

Effet de la température fièvre sur l'infection des Filovirus

Floriana Pondi Maswa

**Thèse soumise dans le cadre des exigences du programme de
Maîtrise en Microbiologie et Immunologie**

**Département de Biochimie, Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine
Université d'Ottawa**

© Floriana Pondi Maswa, Ottawa, Canada, 2024

Table de matière

Résumé.....	IV
Remerciements.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VIII
1. Introduction.....	1
1.1 Historique et famille des Filovirus.....	1
1.2 Caractéristique et structure du virus Ébola.....	8
1.3 Biogénèse de la glycoprotéine (GP).....	13
1.4 Entrée du virus dans les cellules hôtes et réplication.....	18
1.5. Réservoirs des Filovirus.....	23
1.6 Cycle de transmission virale.....	24
1.7 La maladie à Filovirus et Pathologie.....	25
1.8. Effet de la température.....	28
2. Hypothèse et objectifs.....	32
3. Matériels et méthodes.....	33
3.1 Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	33
3.2 Clonage.....	33
3.3 Production et purification des particules pseudo-virales (VLP).....	34
3.4 Cytométrie de flux.....	35
3.5 Tests d'entrée des particules pseudo-virales (VLP).....	36
3.6 Infection pour vérification de la thermostabilité des filovirus.....	36
3.7 Infection de température fièvre.....	37
3.8 Internalisation du Dextran.....	38
3.9 Analyse statistique.....	39
4. Résultats.....	40
4.1 Vérification de la thermostabilité d'EBOV et MARV par augmentation graduelle de la température.....	40
4.2 Vérification de l'activité de la macropinocytose à température fièvre dans les Ht1080, Huh 7.5 et dans les macrophages (THP-1 différenciés).....	46
4.3 Effet de la température fièvre par infection des cellules HT1080, Huh 7.5 et dans les macrophages (THP-1 différenciés) à 37°C et à 39°C.....	54
5. Discussion.....	62
1. Le virus Ébola et les autres filovirus sont stables à température élevée.....	62
a. La glycosylation.....	63

b. Les ponts disulfures	64
2. Fièvre et internalisation	65
a. Réorganisation du cytosquelette d'actine	66
b. Modulation de la fluidité membranaire	66
3. Effet de l'environnement de fièvre sur les virus Ébola et Marburg.....	66
7. Directions futures	69
8. Conclusion	70
Information supplémentaire	71

Résumé

Le virus Ébola (EBOV) est un virus à ARN de la famille des Filoviridae. Il est l'agent causal de la maladie à virus Ébola (MVE), une maladie hautement mortelle caractérisée par des fièvres hémorragiques pouvant atteindre des taux de mortalité allant jusqu'à 90%. L'épidémie la plus remarquable a eu lieu en Afrique de l'Ouest de 2014 à 2016 ayant touché plus de 28000 personnes principalement en Guinée, au Libéria et en Sierra Leone. Elle compta un total de 11 325 décès confirmés selon les données de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et du Centre pour contrôle et prévention des maladies (CDC) des États-Unis. La famille des filovirus compte un vaste éventail d'agents pathogènes dont les virus Ébola Zaïre, Ébola Soudan, Ébola Reston, Ébola Taï Forest ainsi que les virus Marburg, Lloivu, Bombali et Mengla. Au-delà d'avoir touché l'Afrique, les filovirus sont répandus dans d'autres continents du monde dont l'Europe et l'Asie, d'où il est très important de les étudier.

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet de la température sur les filovirus et nous rapportons que le virus Ébola ainsi que les autres filovirus Ébola sont thermostable à l'exception du virus Taï Forest et que le virus Marburg est moins thermostable que le virus Ébola. Nous rapportons également que la fièvre n'a pas d'effet négatif sur le virus Ébola mais elle inhibe légèrement l'internalisation du virus Marburg.

Cette étude est importante afin de connaître davantage les filovirus pour aider dans la compréhension du virus ainsi que pour développer des solutions thérapeutiques pour les potentielles épidémies qui pourraient éclater.

Remerciements

Premièrement, je rends grâce à Dieu qui me guide pas à pas et sans qui tout ce que je suis n'aurait point existé. Je le remercie d'être continuellement avec moi, d'avoir rendu toutes choses possibles et de m'avoir accordé la grâce d'arriver jusqu'ici.

Je tiens deuxièmement à honorer ma superviseure, Dre Marceline Côté, qui a été un réel pilier pour moi depuis maintenant plus de deux ans. Marceline, je te remercie du fond du cœur de m'avoir accordé l'opportunité de travailler dans ton laboratoire pour mon projet honorifique ainsi que pour ma maîtrise. Tu as été une aide sans pareil, bien au-delà des quatre coins du laboratoire tu as toujours été là et sans toi ma réussite n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir toujours encouragée et d'avoir cru en moi, même lorsque c'était difficile. Je t'en serai toujours reconnaissante.

