'infection.

De nombreux essais de sérothérapie par transfert passif d'anticorps spécifiques ont été réalisés aussi bien chez l'animal que l'Homme. Les résultats préliminaires obtenus chez l'Homme sont difficilement interprétables à ce jour [27], mais les études réalisées chez le babouin et le cobaye indiquent que pour être efficace, cette thérapie doit être initiée très peu de temps après l'infection, c'est à dire avant l'apparition de la virémie [28]. Par ailleurs, des résultats récents révèlent que l'injection d'IFN α n'a pas d'incidence sur la mortalité malgré ses propriétés anti-virales [29]. Enfin, une équipe a montré qu'un inhibiteur de la S-Adenosylhomocystéine hydrolase (3-deazaadénosine carbocyclique) inhibe *in vitro* la réplication virale et protège les souris BALB/c lors d'une infection létale [30].

Bien que les avancées obtenues ces dernières années dans la compréhension de la physiopathogénèse et des mécanismes conduisant au contrôle de l'infection par le virus Ebola soient très encourageantes, la récente réémergence du virus Ebola en Afrique Centrale, mais également la présence d'autres virus comme Marburg (qui est réapparu en RDC il y a quelques mois), Lassa ou Rift Valley dans d'autres régions d'Afrique font des fièvres hémorragiques virales un grave problème de santé publique auquel il est urgent d'apporter une réponse thérapeutique ou prophylactique.



Références

1. Sanchez A, Yang ZY, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* 1998 ; 72 : 6442-7.
2. Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, Auperin DD. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* 1993 ; 29 : 215-40.
3. Khan AS, Tshioko FK, Heymann DL, *et al.* The reemergence of Ebola Hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl. I) : S76-86.
4. Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, *et al.* Ebola Hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl 1) : 65-75.
5. Bwaka MA, Bonnet M-J, Calain P, *et al.* Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S1-7.
6. Zaki SR, Shieh W-J, Greer PW, *et al.* A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl. I) : S36-48.
7. Fisher-Hoch SP, Platt GS, Neild GH, *et al.* Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J Inf Dis* 1985 ; 152 : 887-94.
8. Schnittler HJ, Feldmann H. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Cur Top Microbiol Immunol* 1999 ; 235 : 175-204.

9. Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot M-C, *et al.* Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nature Med* 1999 ; 5 : 423-6.
10. Villinger F, Rollin PE, Brar SS, *et al.* 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. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl 1) : S188-91.
11. Baskerville A, Fisher-Hoch SP, Neild GH, Dowsett AB. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J Pathol* 1985 ; 147 : 199-202.
12. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, *et al.* Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S203-17.
13. Ryabchikova EI, Kolesnikova LV, Luchko SV. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S199-202.
14. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, *et al.* Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S164-9.
15. Yang Z-Y, Delgado R, Xu L, *et al.* Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 1998 ; 279 : 1034-7.
16. Volchkov VE, Blinov VM, Netesov SV. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS* 1992 ; 305 : 181-4.
17. West E, Schnittler HJ, Sprenger H, Klenk HD, Feldmann H. Filoviral replication in human macrophages. In *15th annual meeting of the american society for virology* 1996 ; W14-3 : 107.
18. Feldmann H, Bugany H, Mahner F, Klenk HD, Drenckhahn D, Schnittler HJ. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* 1996 ; 70 : 2208-14.
19. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, *et al.* Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S177-87.
20. Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, *et al.* Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S170-6.
21. Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, *et al.* Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S28-35.
22. Bancroft GJ, Sheehan KC, Schreiber RD, Unanue ER. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent mechanism of macrophage activation in SCID mice. *J Immunol* 1989 ; 143 : 127-30.
23. Nokta M, Matzke D, Jennings M, Schlick E, Nadler PI, Pollard R. In vivo administration of tumor necrosis factor-alpha is associated with antiviral activity in human peripheral mononuclear cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991 ; 197 : 144-9.
24. Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Experimental filovirus infections. *Cur Top Microbiol Immunol* 1999 ; 235 : 117-43.

25. Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C, Huggins J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Inf Dis* 1998 ; 178 : 651-61.
26. Xu L, Sanchez A, Yang Z-Y, *et al.* Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med* 1998 ; 4 : 37-42.
27. Mupapa K, Massamba M, Kibadi K, *et al.* Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusion from convalescent patients. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S18-24.
28. Kudoyarova-Zubavichene NM, Sergeev NN, Chepurnov AA, Netesov SV. Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infection. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S218-23.
29. Jahrling PB, Geisbert TW, Geisbert JB, *et al.* Evaluation of immune globulin and recombinant interferon- α 2b for treatment of experimental Ebola virus infection. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S224-34.
30. Huggins J, Zhang Z-X, Bray M. Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-Adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J Inf Dis* 1999 ; 179(Suppl I) : S240-7.

Sylvain Baize*, étudiant en doctorat, Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769, Franceville, Gabon

Eric M. Leroy*, étudiant en doctorat, Docteur Vétérinaire, CIRMF

M-C Georges-Courbot, Docteur en médecine, chef de laboratoire, Institut Pasteur, 75724 Paris

Monique Capron, Professeur d'immunologie à l'université de Lille II, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille

Joseph Lansoud-Soukate, directeur de recherches, CIRMF

Alain J. Georges, Docteur en médecine, biologiste des Hôpitaux, Hôpital Desgenettes, 69998 Lyon

* Ces auteurs ont contribué pour une part égale à ce travail

Figure 1.

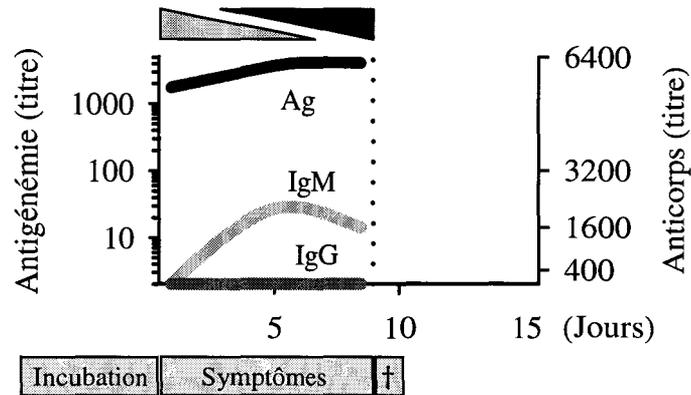


Figure 1. *Antigénémie et réponse immune lors de l'infection fatale.* L'antigénémie (Ag) et les réponses IgM et IgG spécifiques sont représentées en fonction du nombre de jours après l'apparition des symptômes. La présence de lymphocytes cytotoxiques activés dans la circulation est figurée par le triangle gris au dessus du graphique et l'apoptose intravasculaire par le triangle noir. La ligne pointillée indique le moment du décès.

Figure 2.

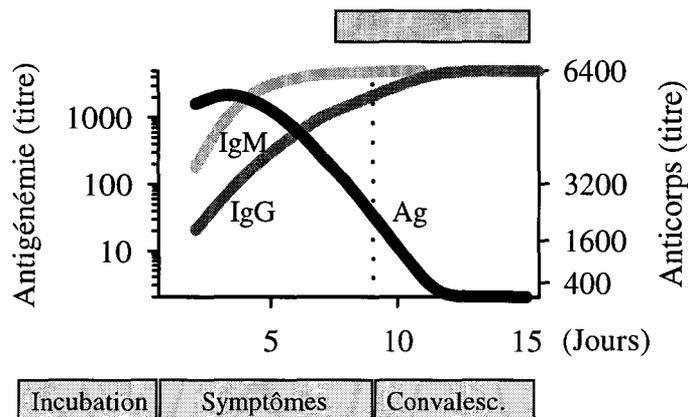


Figure 2. *Antigénémie et réponse immune chez les survivants.* L'antigénémie (Ag) et les réponses IgM et IgG spécifiques sont représentées en fonction du nombre de jours après l'apparition des symptômes et pendant la proche convalescence (à droite de la ligne pointillée). Le rectangle gris représente la période pendant laquelle des lymphocytes T cytotoxiques activés sont détectés dans la circulation.

Abbreviated title: **apoptosis in fatal Ebola virus infection**

**Apoptosis in fatal Ebola infection.
Does the virus toll the bell for immune system ?**

S. Baize, E. M. Leroy, E. Mavoungou & S. P. Fisher-Hoch

Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769, Franceville, Gabon (S. Baize, E. M. Leroy, E. Mavoungou); Fondation Marcel Mérieux, 17 rue Bourgelat, 69002 Lyon, France (S. P. Fisher-Hoch)

S. Baize & E. M. Leroy contributed equally to this work

Correspondance to: S. Baize, CIRMF, BP 769, Franceville, Gabon. Tel: (241) 67 70 92; Fax: (241) 67 79 30; email: sbaize@cirmf.sci.ga

In fatal Ebola virus hemorrhagic fever massive intravascular apoptosis develops rapidly following infection and progressing relentlessly until death. While data suggest that T lymphocytes are mainly deleted by apoptosis in PBMC of human fatal cases, experimental Ebola infection in animal models have shown some evidence of destruction of lymphocytes in spleen and lymph nodes probably involving both T and B cells. Nevertheless, we are able to conclude from the accumulated evidence that early interactions between Ebola virus and the immune system, probably via macrophages, main targets for viral replication, lead to massive destruction of immune cells in fatal cases.

Keywords: Ebola virus; apoptosis; cytotoxic T cells; macrophages; cytokines

Two large outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever occurred in Gabon in 1996, during which 70% of patients died about one week after the appearance of acute disease ¹. One of the most striking features observed in fatalities was the massive intravascular apoptosis that developed at least 5 days before death ². Cell-death was evidenced by increasing plasma levels of 41/7 nuclear matrix protein (41/7 NMP) (figure 1A), a nuclear protein cleaved and solubilized during apoptosis ³, and by dramatic DNA fragmentation in leukocytes (figure 1B). Activation of cytotoxic cells was suggested in the first days of the symptomatic phase by increasing plasma levels of gamma-interferon (IFN γ) and strong expression of IFN γ , Fas, Fas ligand (FasL), and perforin messenger RNA (mRNA) in PBMC. The days before death were characterized by the disappearance of mRNA for these proteins as well as Bcl-2, CD3, CD8, and T cell receptor- (TCR)-V β mRNA in PBMC ². These data strongly suggest that T cells were massively deleted, but apoptosis of monocytes/macrophages and endothelial cells, main targets of Ebola virus, may account for some of the cell-death. That apoptosis is probably not restricted to peripheral blood lymphocytes in fatalities is supported by histological observations made from patient specimens taken during the 1976 Sudan outbreak showing marked lymphocyte depletion and destruction in spleen of fatalities ⁴.

In the same manner, marked lymphopenia and extensive lymphoid depletion and necrosis in spleen and lymph nodes has also been detected in guinea pigs, rhesus monkeys, and baboons few days following experimental Ebola virus-infection ⁵⁻⁸. The observations in humans make it like that apoptosis is similarly involved in experimental Ebola infections. Indeed, the depletion of B-lymphocytes observed in animal models could represent an attractive explanation for the defective humoral responses observed in fatalities ². Interestingly, no evidence of Ebola virus replication has been found in lymphocytes *in vivo* ⁸ or *in vitro* ⁹, and apoptosis was never detected in survivors despite of elevated viral antigen ². Together, these data show that cell-death is not directly linked to viral replication, that is, the result of lytic virus replication. However, we can not exclude that apoptosis may be related to different amounts of secreted viral products such as secreted glycoprotein (sGP), circulating in plasma of Ebola-infected patients ¹⁰ (a protein which been reported to bind neutrophils

via CD16b and to inhibit their activation¹¹), or soluble GP₁ (sGP₁), which is the cleaved extracellular portions of transmembrane GP_{1,2}^{10,12}.

In fatalities, excessive activation of T cells (as indicated by the strong release of IFN γ) at high levels of viral antigen may lead to downregulation of Bcl-2 and TCR followed by apoptosis¹³⁻¹⁶, possibly mediated through FasL, Perforin, TNF α , or IFN γ ^{14,15,17-19}. Indeed, increasing plasma levels of soluble Fas (sFas) and sFasL are observed in fatalities correlating with increased levels of 41/7 NMP². Although sFasL is known to be poorly active and even inhibit Fas-mediated apoptosis²⁰, the strong activation of the Fas/FasL system in Ebola patients suggests that this pathway may be involved in cell-death in this instance. Apoptosis of lymphocytes may also result from interactions with altered antigen presenting cells. Monocytes/macrophages are primary target of Ebola virus and are critical in the viral dissemination. Furthermore, damage to lymphoid organs seen in animals apparently coincides with viral replication in resident macrophages^{5,7,8}. The extensive infection of macrophages in the lymphoid microenvironment could induce non-specific activation of lymphocytes and apoptosis by the expression and/or release of molecules such as FasL or TNF α in fatal Ebola infection²¹, as has been reported in other viral infections²²⁻²⁴. This hypothesis is consistent with the finding that *in vitro* filovirus infection of macrophages leads to activation and release of several mediators such as TNF α , and culminates in cell lysis^{25,26}.

