

Écosystèmes forestiers et virus Ebola.

J. M. Morvan (1), E. Nakouné (1), V. Deubel (2) & M. Colyn (3)

(1) Laboratoire des arbovirus, Centre collaborateur OMS pour les fièvres hémorragiques virales et maladies émergentes, Institut Pasteur, BP 923, Bangui, République Centrafricaine.

(2) Unité des arbovirus et des virus des fièvres hémorragiques, Institut Pasteur, Paris.

(3) Laboratoire d'éthologie-évolution-écologie, CNRS, UMR 6552, Université de Rennes, France.

Tirés-à-part : Docteur Jacques M. Morvan, Directeur de l'Institut Pasteur, BP 923, Bangui, RCA. Tél: (236) 61.28.37; Fax: (236) 61.01.09; E-mail: morvan@intnet.cf

Manuscrit n° 2155/RIP9. 3e colloque du réseau international des Instituts Pasteur et instituts associés. 14-15 octobre 1999, Institut Pasteur de Paris.

Summary: Ebola virus and forest ecosystem.

Despite data collected since the emergence of the Ebola virus in 1976, its natural transmission cycle and especially the nature of its reservoirs and means of transmission are still an enigma. This means that effective epidemiological surveillance and prevention are difficult to implement. The location of outbreak areas has suggested that the reservoir and the transmission cycle of the Ebola virus are closely linked to the rainforest ecosystem. The fact that outbreaks seldom occur suggests the presence of a rare animal reservoir having few contacts with man. Paradoxically, various serological investigations have shown a high prevalence in human beings, especially in forest areas of the Central African Republic (CAR), with no pathology associated. This would appear to suggest a circulation of both pathogenic and non-pathogenic strains as well as frequent contacts with man. The ecological changes resulting from human activity (agriculture and logging) account for the modification of the fauna (movement of rainforest fauna, introduction of savannah species) and could explain a multiplication of contacts. Likewise, it is interesting to note that the centre of outbreaks has always been in areas bordering on forests (ecotone forest-savannah in the Democratic Republic of Congo, savannah in Sudan). All these considerations have led us to establish a permanent "watch" in areas bordering on forests in the CAR, involving a multidisciplinary approach to the virological study (strain isolation, molecular biology) of the biodiversity of small terrestrial mammals. The results of a study conducted on 947 small mammals has shown for the first time the presence of the Ebola virus genome in two species of rodents and one species of shrew living in forest border areas. These animals must be considered as intermediary hosts and research should now focus on reservoirs in the ecosystem of forest border areas where contacts with man are likely to be more frequent.

Résumé :

Malgré les données obtenues depuis l'émergence, en 1976, du virus Marburg et, en 1976, du virus Ebola, le cycle naturel de transmission de ces virus demeure une énigme. Les perturbations de l'écosystème forestier liées aux activités humaines (activités agricoles, exploitations forestières) sont à l'origine de modifications de la faune (déplacement de faune forestière, introduction d'espèces savaniques) qui peuvent se traduire par une augmentation des contacts réservoirs-hôtes intermédiaires-homme. L'hypothèse retenue est que le réservoir se trouve dans l'écosystème périforestier. L'étude, réalisée dans plusieurs zones forestières ou périforestières de Centrafrique, est basée sur une approche pluridisciplinaire faisant appel à l'étude de la biodiversité des micromammifères terrestres, couplée à une étude virologique (isolement de souches, biologie moléculaire). Les résultats obtenus à partir de l'analyse de 947 micromammifères ont permis de mettre en évidence pour la première fois la présence du génome du virus Ebola chez plusieurs espèces de micromammifères terrestres périforestiers.