Mes pensées se tournent également vers mes parents, mon père, Floribert Maswa qui a été un réel soutien et spécialement ma mère, Dre Edith Nkwembe qui, pour moi, est une réelle source d'inspiration et de motivation, un modèle depuis toute petite et je reconnais que sans elle je ne serais pas qui je suis aujourd'hui. Maman, merci pour la vision, le soutien et la motivation continue.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire M Côté dont Brett Vhokal, qui a été une aide sans pareil, Yuxia Bo qui m'a formée dans plusieurs techniques de laboratoire nécessaires à mon projet, Ardeshir Ariana et Geneviève Laroche qui ont également contribué à ma formation technique au laboratoire et sans oublier Redeat Daniels et Agnitha Xavier qui ont été un véritable support pour mon apprentissage et mon intégration dans le laboratoire. Je tiens également à mentionner Osama Mahdi du laboratoire du Dr. Subash Sad qui m'a beaucoup aidé avec les cellules des macrophages THP-1.

Je remercie également tous mes amis ainsi que ma famille d'avoir toujours été présents, de m'avoir continuellement encouragée lorsque j'en avais le plus besoin et d'avoir été un réel support pour me pousser à l'excellence et la réussite. Du fond du cœur je remercie toutes ces personnes sans qui je ne serais pas arrivée à cette merveilleuse réussite.

Liste des abréviations

NPC1	Niemann-Pick C1
Blam	Bêta-Lactamase
VLP	Virale-Like Particles (Particules pseudo-virale)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PSB	Solution tampon phosphate-saline
FBS	Sérum de veau fœtal
EBOV	Virus Ébola Zaïre
MARV	Virus Marburg
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
RESTV	Virus Reston
SUDV	Virus Soudan
TAFV	Virus Taï Forest
LLOV	Virus Lloviu
BOMV	Virus Bombali
MLAV	Virus Mengla
BDBV	Virus Bundibugyo
GP	Glycoprotéine
VP40	Protéine virale 40
VP35	Protéine virale 35
VP24	Protéine virale 24
L	ARN Polymérase
NP	Nucléoprotéine virale

VP30	Protéine virale 30
ARN	Acide Ribonucléique
ORF	Cadre de Lecture Ouvert (Open Reading Frame)
sGP	Glycoprotéine sécrétée
ssGP	Petite Glycoprotéine sécrétée
Cys53	Cystéine 53
Cys 609	Cystéine 609
TACE	Enzyme de conversion du facteur de nécrose tumorale-alpha
TM	Domaine Transmembranaire
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Rab 5	Protéine Rab-5 apparentée à Ras
Rab 7	Protéine Rab-7 apparentée à Ras
LDL	Lipoprotéine de basse densité
SARS-CoV-2	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2
IL-6	Interleukine-6
IL-1B	Interleukine-1 bêta
IL-8	Interleukine-8
RPMI	Milieu de culture Institut Mémorial de Roswell Park
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
EcoR1	Escherichia coli RY13 Restriction Enzyme 1
Nhe1	Isoschizomère HEI de l'endonucléase I de New England Biolabs
DMEM	Milieu de culture modifié d'aigle de Dulbecco
BSL-4	Niveau de Biosécurité 4

Liste des figures

Figure 1. Localisation des principales apparitions ou épidémies à ébolavirus allant des découvertes en 1976 jusqu'en 2008.

Figure 2. Arbre phylogénétique des filovirus.

Figure 3. ARN génomique simple brin de polarité négative des filovirus.

Figure 4. Morphologie et structure des Filovirus.

Figure 5. Transcription et polymorphisme de la glycoprotéine du virus Ébola.

Figure 6. Processus d'entrée des filovirus dans les cellules cibles.

Figure 7. Effet de l'augmentation graduelle de la température sur la stabilité des virus EBOV et MARV.

Figure 8. Effet de l'augmentation graduelle de la température sur la stabilité des Filovirus.

Figure 9. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules Ht1080 à 37°C et à 39°C.

Figure 10. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules Huh7.5 à 37°C et à 39°C.

Figure 11. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules THP-1 à 37°C et à 39°C.

Figure 12. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules Ht1080.

Figure 13. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules Huh 7.5.

Figure 14. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules THP-1.

1. Introduction

1.1 Historique et famille des Filovirus

La famille des Filovirus regroupe un ensemble de virus caractérisés par leur forme filamenteuse et leur capacité à provoquer des fièvres hémorragiques chez plusieurs espèces. En 1967, le virus Marburg a été isolé pour la première fois, marquant ainsi la découverte initiale d'un filovirus¹. Cette découverte est intervenue à la suite d'une enquête menée lors d'une épidémie de fièvre hémorragique ayant touché des travailleurs d'un laboratoire de fabrication et de contrôle de Sérum et de vaccins à Marburg, en Allemagne^{1,7}. Des études épidémiologiques à la suite du début de l'épidémie ont également révélé que la source de contamination virale directe du virus était des singes verts *Cercopithecus aethiops* importés d'Ouganda, en Afrique¹. Ces singes étaient principalement utilisés pour la production de cultures de cellules rénales, qui étaient nécessaires à la propagation des souches vaccinales. Certains de ces singes qui avaient été envoyés à Francfort, en Allemagne et à Belgrade, en Yougoslavie, furent euthanasiés et une procédure de quarantaine avait été mise en place ayant permis de maîtriser l'épidémie avec seulement 31 cas et une mortalité de 23%^{1,3,7}.