In sharp contrast with survivors who developed prompt and efficient responses without alteration of immune cells², early interactions between Ebola virus and the immune system in fatalities lead to defective immunity and massive apoptosis of lymphocytes and probably macrophages. This extensive destruction of immune cells not only favors viral replication, but also may be also harmful to the host, through inappropriate, excessive or uncontrolled release or expression of molecules such as IFN γ , FasL, and TNF α , or through release of oxygen radicals. The potent molecules may then induce critical terminal pathophysiological events such as endothelium permeabilization, coagulation failure, and liver disorders^{25,26}.

Experimental Ebola infection of primates and *in vitro* Ebola virus infection of human PBMC will be useful tools to better identify and characterize the dying cells among subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, and NK cells. Similarly such studies may also allow us to better understand the mechanisms and mediators leading to apoptosis, and thus the part that these immune alterations play in the pathophysiology of fatal Ebola hemorrhagic fever.

References.

1. Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, *et al.* Ebola Hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. *J Inf Dis* 1999; **179**(Suppl 1): 65-75.

2. Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot M-C, *et al.* Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nature Med* 1999; **5**: 423-426.
3. Miller T, Beausang LA, Meneghini M, Lidgard G. Death-induced changes to the nuclear matrix: The use of anti-nuclear matrix antibodies to study agents of apoptosis. *BioTechniques* 1993; **15**: 1042-1047.
4. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a world health organization study team. *Bull WHO* 1978; **56**: 247-270.
5. Baskerville A, Fisher-Hoch SP, Neild GH, Dowsett AB. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J Pathol* 1985; **147**: 199-209.
6. Fisher-Hoch SP, Platt GS, Neild GH, *et al.* Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J Inf Dis* 1985; **152**: 887-894.
7. Ryabchikova EI, Kolesnikova LV, Luchko SV. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J Inf Dis* 1999; **179(Suppl I)**: S199-202
8. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, *et al.* Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J Inf Dis* 1999; **179(Suppl I)**: S203-217.
9. Wool-Lewis RJ, Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* 1998; **72**: 3155-3160.
10. Sanchez A, Yang Z-Y, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* 1998; **72**: 6442-6447.
11. Yang Z-Y, Delgado R, Xu L, *et al.* Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 1998; **279**: 1034-1037.
12. Volchkov VE, Volchkova VA, Slenczka W, Klenk H-D, Feldmann H. Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virol* 1998; **245**: 110-119.
13. Boudet F, Lecoœur H, Gougeon M-L. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection. *J Immunol* 1996; **156**: 2282-2293.
14. Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA, Berzofsky JA. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in Bcl-2 levels and allows tumor necrosis factor α receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; **188**: 1391-1399.
15. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, *et al.* Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class-I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998; **187**: 1383-1393.
16. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993; **362**: 758-761.
17. Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; **373**: 438-441.
18. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995; **377**: 348-351.

19. Liu Y, Janeway CA. Interferon γ plays a critical role in induced cell death of effector cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J Exp Med* 1990; **172**: 1735-1739.
20. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997; **186**: 2045-2050.
21. Villinger F, Rollin PE, Brar SS, *et al.* 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. *J Inf Dis* 1999; **179(Suppl 1)**: S188-191.
22. Yoshida H, Sumichika H, Hamano S, *et al.* Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J Virol* 1995; **69**: 4769-4775
23. Gummuluru S, Novembre FJ, Lewis M, Gelbard HA, Dewhurst S. Apoptosis correlates with immune activation in intestinal lymphoid tissue from macaques acutely infected by a highly enteropathic simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virol* 1996; **225**: 21-32
24. Summerfield A, Knötig SM, McCullough KC. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J Virol* 1998; **72**: 1853-1861
25. Feldmann H, Bugany H, Mahner F, Klenk HD, Drenckhahn D, Schnittler HJ. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* 1996; **70**: 2208-2214
26. Schnittler HJ, Feldmann H. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. In: Klenk HD, ed. *Marburg and Ebola viruses*. Berlin: Springer-Verlag 1999: 175-204.

Figure 1

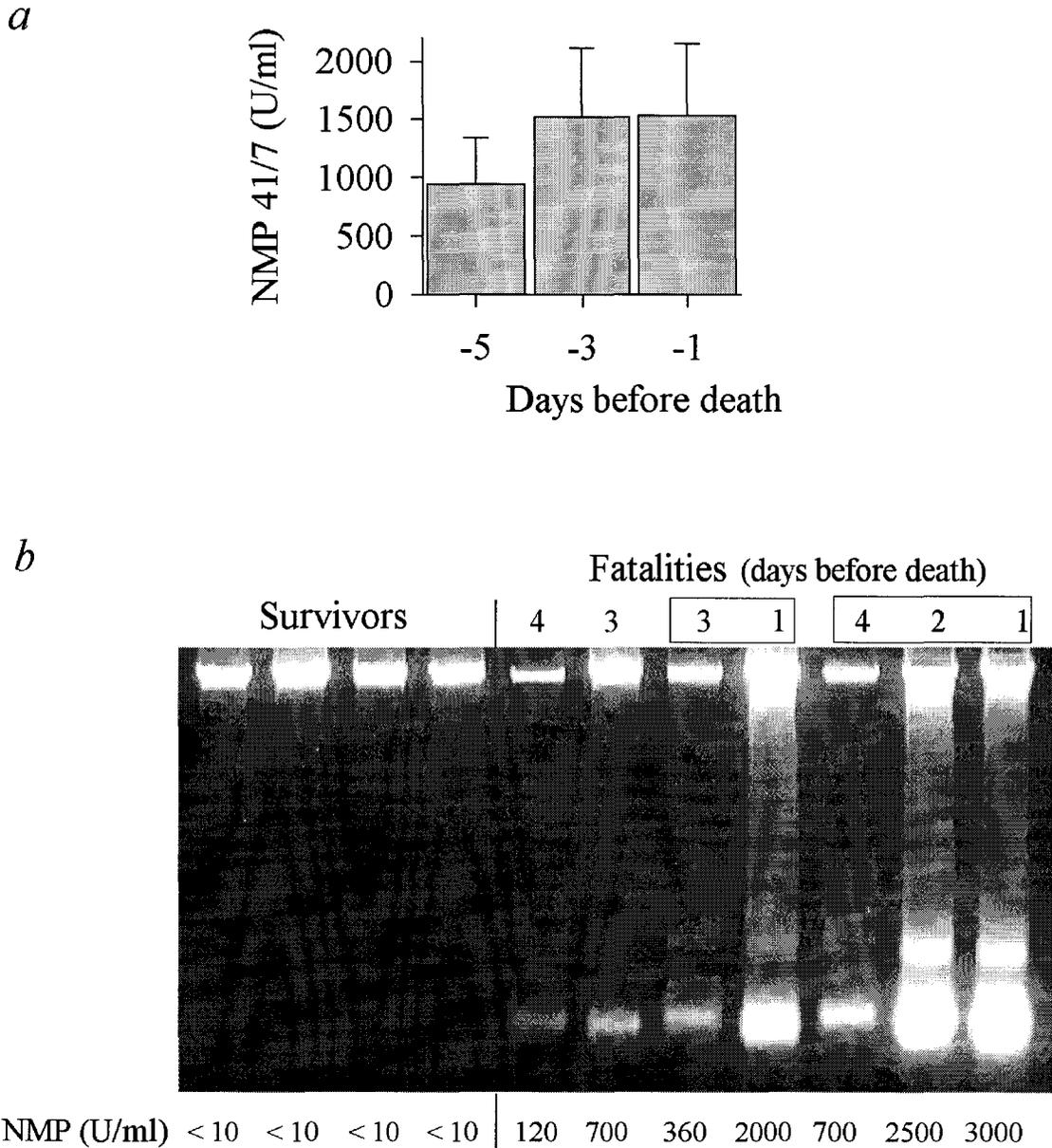


Figure 1. Detection of apoptosis in fatally infected patients. **A**, Detection of 41/7 NMP in plasma by ELISA. Results are expressed as the mean \pm s.d. of individual values at different times before death (5 ± 1 days, $n=5$; 3 ± 1 d, $n=6$; 1 ± 0.5 d, $n=6$). 41/7 NMP was below the detectable limit in Ebola-infected survivors (during the symptomatic phase and early convalescence) and endemic controls ($n=10$) (data not shown). **B**, Detection of DNA fragmentation in leukocytes of Ebola virus infected patients. DNA was extracted from blood obtained from four survivors and four fatalities during the symptomatic phase. Above blot, time to death (in days); below blot, concentrations of 41/7 NMP. Kinetics from 2 patients are shown (last five lanes).

Surviving Ebola virus infection

The immune response to Ebola virus infection in victims and survivors of two Gabon outbreaks provides insight into immunologic determinants of resistance (pages 423–426)

IN THE BEST of circumstances, clinical investigation is difficult. To draw definitive conclusions, well-controlled studies must be done in defined populations, but this is secondary to the obligation to provide care that benefits individual patients. In addition to these limitations, access to patients and the collection of specimens during the relevant time in a disease is often problematic. Such has been the case with studies of Ebola virus infection, which have proven particularly difficult because outbreaks occur in remote locations and because this highly infectious, lethal virus poses substantial risks to medical personnel and scientific investigators. Ebola virus infection causes hemorrhagic fever, a syndrome that begins with flu-like symptoms and progresses rapidly to fever, diffuse bleeding, shock and death^{1–3}. Rigorous study of this disease in humans has been nearly impossible, and its immunopathogenesis is poorly understood. For example, determinants of host resistance, mechanisms of viral clearance and prognostic indicators of survival have not been defined. Such information could provide important insights into the natural course of this disease in humans that would facilitate the development of vaccines and antiviral therapies. In this issue of *Nature Medicine*, Baize, Leroy and colleagues have analyzed immune responses in cohorts of patients from two outbreaks in northern Gabon in 1996 (ref. 4). The mortality rates of the epidemics were similar (66% and 75%), and the investigators collected serum and blood samples during these outbreaks from both survivors and non-survivors. Their analyses of immune response and serum biochemical parameters suggest possible mechanisms of protection against this highly pathogenic virus.

Patients who survived showed several features that distinguished them from non-survivors. No difference in the viral antigen load, measured in the serum, was detected in survivors and non-survivors, indicating that host defense rather than inoculum size determines survival. Although non-survivors generated a higher level of gamma interferon (IFN- γ) in the serum early in infection, T-cell cytokine responses, measured by T-cell cy-

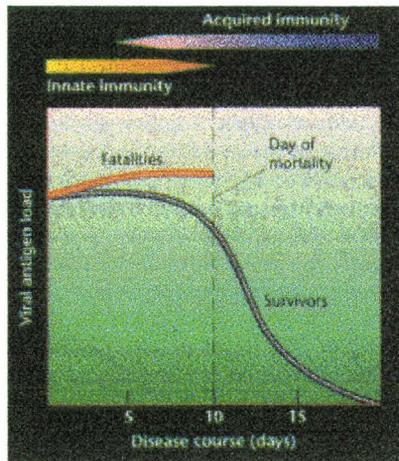
GARY J. NABEL

tokine RNA levels, were not maintained. In contrast, surviving patients developed more effective antibody responses to the viral nucleoprotein and also generated more sustained T-cell immune responses that persisted into the convalescent phase. Lethal infection was also accompanied by a considerable increase in apoptosis in peripheral blood cells, and cell death increased as disease progressed in fatal cases. This increase in cell death markers correlated with mortality.

These observations are among the most comprehensive analyses of the immune response to Ebola virus infection in humans, and they provide several clues about its pathogenesis. Several similarities between human disease and rele-

vant animal models were found. For example, in guinea pigs immunized with the Ebola virus gene products, successful protection against lethal challenge involves T cell-dependent immune responses⁵. As with immunization in the guinea pig, the nucleoprotein response in humans is mainly humoral, and immunoglobulin production to the viral proteins GP and soluble GP is minimal, although T-cell immunity to these antigens is generated. The findings by Baize *et al.* in infected humans⁴ are thus consistent with those in the vaccine model in rodents⁵. The generation of antibody responses correlated with survival in the guinea pig and probably reflected successful T-cell responses that stimulate production of antibody⁵, as is suggested now for humans⁴. It is not certain whether the ability to counteract early infection is due to this T-cell immune response in natural infection, and it is possible that an inflammatory response or innate immunity is involved. In addition to these immune parameters, the authors also analyzed levels of apoptosis in peripheral blood cells. These markers reflect the death of immune and non-immune cells. Although the death of immune cells probably contributes to the demise of patients, the significance of this finding is not entirely evident. Apoptosis often accompanies antigen stimulation, particularly when proliferating lymphocytes are deprived of growth factors. As noted by the investigators, these markers of apoptosis could be derived from inflammatory cells, such as monocytes, or endothelial cells. Both cell types are productively infected in primate models of this disease^{6–8}. Despite these valuable observations regarding the immune response and its relationship to the progression of the disease, many questions remain. Enhanced apoptosis of lymphocytes has not been demonstrated directly. If this occurs, it will be important to define which subsets are affected and by what mechanism, as the virus does not efficiently infect lymphoid cells^{9,10}. The mechanism by which innate immune or inflammatory responses control viral replication in early stages of this disease requires further definition, and the point at which acquired immunity becomes effective has not yet been determined.