**Ebola virus
small mammal
forest-savannah ecosystem
Central African Republic
Sub-saharan Africa**

**virus Ebola
micromammifère
écotone forêt-savane
République centrafricaine
Afrique intertropicale**

Introduction

La connaissance du cycle naturel du virus Ebola constitue l'objectif prioritaire des différentes équipes travaillant sur ce virus. Depuis son émergence en 1976 en République démocratique du Congo (RDC, ex-Zaïre) et au Soudan, le virus Ebola a réémergé à six reprises en Afrique et deux fois aux États-Unis. En Afrique centrale, la répétition des épidémies après de longues périodes muettes suggère que le virus persiste dans la nature chez un hôte réservoir jusqu'à présent non encore identifié. De même, le mécanisme de transmission à l'homme à partir de ce réservoir demeure totalement mystérieux. Les épidémies humaines sont toutes localisées en zone inter-tropicale. Certaines observations ont suggéré que

le virus se maintenait grâce à un cycle inconnu dans la forêt tropicale humide et ont orienté les recherches du réservoir au cœur de cette forêt : les cas index de Kikwit (RDC) en 1995 et de Mayibout (Gabon) en 1994 étaient des charbonniers ou des chercheurs d'or (1, 8) ; en Côte d'Ivoire, dans la forêt de Taï, l'épidémie a frappé des chimpanzés (7, 9).

La compréhension du cycle sauvage et du phénomène d'émergence

L'hypothèse classique concernant le réservoir est la suivante : le réservoir de virus est un mammifère, comme c'est le cas pour d'autres virus à ARN comme les *Arenavirus* ou les *Hantavirus*, et ce mammifère est lié à l'écosystème forestier.

L'émergence de souches pathogènes du virus Ebola avec manifestations cliniques chez l'homme est un événement rare qui signifie que les contacts du réservoir avec l'homme sont rares parce que :

- le réservoir est une espèce rare,
- le réservoir est une espèce commune mais ayant de rares contacts avec l'homme en raison d'une niche écologique différente (la canopée par exemple),
- la transmission du virus à l'homme est inefficace, parce que cette transmission est limitée à l'espèce réservoir (transmission verticale ou sexuelle par exemple).

Malgré les recherches menées sur les sites épidémiques (2, 8) aucune trace de virus n'a été détectée (absence d'isolement viral, sérologies négatives chez les animaux testés). Ces observations renforçaient l'hypothèse selon laquelle le réservoir est une espèce rare ou peu accessible. Par ailleurs, SWANE-POEL (11) a pu montrer expérimentalement que certaines espèces de chiroptères étaient infectables par le virus, tendant ainsi à renforcer l'idée que le réservoir est une espèce présente au niveau de la canopée.

Cependant, les différentes enquêtes sérologiques réalisées en Afrique centrale montrent des fréquences relativement élevées d'anticorps spécifiques dans les populations humaines et suggèrent que la transmission à l'homme est plus fréquente. L'enquête que nous avons menée en RCA (5) de 1994 à 1998 a montré une séroprévalence élevée des anticorps anti-Ebola, en l'absence de toute manifestation pathologique, chez des populations humaines vivant dans des zones forestières proches de la lisière forestière, ce qui évoque une circulation de souches peu ou non pathogènes.

Ecosystème forestier et transmission

La transmission du virus Ebola à l'homme dans le milieu naturel peut être attribuée aux changements comportementaux de l'homme ou à des modifications écologiques qui vont augmenter les risques de contact entre l'homme et le réservoir de virus.

- Les activités humaines et les échanges ont modifié le comportement de l'homme :

- la création de routes et de pistes forestières : l'homme pénètre ainsi dans le biotope forestier fermé où le virus survit dans son réservoir sauvage jusque-là peu accessible ;
- l'homme s'installe dans la forêt, les villages sont situés le long des routes et des pistes et ainsi, dans des zones à faible densité de population (0,7 à 0,8 habitant au km²), on observe une concentration de population liée aux emplois directs dans les exploitations forestières et aux emplois indirects (commerces de proximité, échanges).