En 1976, la communauté internationale a été à nouveau surprise par la découverte d'un autre filovirus, encore plus mortel et virulent : le virus Ébola^{2,5}. Bien qu'il partage des similitudes morphologiques avec le virus Marburg, le virus Ébola est génétiquement et sérologiquement distinct de ce dernier². Deux différentes espèces du virus Ébola ont été découvertes simultanément en Afrique centrale et qui étaient responsables d'épidémies meurtrières de fièvre hémorragique⁵. Il s'agit de la souche Ébola Zaïre qui circulait au Nord-Ouest de la République Démocratique du Congo (RDC), principalement au village de Yambuku, près de la rivière Ébola d'où le nom du virus^{3,5} (Figure 1). La deuxième souche est

le virus Ébola Soudan, qui a causé une épidémie au sud du Soudan, proche de la frontière avec la RDC (Figure 1). Elle affecta principalement les villes de Nzara et Maridi^{4,12,13,14}. Un fait intéressant était que le virus Ébola Zaïre est plus mortel que le virus Ébola Soudan avec un taux de mortalité de 88% contre 53% pour le virus Ébola Soudan¹⁵. Depuis lors, plusieurs flambées d'épidémies ont eu lieu et plusieurs autres espèces de filovirus ont été découvertes.

Après la découverte du virus Marburg, Ébola Zaïre et Soudan, il y a eu en 1989, une autre souche d'Ébola virus, le virus Reston (RESTV), qui a été détectée en Virginie, aux États-Unis chez des macaques crabiers en provenance des Philippines^{16,17} (Figure 1). Ce virus a créé des fièvres hémorragiques chez les singes et a entraîné un taux de mortalité de 82%¹⁶. Mais l'une des particularités de ce virus est qu'il est non pathogène chez l'humain, c'est-à-dire qu'il a la capacité d'infecter et d'être transmis à l'homme car, des anticorps IgG anti-RESTV ont été retrouvés chez des humains ayant été en contact avec les singes malades¹⁸. Mais toutes personnes infectées par ce virus ont présenté une infection asymptomatique et il n'existe aucune donnée sur une transmission interhumaine de ce virus¹⁸.

En 1994, une autre souche d'Ébola virus a été découverte, il s'agit de la souche Ébola Forêt de Taï, initialement appelée Ébola Côte d'Ivoire^{19,20}. Il a été découvert par des ethnologues qui ont mené des enquêtes sur le comportement inhabituel d'une communauté de chimpanzés qui mouraient sans précédent dans la Forêt de Taï en Côte d'Ivoire¹⁹ (Figure 1).

En 2007, on découvre à nouveau une nouvelle souche virale qui est le Virus Ébola Bundibugyo (BDBV)²¹. Celui-ci a causé une épidémie dans le district de Bundibugyo en Ouganda qui a compté 93 cas putatifs et il possède un taux de mortalité de 25%²¹(Figure 1). Il est moins virulent que le virus EBOV et SUDV.

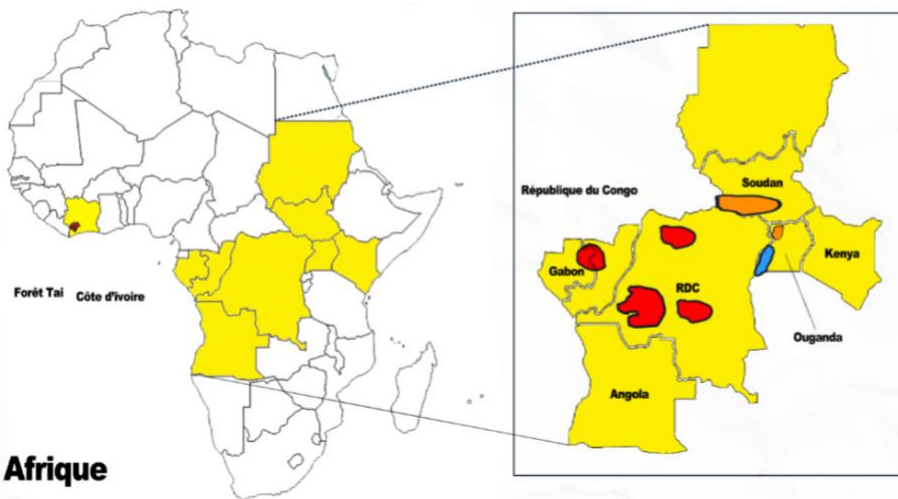
En 2002, une importante mortalité des chauves-souris frugivores dans des grottes au sud de l'Europe a conduit à la découverte d'un tout nouveau membre de la famille des filovirus qui ne relève ni du genre Ébolavirus ou Marburgvirus²³. Il s'agit du virus Lloviu de

la classe des Cuevavirus. Ce virus est génétiquement distinct des autres Ébolavirus et du virus Marburg²². Il constitue le premier filovirus détecté en Europe sans avoir été importé d'une zone endémique d'Afrique²³. Un élément notable concernant ce virus est que contrairement au Ébolavirus et au Marburgvirus dont la circulation chez les chauves-souris semble surtout asymptomatique potentiellement dû à la co-évolution dans leurs relations hôte-parasite, le virus Lloviu semble être pathogène chez les chauves-souris²².