The remarkable inverse correlation between the serum IFN- γ levels and mortality indicates that this marker may be useful in predicting the outcome of infection. Semi-quantitative PCR analysis may also be helpful. In the absence of effective therapy, the utility of this information is limited; however, antiviral compounds are being investigated¹¹ and may prove useful in the future. In the interim, Baize, Leroy *et al.* have provided insight into the



Viral load and immune responses during acute Ebola virus infection.

NEWS & VIEWS

natural history of the immune response to infection by this highly pathogenic virus. Successful immune protection and vaccination against viral infections other than Ebola have been demonstrated in humans. Despite these successes, the specific contribution of innate and acquired immune responses to viral infections in general remain poorly understood^{12,13}. Ebola virus infection can be regarded as a paradigm for other viruses and for other infectious causes of hemorrhagic fever. Such information will help to unravel the pathophysiology of this aggressive infection and will contribute to strategies for vaccine development and treatment.

1. Bowen, E.T.W. *et al.* Viral haemorrhagic fever in

southern Sudan and northern Zaire. *Lancet* **1**, 571–573 (1977).

2. Centers for Disease Control. Outbreak of Ebola viral hemorrhagic fever–Zaire. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **44**, 381–382 (1995).

3. Peters, C.J. *et al.* in *Fields Virology* Vol. 3 (eds Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P.M.) 1161–1176 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996).

4. Baize, S. *et al.* Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nature Med.* **5**, 423–426 (1999).

5. Xu, L. *et al.* Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med.* **4**, 37–42 (1998).

6. Feldmann, H. *et al.* Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* **70**, 2208–2214 (1996).

7. Baskerville, A. *et al.* The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.* **125**, 131–138 (1978).

8. Baskerville, A., Fisher-Hoch, S.P., Neild, G.H. & Dowsett, A.B. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J. Pathol.* **147**, 199–209 (1985).

9. Yang, Z. *et al.* Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* **279**, 1034–1037 (1998).

10. Wool-Lewis, R.J. & Bates, P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* **72**, 155–160 (1998).

11. Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A. & Klenk, H.-D. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5762–5767 (1998).

12. Doherty, P.C. Cell-mediated immunity in virus infections. *Biosci. Rep.* **17**, 378–387 (1997).

13. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54–60 (1996).

HHMI, University of Michigan Medical Center
Depts of Internal Medicine and Biol. Chemistry
1150 W. Medical Center Drive, 4520 MSRB 1
Ann Arbor, Michigan 48109-0650, USA
email: glabel@umich.edu

 AMERICAN HEALTH CONSULTANTS[®] A Medical Economics Company

INFECTIOUS DISEASE ALERT[®]

A twice-monthly update of developments in infectious disease, hospital epidemiology, microbiology, infection control, empiriatrics, and HIV treatment

American Health Consultants Home Page—<http://www.ahcpub.com>

CME for Physicians—<http://www.cmeweb.com>

Surviving Ebola Virus

ABSTRACT & COMMENTARY

Synopsis: *New concepts about immunologic responses in humans that determine survival or death from Ebola virus are presented. Recovery from Ebola is related to a progressive set of humoral and cellular responses.*

Source: Baize S, et al. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* 1999;5: 423-426.

EBOLA IS A WORD THAT HAS COME TO SIGNIFY ONE OF the most feared of infectious diseases: contagious, horrifying in its manifestations, and rapidly fatal for its victims. Work to delineate the pathogenesis of Ebola is worthy in its own right in confronting this emerging infectious disease, but investigative work also offers the prospect of a model for investigating novel pathogens.

Research has progressed on both fronts regarding Ebola over the past decade. The current contribution by Baize and Leroy (equal contributors) and associates advances new concepts about immunologic responses in

humans that determine survival or death.

Specimens for the study were collected during two Ebola outbreaks, the first occurring in February 1996 in Mayibout, an isolated tropical village in northeast Gabon, the second six months later in Booué, about 500 miles from Mayibout. Mortality was 66% in Mayibout and 75% in Booué. Collection of samples from the epidemics was accomplished in heroic fashion, although samples from the Mayibout group of patients was unfortunately incomplete.

The central question of the study was: what factors related to survival in Ebola infection? It turns out that recovery is related to a progressive set of humoral as well as cellular responses. Regarding humoral response, IgM and IgG responses were brisk in certain individuals but, for survival, needed to be followed by activation of cytotoxic cells as antigen was being cleared from the blood. Death, conversely, was associated with poor IgG response and inadequate activation of T cells that underwent premature intravascular apoptosis.

All survivors made markedly more IgG and IgM antibody response to nucleoprotein than nonsurvivors and many survivors continued to make an IgG response to viral protein (VP) 40 and VP35 in the recovery period as measured by Western Blot determination. The discrepancies in IgG and IgM responses between groups were seen as early as 2-3 days and were markedly discrepant at the time of death (survivors vs nonsurvivors).

A large number of cytokine and lymphocyte responses were measured (in 4 survivors and 4 nonsurvivors, respectively), all assayed by RT-PCR of mRNA: IL-2, IL-4, IFN gamma, CD3, CD8, CD28, Fas, FasL, perforin, and Bcl-2. In the nonsurvivors, none made any mRNA indicative of cellular activation whereas in the survivors FasL, perforin, CD28, and IFN-gamma all were measurable. Additionally, T-cell receptor VB repertoire changes were absent in the last days of fatal infection.

Baize et al also cleverly discovered that intravascular apoptosis of lymphocytes was characteristic in fatal cases. In fact, as measured by DNA fragmentation and release of specific nuclear matrix proteins, apoptosis was "massive" and progressed relentlessly during the last five days of life.

The early immunologic response in Ebola virus infection, thus, determines clinical outcome. When defective, lack of crucial humoral and cellular responses allows progression of programmed cell death that produces a fatal syndrome now familiar to clinicians and also mimicked (destruction of lymphocytes in lymph node, spleen, and bone marrow) in monkeys infected with Ebola virus. Recovery, on the other hand, is associated with a well-orchestrated sequence of humoral responses followed by activated cytotoxic T-cells.

■ COMMENT BY JOSEPH F. JOHN, MD

Short articles in *Nature Medicine*, a new journal now in only its fifth year of publication, are unusual because the background, results, and discussion sections flow in one central leading section. A methods section follows at the end. Yet, as in this article, there is a wealth of information packed into these short articles.

In this offering from research groups in Paris and Lyon, we glean an extensive amount of insight into one of the most feared emerging infections. The outbreaks studied in this report date back several years when Ebola was most prominent in the news. Although the media coverage has abated, new alerts suggest a new outbreak, again in the country formerly known as Zaire, now called the Democratic Republic of Congo. Forty-six people have died since January 1999 in response to what was first thought to be Ebola, but now appears to be marburg virus infection. The illness was first seen in gold miners but is now spreading to the community.¹

What are the major findings of this study? Well, the title says it all. We learn that survival from Ebola virus is associated with rapid destruction of lymphocytes intravascularly by programmed cell death. The normal response is blunting of apoptosis—the programmed cell death—that occurs with efficient humoral response to specific viral proteins, followed by a cytotoxic T-cell response that probably clears residual viral antigen, thus blocking apoptosis. The ending of early IgG and IgM responses in survivors suggest that an amnestic response is occurring, possibly associated with earlier exposure to cross-reacting viruses, perhaps like the gold miner outbreak described above.

What we do not learn from this article is why lymphocytic apoptosis brings with it the hemorrhagic demise of Ebola's victims. Perhaps with deranged cytokine responses as infection progresses, intravascular coagulation occurs in response to lymphocytic dysregulation, although this is my speculation.

This work from France holds promise since it uncovers the need for an early, effective humoral response. Now that we know those proteins to which an IgG and IgM response is needed, vaccine development can progress. A section of *Nature Medicine* called "NEWS & VIEWS" features a perspective on Ebola and this paper by Gary Nabel, MD, a noted investigator from the University of Michigan. Nabel has most recently been appointed to the crucial post of Head, AIDS Vaccine Center. So we will likely see the fruits of his leadership in his new position against another pathogen originating in central Africa, human immunodeficiency virus (HIV). ♦

Reference

1. ProMED Digest 1999;99:101.

Bibliographie



1. Buckley SM & Casals J. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 680-91 (1970).
2. McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM & Smith ES. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Inf. Dis.* 155, 437-44 (1987).
3. Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, Shepherd SP, McGillivray GM, Erasmus MJ, Searle LA & Gill DE. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southern Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 120-32 (1987).
4. Hoogstral H. The epidemiology of tickborne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J. Med. Entomol.* 15, 307-17 (1979).
5. Rift Valley fever-East Africa, 1997-1998. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 47, 261-4 (1998).
6. Martini GA & Siebert R. *Marburg virus disease*, (Springer-Verlag, Berlin, 1971).
7. Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L *et al.* Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br. Med. J.* 4, 489-93 (1975).
8. Smith DH, Isaacson M, Johnson KM, Bagshawe A, Johnson VK *et al.* Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet* 1, 816-20 (1982).
9. WHO. Ebola haemorrhagic fever in Zaïre, 1976. Report of an international commission. *Bull. WHO* 56, 271-93 (1978).
10. Johnson KM, Lang JV, Webb PA & Murphy FA. Isolation and partial characterization of a new virus (Ebola virus) causing acute hemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* i, 569-71 (1977).
11. WHO. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a world health organization study team. *Bull. WHO* 56, 247-70 (1978).
12. Baron RC, McCormick JB & Zubeir OA. Ebola hemorrhagic fever in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull. WHO* 6, 997-1003 (1983).
13. Jahrling P, Geisbert TW, Dalgard DW, Johnson ED, Ksiazek TG, Hall WC & Peters CJ. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 335, 502-5 (1990).
14. CDC. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 49, 314-6 (1996).
15. Le Guenno B, Formenty P & Boesch C. Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. in *Marburg and Ebola viruses*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 77-84 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
16. Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, Tevi Benissan C, Nabias RJ *et al.* Ebola Hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl 1), 65-75 (1999).
17. Georges-Courbot MC, Sanchez A, Lu CY, Baize S, Leroy E *et al.* Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 59-62 (1997).

18. Khan AS, Tshioko FK, Heymann DL, LeGuenno B, Nabeth P *et al.* The reemergence of Ebola Hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl. I), S76-86 (1999).
19. CDC. Update: filovirus infection among persons with occupational exposure to non-human primates. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 39, 266-73 (1990).
20. Fisher-Hoch SP, Brammer L, Trappier SG, Hutwagner LC, Farrar BB *et al.* Pathogenic potential of filoviruses: role of geographic origin of primate host and virus strain. *J. Inf. Dis.* 166, 753-63 (1992).
21. Wyers M, Formenty P, Cherel Y, Guigand L, Fernandez B, Boesch C & Le Guenno B. Histopathological and immunohistochemical studies of lesions associated with Ebola virus in a naturally infected chimpanzee. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S54-9 (1999).
22. Heymann DL, Weisfeld JS, Webb PA, Johnson KM, Cairns T & Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire 1977-1978. *J. Inf. Dis.* 142, 372-6 (1980).
23. Conrad JL, Isaacson M, Burnett-Smith E *et al.* Epidemiologic investigation of Marburg virus disease, Southern Africa, 1975. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 1210-5 (1978).
24. Monath TP. Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S127-38 (1999).
25. Swanepoel R, Struthers JK, Shepherd AJ, McGillivray GM, Nel MJ & Jupp PG. Crimean-Congo hemorrhagic fever in South Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1407-15 (1983).
26. Germain M. Collections of mammals and arthropods during the epidemic of haemorrhagic fever in Zaire. in *Ebola virus haemorrhagic fever* (ed. Pattyn, S.R.) 185-9 (Elsevier-Netherland Biomedical, Amsterdam, 1978).
27. Reiter P, Turell M, Coleman R, Miller B, Maupin G *et al.* Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: arthropod studies. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S148-54 (1999).
28. Turell MJ, Bressler DS & Rossi CA. Short report: lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 89-90 (1996).
29. Arata AA & Johnson B. Approaches towards studies on potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in Southern Sudan. in *Ebola virus haemorrhagic fever* (ed. Pattyn, S.R.) 191-202 (Elsevier-Netherland Biomedical, Amsterdam, 1978).
30. Breman JG, Johnson KM, Van der Groen G, Robbins CB, Szczeniowski MV *et al.* A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979-1980. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S139-47 (1999).
31. Leirs H, Mills JN, Krebs JW, Childs J, Akaibe D *et al.* Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S155-63 (1999).
32. Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Zachariades NA, Braackle S *et al.* Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg. Inf. Dis.* 2, 321-5 (1996).
33. Formenty P, Boesch C, Wyers M, Steiner C, Donati F, Dind F, Walker F & Le Guenno B. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S120-6 (1999).