• Les activités humaines perturbent l'écosystème forestier et vont déstabiliser le cycle enzootique et faciliter l'échappement du virus hors de son biotope :

- le défrichement nécessaire aux activités agricoles,
- les exploitations forestières qui réduisent le couvert forestier, détruisent une partie de la canopée et éclaircissent le sous-bois.

Ces activités conduisent à une fragmentation et à une dégradation du milieu entraînant la formation d'une mosaïque

forêt-savane et une augmentation de l'interface forêt-savane. Ces zones de lisières et de clairières forestières utilisées pour les activités agricoles sont habitées par de très nombreux rongeurs et insectivores.

- Les modifications de l'écosystème ont des conséquences sur les communautés de faune sauvage :

- migration de la faune forestière résidente vers les zones dégradées ou cultivées en périphérie de forêt,
- introduction d'une faune savanicole par développement des populations de rongeurs (champs cultivés et rebus alimentaires de l'homme). Cette faune est susceptible de servir d'hôte intermédiaire.

Ces flux migratoires se traduisent par une augmentation des contacts entre l'homme et les petits mammifères dans cette interface.

L'étude en République centrafricaine 1994-1999

Elle s'inscrit dans le cadre d'une démarche de veille microbiologique et repose sur une hypothèse différente. L'analyse des comptes-rendus d'enquêtes épidémiologiques au décours des épisodes épidémiques indique que les épidémies n'ont pas eu lieu dans un environnement forestier, mais plutôt en périphérie dans la zone de transition, ou même en zone de savane (Soudan 1976). L'étude de l'histoire évolutive des faunes et les modifications biogéographiques de la forêt équatoriale indiquent que le réservoir de virus ne doit pas résider dans les zones refuges de la forêt, mais que le virus doit circuler chez un réservoir vivant en périphérie du bloc forestier dans les zones de rencontre forêt-savane ou dans les zones de transition forêt-culture : l'écotone forêt-savane, lieu des migrations de faune et de présence humaine.

Matériels et méthodes

Les sites d'étude

L'étude a été menée dans trois zones forestières de RCA (figure 1) :

- la forêt de la Ngotto, à 180 km au sud-ouest de Bangui. Il s'agit d'une réserve écologique forestière constituée d'une forêt primaire semi caducifoliée. Sur ce site, un suivi a été réalisé de septembre 1998 à septembre 1999, permettant une

Figure 1.

Localisation des sites d'étude.
Location of study sites.



étude des populations de faune, ainsi qu'une mesure et un suivi des densités de population ;

- le site de Salo, situé à 310 km au sud-ouest de Bangui, près de la réserve de la Dzangha-Sangha, dans une zone de forêt très dégradée. Les prélèvements avaient été réalisés en juin 1994, au début de la saison des pluies. Dans cette région, l'étude a été complétée par l'analyse d'animaux capturés en juin 1998 (Justina REY, Université de Toronto) à Bayanga, situé à 60 km au sud de Salo, en zone forestière ;

- le troisième site est localisé à Bohou, à 500 km au nord de Bangui, en zone de savane. Les captures ont été réalisées en juin 1998 dans une forêt-galerie.

Sur les différents sites, les micromammifères ont été capturés vivants par pièges SHERMANN pour les rongeurs, par pièges PITFALL pour les musaraignes et par filets pour les chiroptères. Les animaux ont été déterminés sur place (ou conservés en alcool pour détermination complémentaire ultérieure) et euthanasiés. Les sérums et les organes (rate, foie, reins) ont été prélevés et immédiatement congelés en azote liquide.

L'analyse virologique

Considérant que le virus se trouve dans le réservoir en faible quantité, les techniques de biologie moléculaire (10) ont été mises en œuvre en première intention. L'analyse a fait appel à la technique de RT-PCR-PCR nichée d'une part dans le gène de la glycoprotéine en utilisant deux couples d'amorces spécifiques du virus Ebola et d'autre part dans le gène de la polymérase à l'aide de deux couples d'amorces consensus *Filovirus*.