Des scientifiques ont récemment signalé la découverte d'un autre membre de la famille des filovirus extrait des chauves-souris frugivores en Chine. Il s'agit du virus Mengla (MLAV) de la classe des Dianlovirus. Il est phylogénétiquement distinct et possède 32 à 54% de similitude de séquence nucléotidique avec le génome des autres filovirus^{24,25}.

Pour clôturer avec la famille des filovirus, le tout plus récemment découvert est le virus Bombali (BOMV)²⁶. Il a été identifié en 2018 chez des chauves-souris frugivores dans le cadre d'une étude menée en Sierra Leone. Ce dernier est génétiquement distinct des ébolavirus et des marburgvirus^{26,27}.

Au total, la famille des filovirus compte 4 genres ou classes qui infectent les mammifères: le genre Ébolavirus qui possède six souches qui sont les virus Zaïre (EBOV), Soudan (SUDV), Bundibugyo (BDBV), Reston (RESTV), Taï Forest (TAFV) et Bombali (BOMV), le genre Marburgvirus qui comprend le virus Marburg (MARV) et le virus Ravn (RAVV), le genre Cuevavirus avec le virus Lloviu (LLOV), et le genre Dianlovirus qui est la plus récente et comprend le virus Mengla (MLAV)⁷ (Figure 2). Il y a également le genre Striavirus et Thamnovirus, qui comporte respectivement les virus Xilang et Huangjiao. Ce sont des virus très peu connus et très peu étudiés, dont l'ARN génomique a été détecté chez des poissons¹²³.



Afrique



Italie



Philippines



USA



Figure 1. Localisation des principales apparitions ou épidémies à ébolavirus allant des découvertes en 1976 jusqu'en 2008. A) Localisation des premières épidémies des filovirus de la classe des *Ébolavirus* en Afrique avec les virus Ébola Zaïre (EBOV), Ébola Soudan (SUDV), Ébola Bundibugyo (BDBV), Ébola Taï Forest (TAFV). B) localisation des épidémies à Ébola Reston (RESTV) chez les macaques crabiers aux États-Unis d'Amérique et en Italie (C) par importation des singes infectés provenant des Philippines. (*Adaptée de Feldmann H, Geisbert TW et al¹⁰⁵*).