34. Miranda ME, Ksiazek TG, Retuya TJ, Khan AS, Sanchez A *et al.* Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J. Inf. Dis.* 179 (Suppl I), S115-9 (1999).
35. Belanov EF, Muntianov VP, Kriuk VD, Sokolov AV, Bormotov NI, P'iankov OV & Sergeev AN. Survival of Marburg virus infectivity on contaminated surfaces and in aerosols. *Vopr. Virusol.* 41, 32-4 (1996).
36. Jaax NK, Davis KJ, Geisbert TJ, Vogel P, Jaax GP, Topper M & Jahrling PB. Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 120, 140-55 (1996).
37. Johnson E, Jaax N, White J & Jahrling P. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int. J. Exp. Pathol.* 76, 227-36 (1995).
38. Jaax N, Jahrling P, Geisbert T, Geisbert J, Steele K *et al.* Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory. *Lancet* 346, 1669-71 (1995).
39. Dowell SF, Mukunu E, Ksiazek TG, Khan AS, Rollin PE & Peters CJ. Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S87-91 (1999).
40. Ndambi R, Akamituna P, Bonnet M-J, Mazaya Tukadila A, Muyembe-Tamfum J-J & Colebunders R. Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S8-10 (1999).
41. Elliott LH, McCormick JB & Johnson KM. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *J. Clin. Microbiol.* 16, 704-8 (1982).
42. Mitchell SW & McCormick JB. Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses. *J. Clin. Microbiol.* 20, 486-9 (1984).
43. Georges AJ, Baize S, Leroy EM & Georges-Courbot M-C. Virus Ebola: l'essentiel pour le praticien. *Méd. Trop.* 58, 177-86 (1998).
44. Muyembe-Tamfum JJ, Kipasa M, Kiyungu C & Colebunders R. Ebola outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: discovery and control measures. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S259-62 (1999).
45. McCormick JB, Bauer SP, Elliott LH, Webb PA & Johnson KM. Biologic differences between strains of Ebola virus from Zaire and Sudan. *J. Inf. Dis.* 147, 264-7 (1983).
46. Wulff H & Lange JV. Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. *Bull. WHO* 52, 429-36 (1975).
47. Ksiazek TG, Rollin PE, Jahrling PB, Johnson E, Dalgard DW & Peters CJ. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* 30, 947-50 (1992).
48. Zaki SR, Shieh W-J, Greer PW, Goldsmith CS, Ferebee T *et al.* A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl. I), S36-47 (1999).
49. Ksiazek TG, Rollin PE, Williams AJ, Bressler DS, Martin ML *et al.* Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S177-87 (1999).

50. Trappier SG, Conaty AL, Farrar BB, Auperin DD, McCormick JB & Fisher-Hoch SP. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of Lassa virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 214-21 (1993).
51. Demby AH, Chamberlain J, Brown DWG & Clegg CS. Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcriptase-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2898-903 (1994).
52. Porter KR, Summers PL, Dubois D, Puri B, Nelson W, Henchal E, Oprandy JJ & Hayes CG. Detection of West Nile virus by the polymerase chain reaction and analysis of nucleotide sequence variation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 440-6 (1993).
53. Volchkov V, Volchkova V, Eckel C, Klenk H-D, Bouloy M, LeGuenno B & Feldmann H. Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. *Virology* 232, 139-44 (1997).
54. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda MEG, Trappier SG, Khan AS, Peters CJ & Nichol ST. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S164-9 (1999).
55. Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Mukunu R, Muyembe-Tamfum JJ *et al.* Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S28-35 (1999).
56. Fisher-Hoch SP, Perez-Oronoz GI, Jackson EL, Hermann LM & Brown BG. Filovirus clearance in non-human primates. *Lancet* 340, 451-3 (1992).
57. Johnson KM, Elliott LH & Heymann DL. Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurveys. *J. Clin. Microbiol.* 14, 527-9 (1981).
58. Van der Groen G, Kurata T & Mets C. Modifications to indirect immunofluorescence tests on Lassa, Marburg, and Ebola material. *Lancet* 1, 654-5 (1983).
59. Johnson ED, Gonzalez JP & Georges A. Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 536-8 (1993).
60. Ivanoff B, Duquesnoy P, Languillat G, Saluzzo J-F, Georges AJ & Gonzalez J-P. Haemorrhagic fever in Gabon. I. Incidence of Lassa, Ebola, and Marburg viruses in Haut-Ogooué. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 719-20 (1982).
61. Van der Walls FW, Pomeroy KL, Goudsmith J, Asher DM & Gajdusek DC. Hemorrhagic fever virus infections in an isolated rainforest area of Central Liberia. Limitations of the indirect immunofluorescence slide test for antibody screening in Africa. *Trop. Geogr. Med.* 38, 209-14 (1986).
62. Ivanov AP, Tkachenko EA, Van der Groen G, Butenko AM & Konstantinov OK. Indirect enzyme-immunoassays for the laboratory diagnosis of Lassa and Ebola hemorrhagic fevers. *Vopr. Virusol.* 31, 186-90 (1986).
63. Becker S, Feldmann H, Will C & Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med. Microbiol. Immunol.* 181, 43-55 (1992).
64. Elliott LH, Bauer SP, Perez-Oronoz G & Lloyd ES. Improved specificity of testing methods for filovirus antibodies. *J. Virol. Methods* 43, 85-100 (1993).

65. Prehaud C, Hellebrand E, Coudrier D, Volchkov VE, Volchkova VA, Feldmann H, Le Guenno B & Bouloy M. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* 79, 2565-72 (1998).
66. Ksiazek TG, West CP, Rollin PE, Jahrling PB & Peters CJ. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S192-8 (1999).
67. McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, Johnson KM, Elliott LH & Belmont-Williams R. Lassa Fever. Effective therapy with ribavirin. *New Eng. J. Med.* 314, 20-6 (1986).
68. Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman JA, Mirza S, Khurshid M & McCormick JB. Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet* 346, 472-6 (1995).
69. Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI *et al.* Propective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Inf. Dis.* 164, 1119-27 (1991).
70. Huggins JW. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Inf. Dis.* 11(Suppl 4), S750-61 (1989).
71. Peters CJ, Sanchez A, Rollin PE, Ksiazek TG & Murphy FA. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. in *Virology* (eds. Fields, B.N. & Knipe, D.M.) 1161-76 (Raven Press, Philadelphia, 1996).
72. Huggins J, Zhang Z-X & Bray M. Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-Adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S240-7 (1999).
73. Guimard Y, Bwaka MA, Colebunders R, Calain P, Massamba M *et al.* Organization of patient care during the Ebola hemorrhagic fever epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S268-73 (1999).
74. Foberg U, Fryden A, Isaksson B, Jahrling P, Johnson A *et al.* Viral haemorrhagic fever in Sweden: experiences from management of a case. *Scand. J. Infect. Dis.* 23, 143-51 (1991).
75. Kerstiens B & Matthys F. Interventions to control virus transmission during an outbreak of Ebola hemorrhagic fever: experience from Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S263-7 (1999).
76. Lloyd ES, Zaki SR, Rollin PE, Tshioko K, Bwaka MA *et al.* Long-term disease surveillance in Bandundu region, Democratic Republic of the Congo: a model for early detection and prevention of Ebola hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S274-80 (1999).
77. Heymann DL, Barakamfitye D, Szczeniowski M, Muyembe-Tamfum J-J, Bele O & Rodier G. Ebola hemorrhagic fever: lessons from Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S283-6 (1999).
78. Regnery RL & Kiley MP. Marburg and Ebola virus: possible members of a new group of negative strand viruses. in *The replication of negative strand viruses* (eds. Bishop, D.H. & Compans, R.W.) 971-7 (Elsevier, Amsterdam, 1981).
79. Murphy FA, Kiley MP & Fisher-Hoch SP. Marburg and Ebola viruses. in *Virology* (eds. Fields, B.N. & Knipe, D.M.) 1111-8 (Raven Press, New York, 1990).
80. Elliott LH, Kiley MP & McCormick JB. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* 147, 169-76 (1985).

81. Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, McCormick JB & Auperin DD. The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. *Viol.* 170, 81-91 (1989).
82. Murphy FA, Van der Groen G, Whitfield SG & Lange JV. Ebola and Marburg virus morphology and taxonomy. in *International colloquium on Ebola infection and other haemorrhagic fevers* (ed. Pattyn, S.R.) 61-82 (Elsevier-Netherland, Amsterdam, 1978).
83. Regnery RL, Johnson KM & Kiley MP. Virion nucleic acid of Ebola virus. *J. Virol.* 36, 465-9 (1980).
84. Jahrling PB. Filoviruses and Arenaviruses. in *Virology* 1068-81 (Raven Press, Philadelphia, 1995).
85. Feldmann H, Klenk H-D & Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 81-100 (1993).
86. Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP & Auperin DD. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res.* 29, 215-40 (1993).
87. Sanchez A, Trappier SG, Mahy BWJ, Peters CJ & Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3602-7 (1996).
88. Sanchez A, Trappier SG, Ströher U, Nichol ST, Bowen MD & Feldmann H. Variation in the glycoprotein and VP35 genes of Marburg virus strains. *Viol.* 240, 138-46 (1998).
89. Volchkov VE, Volchkova VA, Chepurnov AA, Blinov VM, Dolnik O, Netesov SV & Feldmann H. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.* 80, 355-62 (1999).
90. Sanchez A, Kiley MP, Klenk H-D & Feldmann H. Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73, 347-57 (1992).
91. Mühlberger E, Sanchez A, Randolph A, Will C, Kiley MP, Klenk H-D & Feldmann H. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: Homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology* 187, 534-47 (1992).
92. Johnson ED, Johnson BK, Silverstein D, Tukei P, Geisbert TW, Sanchez A & Jahrling PB. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch. Virol. Suppl.* 11, 101-14 (1996).
93. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S & Van de Pol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215, 1577-85 (1982).
94. Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, Trappier SG, Sanchez A *et al.* Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S170-6 (1999).
95. Pringle CR. The order *Mononegavirales*. *Arch. Virol.* 117, 137-40 (1991).
96. Mühlberger E, Trommer S, Funke C, Volchkov V, Klenk H-D & Becker S. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Viol.* 223, 376-80 (1996).

97. Hamaguchi M, Yoshida T, Nishikawa K, Naruse H & Nagai Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus . I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virol.* 128, 105-17 (1983).
98. Becker S, Rinne C, Hofsäss U, Klenk H-D & Mühlberger E. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virol.* 249, 406-17 (1998).
99. Curran J, Marq JB & Kolakofsky D. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J. Virol.* 69, 849-55 (1995).
100. Mühlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk H-D & Becker S. Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replications systems. *J. Virol.* 73, 2333-42 (1999).
101. Mühlberger E, Lötfering B, Klenk H-D & Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 72, 8756-64 (1998).
102. Peebles ME. Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and putting it on the road. in *The paramyxoviruses* (ed. Kingsbury, D.W.) 427-56 (Plenum Press, New York, 1991).
103. Takada A, Robison C, Goto H, Sanchez A, Murti KG, Whitt MA & Kawaoka Y. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14764-9 (1997).
104. Feldmann H, Nichol ST, Klenk H-D, Peters CJ & Sanchez A. Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virol.* 199, 469-73 (1994).
105. Geyer H, Will C, Feldmann H, Klenk H-D & Geyer R. Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiol.* 2, 299-312 (1992).
106. Doms RW, Lamb RA, Rose JK & Helenius A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virol.* 193, 545-62 (1993).
107. Feldmann H, Will C, Schikore M, Slenczka W & Klenk H-D. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virol.* 182, 353-6 (1991).
108. Volchkov VE, Volchkova VA, Slenczka W, Klenk H-D & Feldmann H. Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virol.* 245, 110-9 (1998).
109. Volchkov V, Becker S, Volchkova V, Ternovoj VA, Kotov AN, Netesov SV & Klenk H-D. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerase. *Virol.* 214, 421-30 (1995).
110. Will C, Mühlberger E, Linder D, Slenczka W, Klenk HD & Feldmann H. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 67, 1203-10 (1993).
111. Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA & Klenk H-D. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5762-7 (1998).
112. Sanchez A, Yang Z-Y, Xu L, Nabel GJ, Crews T & Peters CJ. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J. Virol.* 72, 6442-7 (1998).
113. Wool-Lewis RJ & Bates P. Endoproteolytic processing of the Ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *J. Virol.* 73, 1419-26 (1999).