Ces techniques ont été complétées par :

- la détection d'antigène viral par immunocapture antigène et ELISA,
- les méthodes classiques d'isolement sur culture cellulaire (Vero E6 et BHK21) et sur animal (souriceau et cobaye) pour les échantillons trouvés positifs en PCR,
- la recherche d'anticorps spécifiques par technique ELISA pour certains sérums (rongeurs),
- la microscopie électronique.

Les résultats

Les animaux capturés (tableau I)

- sur le site de la Ngotto, 662 échantillons de rate d'animaux ont été testés. Parmi les espèces capturées, trois sont dominantes : *Praomys* sp et *Hylomyscus* sp chez les rongeurs, *Sylvisorex* pour les insectivores ;

- à Salo, 80 rates ont été testées, complétées par l'analyse de 123 échantillons de rate provenant de Bayanga. À Salo, l'espèce dominante est un rongeur savanicole, *Mus setulosus*. À Bayanga, en zone forestière, on retrouve *Praomys* et *Hylomyscus* ;

- sur le site de Bohou, 82 animaux ont été testés. Trois espèces sont dominantes : deux espèces de rongeurs, *Mus setulosus* rongeur savanicole et *Praomys* rongeur forestier et une espèce de musaraigne, *Crocidura* sp.

Les résultats virologiques

Tableau I.

Animaux testés au laboratoire, répartition selon la localisation géographique.
Animals tested in the laboratory, distribution according to geographic location.

	Salo 1994 n = 80	Bayanga 1998 n = 123	Bohou 1998 n = 82	Ngotto 1998-99 n = 662
rongeurs	71	123	26	211
musaraignes	8	-	34	425
chauves-souris	1	-	22	5
autres mammifères	-	-	-	3
oiseaux	-	-	-	16
reptiles	-	-	-	2

Toutes les tentatives d'isolement et de détection d'antigène sont demeurées négatives, seule la technique de RT-PCR suivie d'une PCR nichée a permis de mettre en évidence la présence de séquences génomiques du virus Ebola dans les échantillons de rate de 7 animaux. L'amplification dans le gène de la glycoprotéine a montré, après révélation par bromure d'éthidium ou par hybridation, la présence d'une bande attendue de 308 kb. Le séquençage du fragment obtenu a révélé une séquence identique à celles des souches Ebola Zaïre 76, Zaïre 95 et Gabon 94. La PCR dans le gène de la polymérase a permis d'amplifier une séquence virale identique, à un nucléotide près, à celle de Gabon 94. Enfin, l'étude en microscopie électronique d'un fragment de rate de *Praomys* sp a montré la présence de formations tubulaires intra-cytoplasmiques évoquant la nucléocapside des *Filovirus*.

Au total, 7 animaux ont été trouvés positifs, 6 sont des rongeurs appartenant à 2 espèces, *Mus setulosus* savanicole et *Praomys* sp qui vit dans l'écotone forêt-savane, le dernier est une musaraigne, *Sylvisorex ollula* forestière. Il s'agit d'espèces dominantes, relativement fréquentes. Elles sont terrestres, à habitat périforestier, voire savanicole; certaines sont anthropiques, comme *Mus setulosus*, venant volontiers au contact de l'homme et pouvant fréquenter les habitations.