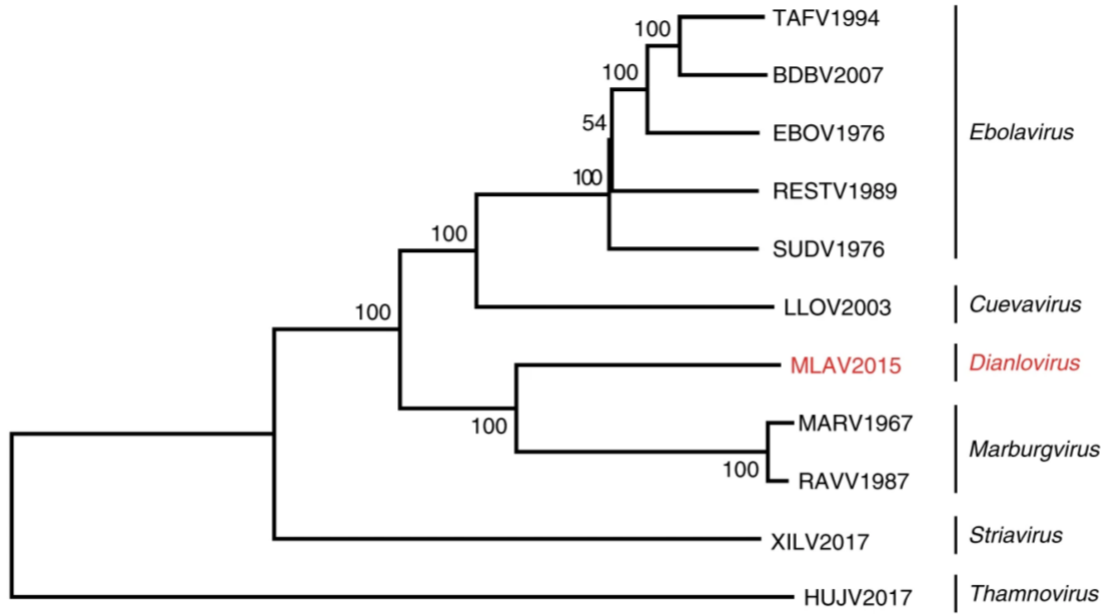


Figure 2. Arbre phylogénétique des filovirus. La famille des filovirus est composée de quatre genres existant chez les mammifères. Il y a le genre *Ébolavirus* qui est composée du virus Ébola Zaïre (EBOV), Ébola Soudan (SUDV), Ébola Bundibungyo (BDBV), Ébola Reston (RESTV). Le genre *Cuevavirus* qui est composée du virus Lloivu (LLOV) qui a beaucoup de similitudes avec les Ébolavirus. Le genre Dianlovirus qui est composée du virus Mengla (MLAV) qui a été récemment découvert. Le genre *Marburgvirus* qui est génétiquement différente des Ébolavirus est composée des virus Marburg (MARV) et Ravn (RAVV). Les genres Striavirus et Thamnovirus qui sont des genres de filovirus détectés chez les amphibiens. (D'après Yang, X.L., Tan, C.W., Anderson, D.E. et al.²⁴)

1.2 Caractéristique et structure du virus Ébola

Le virus Ébola (EBOV) est un virus à ARN simple brin non segmenté de polarité négative. Il a une morphologie filamenteuse caractérisée par un virion de 80 nm de diamètre et une longueur allant de quelques centaines de nanomètres⁷⁶. Le virus possède un génome de 19kb avec sept cadres de lecture ouverts codant pour sept protéines qui sont les protéines NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 et L^{76,28} (Figure 3). Il a un virion enveloppé, donc une nucléocapside recouverte d'une membrane lipidique acquise lors du bourgeonnement du nouveau virion à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte^{3,28} (Figure 4).

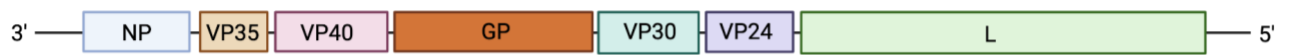
Sur le côté interne de l'enveloppe virale, les protéines VP40 et VP24 constituent la matrice hélicoïdale et protègent la nucléocapside virale^{77,78}. La VP40 est la protéine de matrice du virus Ébola et la principale du virion⁷⁸. Elle joue un rôle important dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus⁵. Elle active le processus d'emballage de la nucléocapside virale par le biais de la membrane de l'hôte pour former un nouveau virion infectieux^{5,31}.

La nucléocapside hélicoïdale du virus est constituée de la nucléoprotéine (NP) et de la protéine VP30 qui interagit avec l'ARN et active la transcription⁷⁸. Le complexe ribonucléoprotéique est constitué de l'ARN génomique virale monocaténaire encapsidé par la nucléocapside virale et se lie à l'ARN polymérase virale ainsi qu'à la protéine VP35 qui contrôle l'ARN polymérase virale L^{31,78} (Figure 4).

Sur son côté externe, l'enveloppe virale contient de la phosphatidylsérine qui est un lipide impliqué dans l'entrée du virus dans les cellules hôtes⁷⁸. Elle contient aussi des molécules de glycoprotéine (GP) qui sont composées en trimères d'hétérodimères contenant chacun deux sous-unités GP1 et GP2²⁸. Cette GP permet l'interaction du virus avec les cellules cibles et détermine le tropisme viral⁷⁶.

A. Génome des Marburgvirus

Génome à ARN (-)



B. Génome des Ébolavirus

Génome à ARN (-)

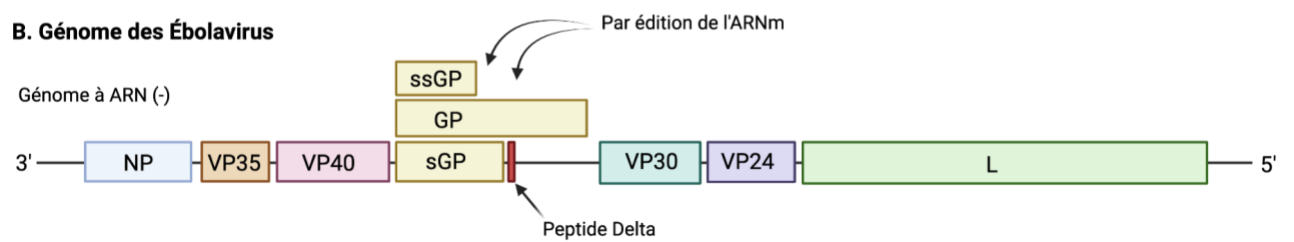


Figure 3. ARN génomique simple brin de polarité négative des filovirus. Le génome des filovirus est composé d'un ARN simple brin linéaire de polarité négative d'une longueur de 19kb composé de 7 gènes. A) représentation du génome de MARV ayant 7 cadres de lecture ouverts codant pour 7 protéines virales qui sont la NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 et L. B) représentation du génome d'EBOV dont le gène de la GP possède deux cadres de lecture ouverts qui se chevauchent et dont le bégaiement co-transcriptionnel de l'ARN Polymérase sur le site d'édition entraîne la formation de deux glycoprotéines supplémentaires. Le virus Ébola possède au total trois glycoprotéines qui sont la GP, la sGP et la ssGP en plus des six autres protéines similaires à celles de MARV. La sGP subit un clivage protéolytique par une furine laissant place à un petit fragment non structural appelé peptide delta (Δ -peptide). (*Inspirée de Viralzone*⁷⁹), image créée à l'aide de BioRender.