114. Ruiz-Argüello MB, Goni FM, Pereira BP & Nieva JL. Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of Ebola virus. *J. Virol.* 72, 1775-81 (1998).
115. Volchkov VE, Blinov VM & Netesov SV. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS* 305, 181-4 (1992).
116. Becker Y. Retrovirus and filovirus 'immunosuppressive motif' and the evolution of virus pathogenicity in HIV-1, HIV-2, and Ebola viruses. *Virus Gene* 11, 191-5 (1996).
117. Gallaher WR. Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and Avian Sarcoma viruses. *Cell* 85, 477-8 (1996).
118. Weissenhorn W, Carfi A, Lee K-H, Skehel JJ & Wiley DC. *Mol. Cell.* 2, 605-16 (1998).
119. Malashkevich VN, Schneider BJ, McNally M, Milhollen MA, Pang JX & Kim PS. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. USA* 96, 2662-7 (1999).
120. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ & Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain of HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-30 (1997).
121. Chan DC, Fass D, Berger JM & Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-73 (1997).
122. Wool-Lewis RJ & Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* 72, 3155-60 (1998).
123. Skehel JJ, Bayley PM, Brown EB, Martin SR, Waterfield MD, White JM, Wilson IA & Wiley DC. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 968-72 (1982).
124. Volchkova VA, Feldmann H, Klenk H-D & Volchkov VE. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virol.* , 408-14 (1998).
125. Volchkov VE. Processing of the Ebola virus glycoprotein. in *Marburg and Ebola viruses.*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.D.) 35-47 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
126. Yang Z-Y, Delgado R, Xu L, Todd RF, Nabel EG, Sanchez A & Nabel GJ. Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 279, 1034-7 (1998).
127. Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, Tkachev V, Pereboeva L, Baranova S, Grazhdantseva A & Rassadkin Y. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch. Virol.* 141, 909-21 (1996).
128. Bwaka MA, Bonnet M-J, Calain P, Colebunders R, De Roo A *et al.* Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S1-7 (1999).
129. Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P & Widmer A. Human infection due to Ebola virus, subtype Côte d'Ivoire: clinical and biological presentation. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S48-53 (1999).
130. Martini GA. Marburg virus disease. clinical syndrome. in *Marburg virus disease* (eds. Martini, G.A. & Siegert, R.) 1-9 (Springer-Verlag, Berlin, 1971).

131. Mupapa K, Mukundu W, Bwaka MA, Kipasa M, De Roo A *et al.* Ebola hemorrhagic fever in pregnancy. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S11-2 (1999).
132. Kibadi K, Mupapa K, Kuvula K, Massamba M, Ndaberey D *et al.* Late ophthalmologic manifestations in survivors of the 1995 Ebola virus epidemic in Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S13-4 (1999).
133. Simpson DIH. Marburg agent disease in monkeys. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63, 303-9 (1969).
134. Murphy FA, Simpson DIH, Whitfield SG, Zlotnik I & Carter GB. Marburg virus infection in monkeys: ultrastructural studies. *Lab. Invest.* 24, 279-91 (1971).
135. Baskerville A, Bowen ET, Platt GS, McArdell LB & Simpson DI. The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.* 125, 131-8 (1978).
136. Bowen ETW, Platt GS, Simpson DIH, McArdell LB & Raymond RT. Ebola haemorrhagic fever: experimental infection of monkeys. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 188-91 (1978).
137. Fisher-Hoch SP, Platt GS, Neild GH, Southee T, Baskerville A, Raymond RT, Lloyd G & Simpson DIH. Pathophysiology of shock and hemorrhage in a fulminating viral infection (Ebola). *J. Inf. Dis.* 152, 887-94 (1985).
138. Jahrling PB, Geisbert TW, Jaax NK, Hanes MA, Ksiazek TG & Peters CJ. Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch. Virol. Suppl.* 11, 115-34 (1996).
139. Fisher-Hoch SP, Platt GS, Lloyd G, Simpson DIH, Neild GH & Barrett AJ. Haematological and biochemical monitoring of Ebola infection in rhesus monkeys: implications for patient management. *Lancet*, 1055-8 (1983).
140. Fisher-Hoch SP & McCormick JB. Experimental filovirus infections. in *Marburg and Ebola viruses*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 117-43 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
141. Stojkovic LJ, BordJoski M, Gligic A & Stefanovic Z. Two cases of cercopithecus-monkeys-associated haemorrhagic fever. in *Marburg virus disease* (eds. Martini, G.A. & Siebert, R.) 24-33 (Springer-Verlag, Berlin, 1971).
142. Feldmann H, Bugany H, Mahner F, Klenk H-D, Drenckhahn D & Schnittler HJ. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* 70, 2208-14 (1996).
143. West E, Schnittler HJ, Sprenger H, Klenk HD & Feldmann H. Filoviral replication in human macrophages. in *15th annual meeting of the american society for virology* Vol. W14-3 107 (London, Ontario, Canada, 1996).
144. Geisbert TW, Jahrling PB, Hanes MA & Zack PM. Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J. Comp. Pathol.* 106, 137-52 (1992).
145. Zaki SR, Greer PW, Goldsmith CS & Coffield LM. Ebola virus hemorrhagic fever: pathologic, immunopathologic and ultrastructural study. in *International Colloquium on Ebola Virus Research* (Antwerp, Belgium, 1996).
146. Ryabchikova EI, Kolesnikova LV & Luchko SV. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S199-202 (1999).

147. Schnittler HJ & Feldmann H. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. in *Marburg and Ebola viruses.*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 175-204 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
148. Baskerville A, Fisher-Hoch SP, Neild GH & Dowsett AB. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J. Pathol.* 147, 199-209 (1985).
149. Schnittler HJ & Feldmann H. Marburg and Ebola virus. Does the primary course of infection depend on accessibility of organ-specific macrophages. *Clin. Inf. Dis.* 27(1998).
150. Schnittler HJ, Mahner F, Drenckhahn D, Klenk H-D & Feldmann H. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J. Clin. Invest.* 91, 1301-9 (1993).
151. Lub MI, Sergeev AN, P'iankov OV, P'iankova G, Petrishchenko VA & Kotliarov LA. Certain pathogenetic characteristics of a disease in monkeys infected with the Marburg virus by an airborne route. *Vopr. Virusol.* 40, 158-61 (1995).
152. Siegert R, Shu HL & Slenczka W. Isolation and identification of the 'Marburg virus'. *Ger. Med. Mon.* 13, 514-8 (1968).
153. Gear JHS. Clinical aspects of African viral hemorrhagic fever. *Rev. Inf. Dis.* 11 (Suppl 4), S777-82 (1989).
154. Luchko SV, Dadaeva AA, Ustinova EN, Sizikova LP, Ryabchikova EI & Sandakhchiev LS. Experimental study of Ebola hemorrhagic fever in baboon models. *Bull. Exp. Biol. Med.* 9, 302-4 (1995).
155. Zaki SR & Goldsmith CS. Pathologic features of filovirus infections. in *Marburg and Ebola viruses*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 97-116 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
156. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, Geisbert TW, Kell WM, Jaax NK & Jahrling PB. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S203-17 (1999).
157. Bray M, Davis K, Geisbert T, Schmaljohn C & Huggins J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola virus hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.* 178, 651-61 (1998).
158. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM & Lowenstein CJ. An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10, 21-8 (1999).
159. Egbring R, Slenczka W & Baltzer G. Clinical manifestations and mechanism of the haemorrhagic diathesis in Marburg virus disease. in *Marburg virus disease* (eds. Martini, G.A. & Siegert, R.) 41-8 (Springer-Verlag, Berlin, 1971).
160. Zlotnik I. Marburg agent disease: pathology. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63, 310-27 (1969).
161. Osterud B, Bögwald J, Lindahl U & Seljelid R. Production of blood coagulation factor V and tissue thromboplastin by macrophages in vitro. *FEBS Lett.* 127, 154-6 (1981).
162. Unkeless JC, Gordon S & Reich E. Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 139, 834-50 (1974).
163. Rivers RPA, Hathaway WE & Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br. J. Haematol.* 30, 311-6 (1975).

164. Helin H & Edgington TS. Allogeneic induction of the human T cell-instructed monocyte procoagulant response is rapid and is elicited by HLA-DR. *J. Exp. Med.* 158, 962-75 (1983).
165. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT & Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3460-4 (1986).
166. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS & Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4533-7 (1986).
167. Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW & Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor- α and phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* 267, 12030-5 (1992).
168. Deykin D. The role of the liver in serum-induced hypercoagulability. *J. Clin. Invest.* 45, 256-63 (1966).
169. Gans H & Lowman JT. The uptake of fibrin and fibrin-degradation products by the isolated perfused rat liver. *Blood* 29, 526-39 (1967).
170. Cosgriff TM. Viruses and hemostasis. *Rev. Inf. Dis.* 11 (Suppl 4), S672-88 (1989).
171. Verstraete M. Disseminated intravascular coagulation. in *Ebola virus hemorrhagic fever* (ed. Pattyn, S.R.) 225-35 (Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1978).
172. Kowalski E. Fibrinogen derivatives and their biological activities. *Semin. Haematol.* 5, 45-59 (1968).
173. Pareti FI, Capitanio A, Mannucci L, Ponticelli C & Mannucci PM. Acquired dysfunction due to the circulation of 'exhausted' platelets. *Am. J. Med.* 69, 235-40 (1980).
174. Fong JSC & Kaplan BS. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uraemic syndrome: evidence of platelet 'exhaustion'. *Blood* 60, 564-70 (1982).
175. Marder VJ. Consumptive thrombohemorrhagic disorders. in *Hematology* (eds. Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. & Lichtman, M.A.) 1433-61 (McGraw-Hill, New York, 1987).
176. Williams WJ. Production of coagulation factors. in *Hematology* (eds. Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. & Lichtman, M.A.) 1222-5 (McGraw-Hill, New York, 1983).
177. Wong MKK & Gotlieb AI. The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. *J. Cell. Biol.* 107, 1777-83 (1988).
178. Lonigro AJ, McMurdo L, Stephenson AH, Sprague RS & Weintraub NL. Hypotheses regarding the role of pericytes in regulating movement of fluid, nutrients, and hormones across the microcirculatory endothelial barrier. *Diabetes* 45 Suppl I, S38-43 (1996).
179. Ignatyev GM, Strel'tsova MA & Kashentseva EA. Induction of immune mediators in human cultured mononuclear cells by Marburg virus. *Vopr. Virusol.* 43, 169-73 (1998).
180. Horvath CJ, Ferro TJ, Jesmok G & Malik AB. Recombinant tumor necrosis factor increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9219-23 (1988).

181. Korb G & Slenczka W. Histologic findings in liver and spleen of guinea pigs after infection by the Marburg virus. in *Marburg virus disease* (eds. Martini, G.A. & Siegert, R.) 123-4 (Springer-Verlag, Berlin, 1971).
182. Robin J, Bres P & Camain R. Passage of Marburg virus in guinea pigs. in *Marburg virus disease* (eds. Martini, G.A. & Siegert, R.) 117-22 (Springer-Verlag, Berlin, 1971).
183. Lub MI, Sergeev AN, P'iankova OG, P'iankov OV, Petrishchenko VA & Kotliarov LA. Clinical-virusological characteristics of disease in guinea pigs infected by the Marburg virus aerogenically. *Vopr. Virusol.* 40, 119-21 (1995).
184. Van der Groen G, Jacob W & Pattyn S. Ebola virus virulence for newborn mice. *J. Med. Virol.* 4, 239-40 (1979).
185. Volchkov VE, Chepurnov AA, Volchkova VA, Ternovoj V & Klenk H-D. Molecular characterization of guinea pig-adapted Ebola virus variants. (1999). *Sous presse*
186. Ryabchikova EI, Strelets L, Kolesnikova L, Pyankov O & Sergeev A. Respiratory Marburg virus infection in guinea pigs. *Arch. Virol.* 141, 2177-90 (1996).
187. Ignatyev GM, Strel'tsova MA, Agafonov AP, Prozorovskii NS, Zhukova NA, Kashentseva EA & Vorb'eva MS. The immunological indices of guinea pigs modelling Marburg hemorrhagic fever. *Vopr. Virusol.* 39, 169-71 (1994).
188. Ignatyev GM, Strel'tsova MA, Agafonov AP & Kashentseva EA. Mechanisms of protective immune response in models of Marburg fever in monkeys. *Vopr. Virusol.* 40, 109-13 (1995).
189. Ignatyev GM. Immune response to filovirus infections. in *Marburg and Ebola viruses*, Vol. 235 (ed. Klenk, H.-D.) 205-17 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).
190. Ignatyev GM, Agafonov AP, Strel'tsova MA & Kashentseva EA. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in rhesus monkeys. *J. Biotechnol.* 44, 111-8 (1996).
191. Villinger F, Rollin PE, Brar SS, Chikkala NF, Winter J *et al.* 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. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl 1), S188-91 (1999).
192. Ignatyev GM, Strel'tsova MA, Agafonov AP, Kashentseva EA & Prozorovskii NS. Experimental study of possible treatment of Marburg hemorrhagic fever with Desferal, Ribavirin, and homologous interferon. *Vopros. Virusol.* 41, 206-9 (1996).
193. Ignatyev GM, Strel'tsova MA, Kashentseva EA & Patrushev NA. Effects of tumor necrosis factor antiserum on the course of Marburg hemorrhagic fever. *Vest. Ross. Akad. Med. Nauk.* 3, 35-8 (1998).
194. Ignatyev GM, Chepurnov AA, Prozorovsky NS, Strel'tsova MA & Agafonov AP. The influence of interleukin-2 inducer 'diucifon' in Marburg haemorrhagic fever. in *International symposium 'Interferon 92'* 160-4 (Moscow, 1991).
195. Rollin PE, Williams RJ, Bressler DS, Pearson S, Cottingham M *et al.* Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl 1), S108-14 (1999).
196. Agafonov AP, Strel'tsova MA, Kashentseva EA & Ignatyev GM. Possible mechanism of immunosuppression for filoviruses infection. *Int. J. Immunorehab.* 1-Suppl, 26-30 (1994).