Discussion

Les seuls résultats obtenus sont la détection de séquences virales et une image en microscopie électronique. L'absence d'isolement viral, l'absence d'anticorps spécifiques chez près de 200 rongeurs testés et l'absence d'excrétion virale sur l'image en microscopie électronique font évoquer un cycle incomplet de multiplication virale. La capacité pour le virus Ebola de générer des particules défectives et d'établir une infection permanente a été récemment décrite en culture cellulaire (3). Par ailleurs, l'analyse a permis de mettre en évidence dans certains organes testés la présence de séquences ADN résultat d'une intégration du génome viral. Ceci pourrait être expliqué par la présence de transcriptase inverse endogène dans les cellules de l'hôte capable de générer des transcrits ADN qui vont persister après l'infection aiguë, comme l'a décrit KLENERMAN *et al.* (6) pour le virus de la chorioméningite lymphocytaire au cours de l'infection chez la souris adulte. Le séquençage des fragments génomiques obtenus montre une très grande stabilité génétique du virus, remarquable pour un virus à ARN. Ainsi, en Afrique centrale, de 1996 à 1999, les souches de virus Ebola n'ont pratiquement pas varié. Cette observation suggère une faible multiplication virale chez l'hôte réservoir sans véritable pression de sélection et un phénomène ancien de co-évolution entre le virus et son réservoir. Par ailleurs, l'évolution du virus semble suivre celle de la faune mammalienne. Comme les études biogéographiques (4) l'ont montré, la faune du bassin congolais présente des caractères distinctifs de celle de la côte atlantique ou de l'Afrique de l'Ouest. De la même manière, on distingue dans le bloc bassin du Congo un même sous-type du virus Ebola réunissant les souches de RDC, Gabon et RCA.

Conclusion

L'étude menée en RCA met en évidence pour la première fois la trace du virus Ebola chez des mammifères sains non primates ; elle ne permet pas de conclure à la qualité de réservoir des espèces incriminées, qui sont des espèces terrestres, fréquentes et à habitat péri forestier. Ces espèces

jouent peut-être le rôle d'hôte intermédiaire, dont l'existence permet de cibler la recherche du réservoir sur un écosystème particulier, l'écotone forêt-savane et, contrairement à l'hypothèse classique, chez des espèces qui seraient relativement fréquentes. Seules la réunion d'une équipe pluridisciplinaire, l'utilisation de techniques modernes et sensibles ont permis l'obtention de ces résultats. La surveillance de la dynamique des populations de petits mammifères est un élément capital de la veille microbiologique et revêt un caractère prédictif essentiel dans la détection des émergences.

Références bibliographiques

1. AMBLARD J, OBIANG P, EDZANG S, PREHAUD C, BOULOY M & LE GUENNO B – Identification of the Ebola virus in Gabon in 1994. *Lancet*, 1997, **349**, 181-182.
2. 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 Cameroun: ecologic, virologic and serologic survey, 1979-1980. *J Infect Dis*, 1999, **179** (Suppl 1), S139-S147.
3. CALAIN P, MONROE MC & NICHOL ST - Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology*, 1999, **262**, 114-128.
4. COLYN M – Modifications paléoenvironnementales et évolution des faunes planitiales de l'Afrique centrale: réévaluation des concepts biogéographiques. *Bull Inst R Sci Nat Belg Biol*. In press.
5. GONZALEZ JP, NAKOUNE E, SLENCZKA W, VIDAL P & MORVAN JM – Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected populations of the Central African Republic. *Microbes Infect*, 2000, **2**, 39-44.
6. KLENERMAN P, HENGARTNER H & ZINKERNAGEL RM - A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature*, 1997, **390**, 298-301.
7. LE GUENNO B, FORMENTY P, WYERS M, GOUNON P, WALKER F & BOESCH C – Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet*, 1995, **345**, 1271-1272.
8. LEIRS H, MILLS JN, KREBS JW, CHILDS JE, AKAIBE D *et al.* – Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection. *J Infect Dis*, 1999, **179** (Suppl 1), S155-S163.
9. MORELL V – Chimpanzee outbreak heats up search for Ebola origin. *Science*, 1995, **268**, 974-975.
10. MORVAN JM, DEUBEL V, GOUNON P, NAKOUNE E, BARRIERE P *et al.* – Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes Infect*, 1999, **1**, 1193-1201.
11. SWANEPOEL R, LEMAN PA, BURT FJ, ZACHARIADES NA, BRAACK LE *et al.* – Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis*, 1996, **2**, 321-325.