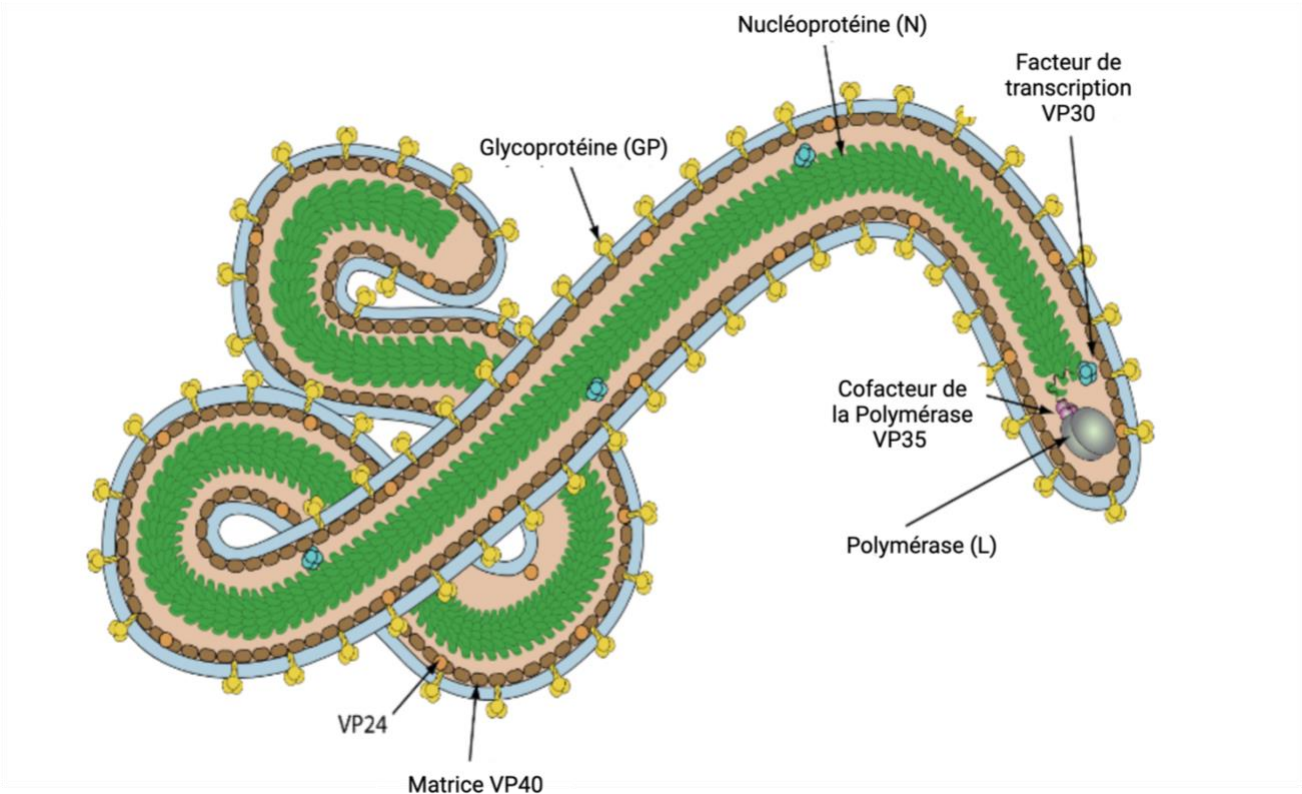


Figure 4. Morphologie et structure des Filovirus. Les filovirus ont une morphologie filamenteuse avec un virion enveloppé d'une membrane lipidique et recouvert des glycoprotéines virales trimériques entourant la matrice qui est constituée de VP40 et de VP24. Cette matrice recouvre la nucléocapside hélicoïdale constituée de la NP et de la VP30 et protège l'ARN monocaténaire virale qui est relié à la polymérase virale (L) et à la protéine VP35. (D'après *Viralzone*)⁷⁹.

1.3 Biogénèse de la glycoprotéine (GP)

La glycoprotéine (GP) est une protéine cruciale à l'entrée des filovirus dans les cellules hôtes. C'est la seule protéine virale exprimée à la surface du virion, elle est essentielle à la fixation aux cellules hôtes et à la catalyse de la fusion membranaire²⁸.