197. Biedermann BC & Pober JS. Human endothelial cells induce and regulate cytolytic T cell differentiation. *J. Immunol.* 161, 4679-87 (1998).
198. Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI & Lichtman AH. Human endothelial cell costimulation of T cell IFN- γ production. *J. Immunol.* 159, 3247-56 (1997).
199. Karmann K, Hughes CCV, Schechner J, Fanslow WC & Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4342-6 (1995).
200. Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D & Chess L. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J. Exp. Med.* 182, 1857-64 (1995).
201. Mantovani A, Bussolino F & Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. today* 18, 231-9 (1997).
202. Carter WA & De Clercq E. Viral infection and host defense. *Science* 186, 1172-8 (1974).
203. Doukas J, Cutler AH & Mordes JP. Polyinosinic-polycytidylic acid is a potent activator of endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 145, 137-47 (1994).
204. Jacobs BL & Langland JO. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Viol.* 219, 339-49 (1996).
205. King P & Goodbourn S. STAT1 is inactivated by a caspase. *J. Biol. Chem.* 273, 8699-704 (1998).
206. Harcourt BH, Sanchez A & Offermann MK. Ebola virus selectively inhibits responses to interferons, but not to IL-1 β in endothelial cells. *J. Virol.* 73, 3491-6 (1999).
207. Harcourt BH, Sanchez A & Offermann MK. Ebola virus inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells. *Viol.* 252, 179-88 (1998).
208. Hayes CG, Burans JP, Ksiazek TG, Del Rosario RA, Miranda MEG *et al.* Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 664-71 (1992).
209. Ignatyev GM, Strel'tsova MA, Agafonov AP, Zhukovaa NA, Kadhentseva EA & Vorob'eva MS. The immunity indices of animals immunized with the inactivated Marburg virus after infection with homologous virus. *Vopr. Virusol.* 39, 13-7 (1994).
210. Lupton HW, Lambert RD, Bumgardner DL, Moe JB & Eddy GA. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model. *Lancet* 2, 1294-5 (1980).
211. Mikhailov VV, Borisevich IV, Chernikova NK, Potryvaeva NV & Krasnyansky VP. Evaluation of the possibility of Ebola fever specific prophylaxis in baboons (*Papio hamadryas*). *Vopros. Virusol.* 39, 82-4 (1994).
212. Ignatyev GM, Agafonov AP, Strel'tsova MA, Managorova GI, Spirin GV & Cherni NB. A comparative study of the immunological indices in guinea pigs administered an inactivated Marburg virus. *Vopros. Virusol.* 36, 421-3 (1991).
213. Lange JV, McCormick JB & Walker DH. Vaccination of rhesus monkeys with gamma-inactivated Ebola virus and results of live-virus. in *Annual meeting of the American Society of Microbiology* (ed. CDC) 295-303 (Las Vegas, Nevada, 1985).

214. Agafonov AP, Ignatyev GM, Kuz'min VA, Akimenko ZA, Kosareva TV & Kashentseva EA. The immunogenic properties of Marburg virus proteins. *Vopros. Virusol.* 37, 58-61 (1992).
215. Agafonov AP, Ignatyev GM, Akimento Z & Volchkov VE. Study of immunogenic and protective properties of Marburg virus GP, NP, and VP40 proteins. in *IXth International Congress of Virology* Vol. PW52-7 300 (Glasgow, Scotland, 1993).
216. Gilligan KJ, Geisbert J, Jahrling PB & Anderson K. Assessment of protective immunity conferred by recombinant vaccinia viruses to guinea pigs challenged with Ebola virus. in *Vaccines 97* 87-92 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1997).
217. Becker S, Volchkov VE, Mühlberger E, Klenk H-D, Agafonov AP & Ignatyev GM. A recombinant vaccinia virus expressing the surface protein of Marburg virus does not protect guinea pigs against Marburg-virus infection. in *Xth International Congress of Virology* Vol. PW60-40 259 (Jerusalem, Israel, 1996).
218. Hevey M, Negley D, Geisbert J, Jahrling P & Schmaljohn A. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. *Virol.* 239, 206-16 (1997).
219. Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, Roberts T, Custer D *et al.* DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virol.* 246, 134-44 (1998).
220. Xu L, Sanchez A, Yang Z-Y, Zaki SR, Nabel EG, Nichols ST & Nabel GJ. Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med* 4, 37-42 (1998).
221. Kudoyarova-Zubavichene NM, Sergeev NN, Chepurnov AA & Netesov SV. Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infection. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S218-23 (1999).
222. Donchenko VV, Lebedev VN, Markin VA & Firova IV. Effectiveness of virus-specific proteins in immunogenesis during experimental Marburg fever. *Vopros. Virusol.* 41, 216-8 (1996).
223. Jahrling PB, Geisbert J, Swearengen JR, Jaax GP, Lewis T *et al.* Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. *Arch. Virol. Suppl.* 11, 135-40 (1996).
224. Jahrling PB, Geisbert TW, Geisbert JB, Swearengen JR, Bray M *et al.* Evaluation of immune globulin and recombinant interferon- α 2b for treatment of experimental Ebola virus infection. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S224-34 (1999).
225. Mupapa K, Massamba M, Kibadi K, Kuvula K, Bwaka A, Kipasa M, Colebunders R & Muyembe-Tamfum JJ. Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusion from convalescent patients. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S18-23 (1999).
226. Sadek RF, Khan AS, Stevens G, Peters CJ & Ksiazek TG. Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995: determinants of survival. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S24-7 (1999).
227. Maruyama T, Parren PW, Sanchez A, Rensink I, Rodriguez LL, Khan AS, Peters CJ & Burton DR. Recombinant human monoclonal antibodies to Ebola virus. *J. Inf. Dis.* 179(Suppl I), S235-9 (1999).
228. Maruyama T. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* 73, 6024-30 (1999).

229. Pierre V, Drouet MT & Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcriptase/polymerase chain reaction. *Res. Virol.* 145, 93-104 (1994).
230. Pisano MR, Durand JP & Tolou H. Partial genomic sequence determination of yellow fever virus strain associated with recent epidemic in Gabon. *Acta Virol.* 40, 103-5 (1996).
231. WHO. Yellow fever in Gabon. *Bull. World Health Organ.* 19, 64 (1995).
232. WHO. Ebola haemorrhagic fever - South-Africa. *Wkly epidemiol. rec.* 71, 359 (1996).
233. Georges-Courbot MC, Lu CY, Lansoud-Soukate J, Leroy E & Baize S. Isolation and partial molecular characterisation of a strain of Ebola virus during a recent epidemic of viral haemorrhagic fever in Gabon. *The Lancet* 349, 181 (1997).
234. Miller T, Beausang LA, Meneghini M & Lidgard G. Death-induced changes to the nuclear matrix: The use of anti-nuclear matrix antibodies to study agents of apoptosis. *BioTechniques* 15, 1042-7 (1993).
235. Linthicum KJ, Anyamba A, Tucker CJ, Kelley PW, Myers MF & Peter CJ. Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science* 285, 397-400 (1999).
236. Sanders EJ, Marfin AA, Tukel PM, Kuria G, Ademba G *et al.* First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992-1993. I. Epidemiologic investigations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 644-9 (1998).
237. Amblard J, Obiang P, Edzang S, Prehaud C, Bouloy M & LeGuenno B. Identification of the Ebola virus in Gabon in 1994. *The Lancet* 349, 181-2 (1997).
238. Nichol ST, Rowe JE & Fitch WM. Punctuated equilibrium and positive Darwinian evolution in vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10424-8 (1993).
239. Rodriguez LL, Fitch WM & Nichol ST. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13030-5 (1996).
240. Smith JS, Orciari LA, Yager PA, Seidel HD & Warner CK. Epidemiologic and historical relationship among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. *J. Inf. Dis.* 166, 296-307 (1992).
241. Rima BK, Earle JA & Yeo RP. Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. *J. Gen. Virol.* 76, 1173-80 (1995).
242. Bachmann MF & Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 235-70 (1997).
243. Skvaril F. IgG subclasses in viral infections. *Monogr. Allergy* 19, 134-43 (1986).
244. Linde A, Sunfqvist VA, Mathiesen T & Wahren B. IgG subclasses to subviral components. *Monogr. Allergy* 23, 27-32 (1988).
245. Urban M, Winkler T, Landini MP, Britt W & Mach M. Epitope-specific distribution of IgG subclasses against antigenic domains on glycoproteins of human cytomegalovirus. *J. Inf. Dis.* 169, 83-90 (1994).
246. Beck OE. Distribution of virus antibody activity among human IgG subclasses. *Clin. Exp. Immunol.* 43, 626-32 (1981).

247. Mathiesen T, Persson MA, Sundqvist VA & Wahren B. Neutralization capacity and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of separated IgG subclasses 1, 3 and 4 against herpes simplex virus. *Clin. Exp. Immunol.* 72, 211-5 (1988).
248. Gilljam G & Wahren B. Properties of IgG subclasses to human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* 25, 139-51 (1989).
249. Gorman SD & Clark MR. Humanization of monoclonal antibodies for therapy. *Semin. Immunol.* 2, 457-66 (1990).
250. Voice JK & Lachmann PJ. Neutrophil Fc γ and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complexes and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur. J. Immunol.* 27, 2514-23 (1997).
251. Eischen CM, Schilling JD, Lynch DH, Krammer PH & Leibson PJ. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* 156, 2693-9 (1996).
252. Warren HS & Kinnear BF. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J. Immunol.* 162, 735-42 (1999).
253. Ahmad A & Menezes J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J.* 10, 258-66 (1996).
254. Mabondzo A, Boussin F, Raoul H, Le Naour R, Gras G *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by high affinity cross-linking of gp41 to human macrophage Fc IgG receptor using bispecific antibody. *J. Gen. Virol.* 75, 1451-6 (1994).
255. Hober D, Jewett A & Bonavida B. Lysis of uninfected HIV-1 gp120-coated peripheral blood-derived T lymphocytes by monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10, 83-91 (1995).
256. Jewett A, Giori JV & Bonavida B. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against HIV-coated target cells by peripheral blood monocytes from HIV seropositive asymptomatic patients. *J. Immunol.* 145, 2407-12 (1990).
257. Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A & Zanussi C. Interleukin-10 down-regulates oxidative metabolism and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils. *Scand. J. Immunol.* 45, 269-75 (1997).
258. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-34 (1997).
259. Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K *et al.* Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 158, 3090-8 (1997).
260. Pullyblank AM, Guillou PJ & Monson JR. Interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha may be responsible for the lytic mechanism during anti-tumour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Br. J. Cancer* 72, 601-6 (1995).
261. Clark EA & Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367, 425-8 (1994).
262. Leist TP, Cobbold SP, Waldmann H, Aguet M & Zinkernagel RM. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J. Immunol.* 138, 2278-81 (1987).

263. Szomolanyi-Tsuda E & Welsh RM. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183, 403-11 (1996).
264. Bachmann MF, Zinkernagel RM & Oxenius A. Cutting Edge Commentary: immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J. Immunol.* 161, 5791-4 (1998).
265. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL & Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4845-9 (1992).
266. Van Deuren M, Van der Ven-Jongekrijg J, Vannier E, Van Dalen R, Pesman G, Bartelink AKM, Dinerello CA & Van der Meer JWM. The pattern of interleukin-1 β (IL-1 β) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections. *Blood* 90, 1101-8 (1997).
267. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA & Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-18 (1994).
268. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A & Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286-90 (1995).
269. Wilckens T & De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* 18, 418-23 (1997).
270. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F & Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of glucocorticoids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9991-5 (1992).
271. Pitzalis C, Pipitone N, Bajocchi G, Hall M, Goulding N *et al.* Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion. An additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J. Immunol.* 158, 5007-16 (1997).
272. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD & Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* 185, 1185-92 (1997).
273. Ruzek MC, Pearce BD, Miller AH & Biron CA. Endogenous glucocorticoids protect against cytokine-mediated lethality during viral infection. *J. Immunol.* 162, 3527-33 (1999).
274. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Spencer RL, Miller AH, McEwen BS & Biron CA. Mechanism of interleukin 12-mediated toxicities during experimental viral infections: role of tumor necrosis factor and glucocorticoids. *J. Exp. Med.* 181, 901-14 (1995).
275. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J *et al.* The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor *in vivo*: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.* 183, 1399-406 (1996).
276. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M & O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815-22 (1991).
277. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG & De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-20 (1991).

278. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M & Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 178, 2207-11 (1993).
279. Bogdan C, Vodovotz Y & Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549-55 (1991).
280. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Britt Joo G, Westvik A-B & Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J. Exp. Med.* 184, 51-60 (1996).
281. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD & Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN γ treatment. *Nature Med.* 3, 678-81 (1997).
282. Oswald IP, Wynn TA, Sher A & James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon γ -induced activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8676-80 (1992).
283. Ding L, Linsley PS, Huang L-Y, Germain RN & Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224-34 (1993).
284. Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC & O'Garra A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN γ production. *J. Immunol.* 150, 3755-65 (1993).
285. Ozawa H, Aiba S, Nakagawa S & Tagami H. Interferon- γ and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol.* 26, 648-52 (1996).
286. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW & O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444-51 (1991).
287. Li L, Elliott JF & Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 153, 3967-78 (1994).
288. De Waal Malefyt R, Yssel H & De Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4 $^{+}$ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150, 4754-65 (1993).
289. Taga K, Mostowski H & Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 81, 2964-71 (1993).
290. Groux H, Bigler M, De Vries JE & Roncarolo M-G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4 $^{+}$ T cells. *J. Exp. Med.* 184, 19-29 (1996).
291. Leeuwenberg JFM, Jeunhomme TM & Buurman WA. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes *in vitro*. *J. Immunol.* 152, 4036-43 (1994).

292. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ & Finlay-Jones JJ. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.* 157, 3672-80 (1996).
293. Joyce D, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M & Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 2699-705 (1994).
294. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H & Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 25, 1129-32 (1995).
295. Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ & Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 155, 4412-8 (1995).
296. Juttner S, Bernhagen J, Metz CN, Rollinghoff M, Bucala R & Gessner A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J. Immunol.* 161, 2383-90 (1998).
297. Yuan L, Kobayashi M, Kuramitsu Y, Li Y, Matsushita K & Hosokawa M. Restoration of macrophage tumoricidal activity by bleomycin correlates with the decreased production of transforming growth factor beta in rats bearing KDH-8 hepatome cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 71-6 (1997).
298. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C & Volk H-D. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor β . *J. Exp. Med.* 181, 1887-92 (1995).
299. Papiernik M, Leite-de-Moraes MC, Pontoux C, Joret A-M, Rocha B, Penit C & Dy M. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J. Immunol.* 158, 4642-53 (1997).
300. Lathey JL & Spector SA. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J. Virol.* 65, 6371-5 (1991).
301. Clerici M, Balotta C, Salvaggio A, Riva C, Trabattoni D *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV) phenotype and interleukin-2/interleukin-10 ratio are associated markers of protection and progression in HIV infection. *Blood* 88, 574-9 (1996).
302. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP & Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunol. Today* 9, 150-5 (1988).
303. Weiss G, Murr C, Zoller H, Haun M, Widner B, Ludescher C & Fuchs D. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 435-40 (1999).
304. Van der Poll T, Jansen J, Levi M, Ten Cate H, Wouter Ten Cate J & Van Deventer SJH. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J. Exp. Med.* 180, 1985-8 (1994).
305. Barsig J, Küsters S, Vogt K, Volk H-D, Tiegs G & Wendel A. Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Immunol.* 25, 2888-93 (1995).

306. Parry SL, Sebbag M, Feldmann M & Brennan FM. Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production. Role of T cell membrane TNF- α . *J. Immunol.* 158, 3673-81 (1997).
307. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M & Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 157, 12-20 (1996).
308. Gutierrez-Ramos JC & Bluethmann H. Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol. Today* 18, 329-34 (1997).
309. Van Deuren M, Van der Ven-Jongekrijg J, Demacker PNM, Bartelink AKM, Van Dalen R *et al.* Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J. Inf. Dis.* 169, 157-61 (1994).
310. Van Deuren M, Van der Ven-Jongekrijg J, Bartelink AKM, Van Dalen R, Sauerwein RW & Van der Meer JWM. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J. Inf. Dis.* 172, 433-9 (1995).
311. Jordan M, Otterness IG, Ng R, Gessner A, Röllinghoff M & Beuscher HU. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.* 154, 4081-90 (1995).
312. Ohlsson K, Björk P, Bergenfeldt M, Hageman R & Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348, 550-2 (1990).
313. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H & Widmer MB. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* 151, 1548-61 (1993).
314. Evans TJ, Moyes D, Carpenter A, Martin R, Loetscher H, Lesshauer W & Cohen J. Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of Gram-negative sepsis. *J. Exp. Med.* 180, 2173-9 (1994).
315. Van der Poll T, Coyle SM, Levi M, Jansen PM, Dentener M *et al.* Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. *Blood* 89, 3727-34 (1997).
316. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C & Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J. Exp. Med.* 175, 323-9 (1992).
317. Bartholdy C, Nansen A, Marker O & Thomsen AR. Soluble tumor necrosis factor (TNF)-receptor levels in serum as markers of anti-viral host reactivity. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 299-306 (1999).
318. Bilello JA, Stellrecht K, Drusano GL & Stein DS. Soluble tumor necrosis factor- α receptor type II (sTNF α R_{II}) correlates with human immunodeficiency virus (HIV) RNA copy number in HIV-infected patients. *J. Inf. Dis.* 173, 464-7 (1996).
319. Aukrust P, Liabakk NB, Müller F, Lien E, Espevik T & Froland SS. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF α) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type I infection. Correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J. Inf. Dis.* 169, 420-4 (1994).

320. Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A & Tärnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J. Inf. Dis.* 173, 38-43 (1996).
321. Bethell DB, Flobbe K, Thanh Phuong CX, Day NPJ, Phuong PT *et al.* Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.* 177, 778-82 (1998).
322. Nawroth PP & Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 163, 740-7 (1986).
323. Maruo N, Morita I, Shirao M & Murota SI. IL-6 increases endothelial permeability *in vitro*. *Endocrinology* 131, 710-4 (1992).
324. Van der Poll T, Levi M, Hack CE, Ten Cate H, Van Deventer SJH *et al.* Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Exp. Med.* 179, 1253-9 (1994).
325. Déchanet J, Grosset C, Taupin J-L, Merville P, Banchereau J, Ripoche J & Moreau J-F. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J. Immunol.* 159, 5640-7 (1997).
326. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G & Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-4 (1998).
327. Ramsay AJ, Ruby J & Ramshaw IA. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol. Today* 14, 155-7 (1993).
328. Lachman LB, Dinarello CA, Llansa ND & Fidler IJ. Natural and recombinant human interleukin 1- β is cytotoxic for human melanoma cells. *J. Immunol.* 136, 3098-102 (1986).
329. Ziegler-Heitbrock H-W, Moller A, Linke RP, Haas JG, Rieber EP & Riethmuller G. Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 46, 5947-52 (1986).
330. Philip R & Epstein LB. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon, and interleukin-1. *Nature* 323, 86-9 (1986).
331. Sambhi SK, Kohonen-Corish MR & Ramshaw IA. Local production of tumor necrosis factor encoded by recombinant vaccinia virus is effective in controlling viral replication *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4025-9 (1991).
332. Nokta M, Matzke D, Jennings M, Schlick E, Nadler PI & Pollard R. *In vivo* administration of tumor necrosis factor-alpha is associated with antiviral activity in human peripheral mononuclear cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197, 144-9 (1991).
333. Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MBA & Chisari FV. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4589-94 (1996).
334. Orange JS & Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha\beta$, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746-56 (1996).
335. Kreil TR & Eibl MM. Nitric oxide and viral infection: no antiviral activity against a flavivirus *in vitro*, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection *in vivo*. *Virol.* 219, 304-6 (1996).

336. Nathan CF, Silverstein SC, Brukner LG & Cohn ZA. Extracellular cytolysis by activated macrophage and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 149, 100-13 (1979).
337. Croen K. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex type 1 replication. *J. Clin. Invest.* 91, 2446-52 (1993).
338. Karupiah G, Xie Q-W, Buller RML, Nathan C, Duarte C & MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-8 (1993).
339. MacMicking J, Xie Q-W & Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-50 (1997).
340. Lin Y-L, Huang Y-L, Ma S-H, Yeh C-T, Chiou S-Y, Chen L-K & Liao C-L. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J. Virol.* 71, 5227-35 (1997).
341. Shoshkes Reiss C & Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J. Virol.* 72, 4547-51 (1998).
342. Melkova Z & Esteban M. Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 155, 5711-8 (1995).
343. Pavik I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Jonjic S & Koszinowski UH. Participation of endogenous tumour necrosis factor- α in host resistance to cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 74, 2215-23 (1993).
344. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agnosti JM & Watersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 136, 4220-5 (1986).
345. Takeda K, Iwamoto S, Sugimoto H, Takuma T, Kawatani N *et al.* Identity of differentiation inducing factor and tumor necrosis factor. *Nature* 323, 338-40 (1986).
346. Ahn MC, Siziopikou KP, Plate JM, Casey L, Silver M, Harris JE & Braun DP. Modulation of tumoricidal function in alveolar macrophages from lung cancer patients by interleukin-6. *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 37-44 (1997).
347. Schuurman B, Heuff G, Beelen RH & Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon- γ : a mechanistic study at the cellular level. *Cell. Immunol.* 165, 141-7 (1995).
348. Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC & Liles WC. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand. Rapid release following cellular activation. *J. Immunol.* 159, 1594-8 (1997).
349. Dockrell DH, Badley AD, Villacian JS, Heppelmann CJ, Algeciras A *et al.* The expression of Fas ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest.* 101, 2394-405 (1998).
350. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR & Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343-53 (1999).
351. Heise MT & Virgin IV HW. The T-cell-independent role of interferon and tumor necrosis factor α in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.* 69, 904-9 (1995).

352. Watanabe N, Maeda M, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji N *et al.* Tumor necrosis factor and interferon-gamma augment anticolon antibody-dependent cellular cytotoxicity in ulcerative colitis. *Immunopharmacol.-Immunotoxicol.* 18, 15-26 (1996).
353. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG & Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits *in vivo* and in human mononuclear cells *in vitro*. *J. Immunol.* 139, 1902-10 (1987).
354. Ikejima T, Okusawa S, Ghezzi P, Van der Meer JWM & Dinarello CA. Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* and circulating TNF-like activity in rabbits. *J. Inf. Dis.* 162, 215-23 (1990).
355. Shalaby MR, Waage A, Aarden L & Espevik T. Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production *in vivo*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53, 488-98 (1989).
356. Liu Y & Janeway CA. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int. Immunol.* 3, 323-8 (1991).
357. McLellan AD, Sorg RV, Williams LA & Hart DNJ. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 26, 1204-10 (1996).
358. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK & Mescher MF. Inflammatory cytokines provides a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 162, 3256-62 (1999).
359. Joseph SB, Miner KT & Croft M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF. *Eur. J. Immunol.* 28, 277-89 (1998).
360. Vella AT, Mitchell T, Groth B, Linsley PS, Green JM, Thompson CB, Kappler JW & Marrack P. CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival *in vivo*. *J. Immunol.* 158, 4714-20 (1997).
361. Pape KA, Khoruts A, Mondino A & Jenkins MK. Inflammatory cytokines enhance the *in vivo* clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *J. Immunol.* 159, 591-8 (1997).
362. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V & Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell network and germinal centers, and in the maturation of the humoral response. *J. Exp. Med.* 184, 1397-411 (1996).
363. Van-Snick J, Renauld JC, Simpson RJ, Uyttenhove C & Vink A. Mouse IL-6. A hybridoma growth factor with multiple effects on normal B and T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 557, 206-13 (1989).
364. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E & Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 185, 461-9 (1997).
365. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-42 (1994).
366. Renauld JC, Vink A & Van-Snick J. Accessory signals in murine cytolytic T cell responses. Dual requirement for IL-1 and IL-6. *J. Immunol.* 143, 1894-8 (1989).

367. Ranges GE, Figari IS, Espevik T & Palladino MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor- β and reversal by recombinant tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 166, 991-8 (1987).
368. Furie MB & Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.* 146, 1287-301 (1995).
369. Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B & Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25, 64-8 (1995).
370. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS & Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3652-6 (1994).
371. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-8 (1998).
372. Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD & Kunkel SL. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte:endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-73 (1995).
373. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U & Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 361, 79-82 (1993).
374. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ & Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* 260, 355-8 (1993).
375. Schall TJ, Bacon K, Camp RDR, Kaspari JW & Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177, 1821-5 (1993).
376. Tedla N, Wang H-W, McNeil HP, Girolamo ND, Hampartzoumian T, Wakefield D & Lloyd A. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β . *J. Immunol.* 161, 5663-72 (1998).
377. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL & Murphy WJ. Chemokines and T lymphocyte activation. I. β chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J. Immunol.* 156, 2095-103 (1996).
378. Taub DD, Sayers TJ, Carter CRD & Ortaldo JR. α and β chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 155, 3877-88 (1995).
379. Baumann H & Gauldie J. The acute phase response. *Immunol. Today* 15, 74-80 (1994).
380. Tilg H, Dinarello CA & Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol. Today* 18, 428-32 (1997).
381. Bopst M, Haas C, Car B & Eugster H-P. The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin. *Eur. J. Immunol.* 28, 4130-7 (1998).
382. Mackiewicz A, Schootink H, Heinrich PC & Rose-John S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J. Immunol.* 149, 2021-7 (1992).