La GP est codée par le quatrième gène du génome et particulièrement pour les virus Ebola seulement, ce gène possède 2 cadres de lecture ouverts au lieu d'un seul cadre de lecture unique de 2043 nucléotides comme chez le virus Marburg (MARV)^{28,29}. Ces deux cadres de lecture ouverts se chevauchent partiellement et leurs variations d'expression par l'ARN polymérase vont conduire à la synthèse de trois différentes GP qui sont la GP finale, la GP sécrétée (sGP) et la petite glycoprotéine sécrétée (ssGP)^{28,29} (Figure 5).

Le cadre de lecture ouverte primaire code pour la glycoprotéine sécrétée (sGP) qui est une protéine soluble, non structurale de 364 acides aminés²⁸. La sGP est synthétisée à partir de la pré-sGP, son précurseur, qui subit un clivage protéolytique post-traductionnel par une protéase Furine pour donner le sGP mature et une petite protéine sécrétée non structurale appelée Δ -peptide²⁸ (Figure 5). Les monomères de sGP vont s'assembler par des ponts disulfures pour former un homodimère qui sera sécrété dans la circulation générale^{28,29}. La sGP est la principale GP synthétisée, elle correspond à environ 70% des GP synthétisées^{28,3}. Le rôle de la sGP dans la pathogenèse du virus n'est pas encore entièrement connu^{28,29}. Cependant, de grandes quantités de sGP ont été détectées dans le sang des patients infectés par le virus²⁹. Aussi, les anticorps qui étaient présents dans les sérums des personnes guéris de la maladie à virus Ebola semblent mieux reconnaître la sGP plutôt que la GP^{28,80}. Ceci indique que la sGP pourrait jouer un rôle dans l'évasion de la réponse immunitaire humorale en absorbant les anticorps neutralisants, empêchant l'élimination des virions infectieux²⁸. La sGP pourrait également jouer un rôle dans la diminution de la cytotoxicité engendrée par la

GP trimérique finale²⁸. D'autres études suggèrent que la sGP joue un rôle anti-inflammatoire en induisant la restauration de la fonction de la barrière endothéliale^{81,28}.

La glycoprotéine trimérique finale (GP) est la seule exprimée à la surface du virion et elle correspond à environ 25% des GP synthétisées²⁸. La synthèse de celle-ci se fait par un bégaiement de l'ARN polymérase sur le site d'édition lors de la transcription, ce qui va ajouter un nucléotide d'adénosine supplémentaire sur l'ARNm^{28,29}. Ceci va décaler le cadre de lecture pour fusionner les deux cadres de lectures ORF I et ORF II. Ce changement de cadre de lecture va engendrer la production de la GP virale transmembranaire de 676 acides aminés qui est ancrée dans l'enveloppe virale appelée pré-GP²⁹ (Figure 5).

Plusieurs monomères de pré-GP vont s'assembler au niveau du réticulum endoplasmique pour former un trimère. Ce précurseur trimérique va être clivé par une protéase furine au niveau de l'appareil de Golgi pour former deux sous-unités, GP1 extracellulaire et GP2 transmembranaires qui restent associées via un pont disulfure entre la Cys53 de GP1 et Cys609 de GP2^{28,30}. Cet hétérodimère s'assemble en un trimère d'hétérodimère de 450 acides aminés qui sera à la surface des virions naissants^{28,29}.

La sous-unité GP1 est responsable de l'attachement du virus à la cellule cible et contient un domaine de liaison au récepteur intracellulaire spécifique ainsi qu'une région fortement glycosylée appelée domaine de type mucine²⁹.

La sous-unité GP2 est responsable de la fusion des membranes virales et des cellules hôtes. Elle contient la boucle hydrophobe de fusion qui va se relâcher lors de la liaison de GP1 à son récepteur, ce qui va permettre la fusion de la membrane virale avec elle de la cellule hôte³¹. Avant cette interaction, la base de GP1 forme une pince qui stabilise la boucle de fusion de GP2 dans une conformation de pré-fusion, pour empêcher GP2 de jaillir prématurément³¹.

La glycoprotéine GP1,2 est très importante et capitale dans l'infectivité du virus, elle joue également un rôle très important dans la cytotoxicité du virus⁸². Étant la seule protéine de l'enveloppe virale, elle s'est révélée être une protéine fortement immunogène. Elle joue également un rôle dans la perturbation de l'activation du système immunitaire et de reconnaissance d'antigène^{83,84}.

L'ajout de deux adénosines ou la suppression d'une adénosine lors du bégaiement transcriptionnel par l'ARN polymérase engendre l'expression d'un troisième produit appelé la petite glycoprotéine sécrétée **ssGP**^{28,29}. Sa production est très minime et n'arrive que dans 5% des transcrits²⁸. Cette petite glycoprotéine sécrétée **ssGP** est constituée de 298 acides aminés. Son rôle dans la pathogenèse du virus n'est pas encore connu²⁸.