383. Schnidler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark S & Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40-7 (1990).
384. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM & Frey FJ. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 β enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J. Exp. Med.* 186, 189-98 (1997).
385. Lowin B, Hahne M, Mattmann C & Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-2 (1994).
386. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S *et al.* Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182, 1777-83 (1995).
387. Munder M, Mallo M, Eichmann K & Modolell M. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187, 2103-8 (1998).
388. Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, McCloskey TW, Hosaka N, Kayagaki N, Yagita H & Pahwa S. Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis. A possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J. Immunol* 158, 2456-63 (1997).
389. Welsh RM. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J. Exp. Med.* 148, 163-81 (1978).
390. Berke G. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol. Today* 16, 343-6 (1995).
391. Kos FJ & Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTL. *Immunol. Today* 17, 174-6 (1996).
392. Orange JS & Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- γ production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* 156, 1138-42 (1996).
393. Ngola Atedzoe B, Ahmad A & Menezes J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J. Immunol.* 159, 4966-72 (1997).
394. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N *et al.* Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383-90 (1998).
395. Tripp CS, Wolf SF & Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3725-9 (1993).
396. Salvucci O, Kolb J-P, Dugas B, Dugas N & Chouaib S. The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor- α in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. *Blood* 92, 2093-102 (1998).
397. Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E *et al.* Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 184, 579-84 (1996).
398. Shibata Y, Ann Foster L, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM *et al.* Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN- γ -inducing factors but enhances NK cell production of IFN- γ . *J. Immunol.* 161, 4283-8 (1998).

399. Zinkernagel RM & Doherty PC. Restriction of *in vitro* T cells mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-2 (1974).
400. Morris AG, Lin YL & Askonas BA. Immune interferon release when a cloned cytotoxic T-cell line meets its correct influenza-infected target cell. *Nature* 295, 150-2 (1982).
401. Kuroda MJ, Schmitz JE, Charini WA, Nickerson CE, Lifton MA, Lord CI, Forman MA & Letvin NL. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J. Immunol.* 162, 5127-6133 (1999).
402. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Plückthun A, Elliot T, Hentgartner H & Zinkernagel R. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class-I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187, 1383-93 (1998).
403. Thomsen AR, Johansen J, Marker O & Christensen JP. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J. Immunol.* 157, 3074-80 (1996).
404. Yang G, Hellström KE, Mizuno MT & Chen L. In vitro priming of tumor-reactive cytolytic T lymphocytes by combining IL-10 with B7-CD28 costimulation. *J. Immunol.* 155, 3897-903 (1995).
405. Summerfield A, Knötig SM & McCullough KC. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J. Virol.* 72, 1853-61 (1998).
406. Schwiebert R & Fultz PN. Immune activation and viral burden in acute disease induced by simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14: correlation between in vitro and in vivo events. *J. Virol.* 68, 5538-47 (1994).
407. Whetter L, Novembre FJ, Saucier M, Gummuluru S & Dewhurst S. Costimulatory pathways in lymphocyte proliferation induced by the simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14. *J. Virol.* 72, 6155-8 (1998).
408. Jeon SH, Jeong S, Lee C, Kim JK, Kim YS, Chung H-Y, Park SD & Seon RH. Expression of *Tcf-1* mRNA and surface TCR-CD3 complexes are reduced during apoptosis of T cells. *Int. Immunol.* 10, 1519-27 (1998).
409. Kroemer G. The proto-oncogen Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 3, 614-20 (1997).
410. Boudet F, Lecoœur H & Gougeon M-L. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol.* 156, 2282-93 (1996).
411. Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puoti M & Primi D. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V β sequences. *Science* 254, 860-2 (1991).
412. Marrack P & Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248, 705-11 (1990).
413. Häffner AC, Zepter K & Elmetts CA. Major histocompatibility complex class I molecule serves as a ligand for presentation of the superantigen staphylococcal enterotoxin B to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3037-42 (1996).

414. Fischer H, Dohlsten M, Andersson U, Hedlund G, Ericsson P, Hansson J & Sjogren HO. Production of TNF- α and TNF- β by staphylococcal enterotoxin A activated human T cells. *J. Immunol.* 144, 4663-9 (1990).
415. Andersson J, Nagy S, Bjork L, Abrams J, Holm S & Andersson U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single cell level. *Immunol. Rev.* 127, 69-96 (1992).
416. Renno T, Hahne M & MacDonald HR. Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen-induced T cell apoptosis in vivo. *J. Exp. Med.* 181, 2283-7 (1995).
417. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez F, Vuillier D, Charron V, Lotteau V & Scott-Algara D. Evidence in humans of a viral superantigen. *Nature* 358, 507-10 (1992).
418. Acha-Orbea H, Held W, Wanders GA, Shahov AN, Scarpellino L, Lees RK & Macdonald HR. Exogenous and endogenous mouse mammary tumour virus superantigens. *Immunol. Rev.* 131, 5-25 (1993).
419. Rowen L, Koop BF & Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-62 (1996).
420. Le Bon A, Lucas B, Vasseur F, Penit C & Papiernik M. In vivo T cell response to viral superantigen. Selective migration rather than proliferation. *J. Immunol.* 156, 4602-8 (1996).
421. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK & Baldwin Jr AS. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-6 (1995).
422. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H & Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362, 758-61 (1993).
423. Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA & Berzofsky JA. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in Bcl-2 levels and allows tumor necrosis factor α receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1391-9 (1998).
424. Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A & Berzofsky JA. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J. Exp. Med.* 184, 485-92 (1996).
425. Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM & Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-41 (1995).
426. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Jin Yoo N, Mahboubi A *et al.* Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-4 (1995).
427. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH & Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377, 348-51 (1995).
428. Liblau RS, Tisch R, Shokat K, Yang XD, Dumont N, Goodnow CC & McDevitt HO. Intravenous injection of soluble antigen induces thymic and peripheral T-cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3031-6 (1996).
429. Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB & Miller RG. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J. Immunol.* 156, 1788-98 (1996).

430. Ayroldi E, Zollo O, Cannarile L, D'Adamio F, Grohmann U, Delfino DV & Riccardi C. Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. *Blood* 92, 4212-9 (1998).
431. Ross ME & Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 89, 910-8 (1997).
432. Jewett A, Cavalcanti M & Bonavida B. Pivotal role of endogenous TNF- α in the induction of functional inactivation and apoptosis in NK cells. *J. Immunol.* 159, 4815-22 (1997).
433. Yoshida H, Sumichika H, Hamano S, He X, Minamishima Y, Kimura G & Nomoto K. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 69, 4769-75 (1995).
434. Gummuluru S, Novembre FJ, Lewis M, Gelbard HA & Dewhurst S. Apoptosis correlates with immune activation in intestinal lymphoid tissue from macaques acutely infected by a highly enteropathic simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virology* 225, 21-32 (1996).
435. Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R & Alderson MR. Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. A potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion. *J. Immunol.* 156, 523-32 (1996).
436. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature med.* 1, 129-34 (1995).
437. Gomez-del-Moral M, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerra A & Dominguez J. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J. Virol.* 73, 2173-80 (1999).
438. Herbein G, Van Lint C, Lovett JL & Verdin E. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes. *J. Virol.* 72, 660-70 (1998).
439. Chen H, Yip YK, George I, Tyorkin M, Salik E & Sperber K. Chronically HIV-1-infected monocytic cells induce apoptosis in cocultured T cells. *J. Immunol.* 161, 4257-67 (1998).
440. Hasegawa D, Kojima S, Tatsumi E, Hayakawa A, Kosaka Y *et al.* Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 91, 2793-9 (1998).
441. Suda T, Tanaka M, Miwa K & Nagata S. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J. Immunol.* 157, 3918-24 (1996).
442. Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N & Nagata S. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol.* 158, 2303-9 (1997).
443. Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K *et al.* Fas ligand in human serum. *Nature med.* 2, 317-22 (1996).
444. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T & Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* 186, 2045-50 (1997).

445. Tanaka M, Itai T, Adachi M & Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature Med.* 4, 31-6 (1998).
446. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B *et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 71-7 (1995).
447. Hodge S, Novembre FJ, Whetter L, Gelbard HA & Dewhurst S. Induction of Fas ligand expression by an acutely lethal simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virology* 252, 354-63 (1998).
448. Kojima H, Eshima K, Takayama H & Sitkovsky MV. Leukocyte function-associated antigen-1-dependent lysis of Fas+ (CD95+/apo-1+) innocent bystanders by antigen-specific CD8+ CTL. *J. Immunol.* 159, 2728-34 (1997).
449. Garrone P, Neidhardt E-M, Garcia E, Galibert L, Van Kooten C & Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182, 1265-73 (1995).
450. Daniel PT & Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J. Immunol.* 152, 5624-32 (1994).
451. Stohl W, Lynch DH, Starling GC & Kiener PA. Superantigen-driven, CD8+ T cell-mediated down-regulation: CD95 (Fas)-dependent down-regulation of human Ig responses despite CD95-independent killing of activated B cells. *J. Immunol.* 161, 3292-8 (1998).
452. Badley AD, Dockrell D, Simpson M, Schut R, Lynch DH, Leibson P & Paya CV. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 185, 55-64 (1997).
453. Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T, Lin T, Griffith TS *et al.* Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 9, 711-20 (1998).
454. Clement MV & Stamenkovic I. Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J. Exp. Med.* 180, 557-67 (1994).
455. Clerici M, Sarin A, Berzofsky JA, Landay AL, Kessler HA *et al.* Antigen-stimulated apoptotic T-cell death in HIV infection is selective for CD4+ T cells, modulated by cytokines and effected by lymphotoxin. *AIDS* 10, 603-11 (1996).
456. Speiser DE, Sedzda E, Ohteki T, Bachmann MF, Pfeffer K, Mak TW & Ohashi PS. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 26, 3055-60 (1996).
457. Sarin A, Conan-Cibotti M & Henkart PA. Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J. Immunol.* 155, 3716-8 (1995).
458. Liu Y & Janeway CA. Interferon γ plays a critical role in induced cell death of effector cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 172, 1735-9 (1990).
459. Novelli F, Di Pierro F, Di Celle PF, Bertini S, Affaticati P, Garotta G & Forni G. Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cells control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J. Immunol.* 152, 496-504 (1994).
460. Buttke TM & Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15, 7-10 (1994).

461. Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P & Aiello FB. Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood* 86, 4199-205 (1995).
462. Gonzalo JA, Gonzalez-Garcia A, Martinez A-C & Kroemer G. Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 177, 1239-46 (1993).
463. Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS & Ashwell JD. Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145, 4037-45 (1990).
464. Jeremias I, Herr I, Boehler T & Debatin K-M. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 143-52 (1998).
465. Cinatl J, Schlotz M, Weber B, Cinatl J, Rabenau H, Markus BH, Encke A & Doerr HW. Effects of desferrioxamine on human cytomegalovirus replication and expression of HLA antigens and adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *Transpl. Immunol.* 3, 313-20 (1995).
466. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM & Biron CA. Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 71, 9248-58 (1997).
467. Nguyen KB & Biron CA. Synergism for cytokine-mediated disease during concurrent endotoxin and viral challenges: roles for NK and T cell IFN- γ production. *J. Immunol.* 162, 5238-46 (1999).
468. Seino K-I, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I *et al.* Cutting Edge: chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J. Immunol.* 161, 4484-8 (1998).
469. Ottonello L, Tortolina G, Amelotti M & Dallegri F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 162, 3601-6 (1999).
470. Savill J, Fadok V, Henson P & Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14, 131-6 (1993).
471. Ren Y, Silverstein RL, Allen J & Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 181, 1857-62 (1995).
472. Rosenberg YJ, Cafaro A, Brennan T, Greenhouse JG, Villinger F *et al.* Virus-induced cytokines regulate circulating lymphocyte levels during primary SIV infections. *Int. Immunol.* 9, 703-12 (1997).
473. Roth SJ, Woldemar Carr M & Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- γ inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25, 3482-8 (1995).
474. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD & Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol. Today* 15, 406-10 (1994).
475. Whitmire JK, Slifka MK, Grewal IS, Flavell RA & Ahmed R. CD40 ligand-deficient mice generate a normal primary cytotoxic T-lymphocyte response but a defective humoral response to a viral infection. *J. Virol.* 70, 8375-81 (1996).
476. Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, Law C-L, Fanslow WC, Armitage RJ & Clark EA. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J. Immunol.* 152, 5643-52 (1994).

477. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH & Lanier LL. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 353-60 (1992).
478. Harding FA & Allison JP. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J. Exp. Med.* 177, 1791-6 (1993).
479. Walker LSK, McLeod JD, Boulougouris G, Patel YI, Hall ND & Sansom DM. Down-regulation of CD28 via Fas (CD95): influence of CD28 on T-cell apoptosis. *Immunol.* 94, 41-7 (1998).
480. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-60 (1999).
481. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond F, Chang S-Y *et al.* Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1030-5 (1999).