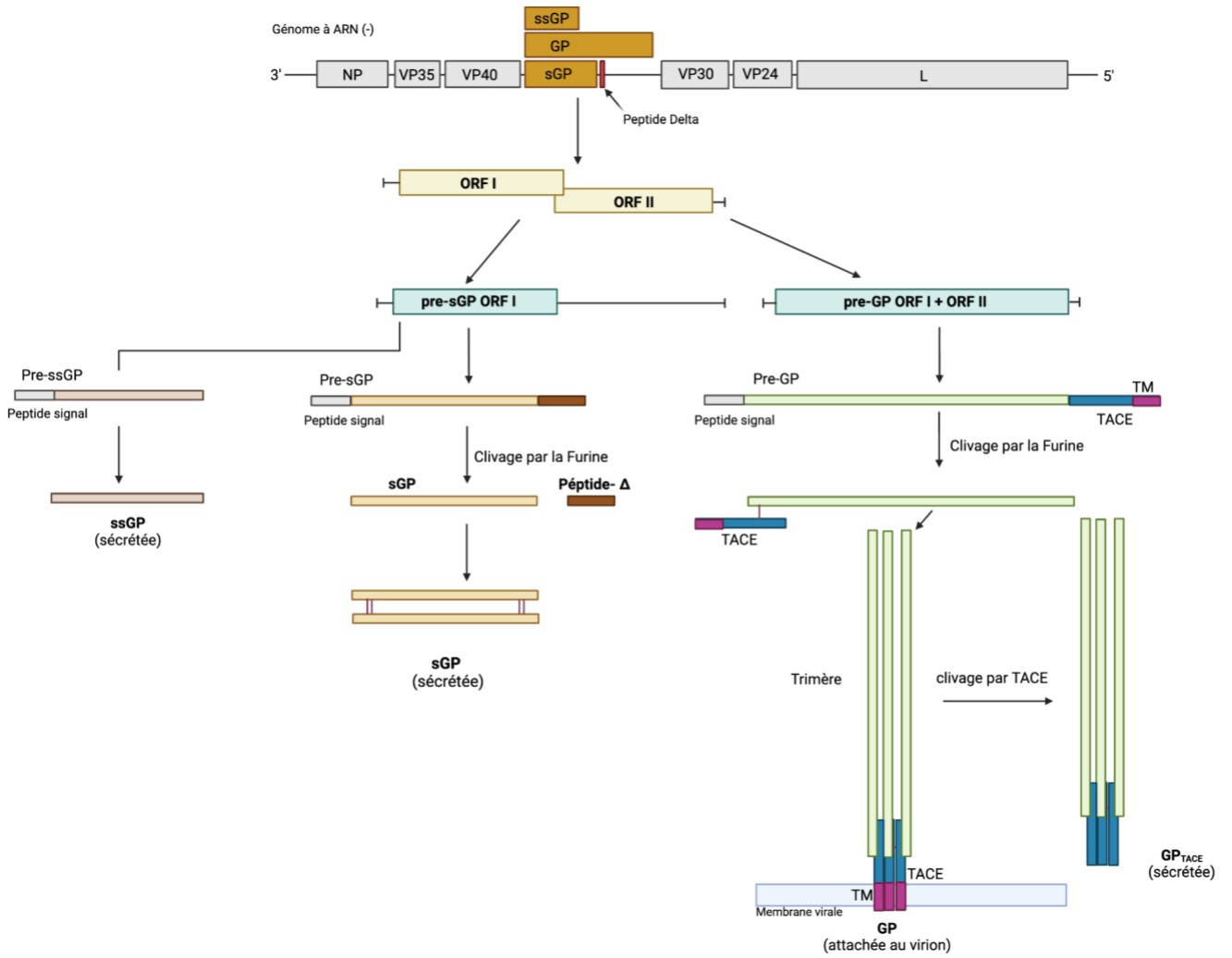


Figure 5. Transcription et polymorphisme de la glycoprotéine du virus Ébola. Le gène de la glycoprotéine chez le virus Ébola possède deux cadres de lecture ouverts qui se chevauchent partiellement. Le bégaiement co-transcriptionnel du gène GP entraîne la formation de deux glycoprotéines supplémentaires. Le cadre de lecture ouverte primaire code pour la sGP qui est la principale du virus Ébola dont le clivage protéolytique de la pré-sGP permet la formation de la sGP mature et d'un petit fragment non structurel, appelé Δ -peptide. La transcription des deux cadres de lecture au complet produit la GP trimérique qui est attachée au virion. Le clivage protéolytique de son précurseur la pré-GP par la furine entraîne la formation des deux sous-unités ; GP1 et GP2 qui demeure lié par des ponts disulfures. Les hétérodimères de GP1 et GP2 trimérisent pour donner le produit final qui va s'attacher à la membrane virale pour être à la surface du virus. L'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) peut aussi cliver la GP de l'enveloppe virale au niveau du site proximal au domaine transmembranaire de la GP2 pour libérer une GP trimère soluble. Le bégaiement de la polymérase, L, entraîne également la formation de la petite glycoprotéine sécrétée, la ssGP qui forme un monomère en solution. TM: domaine transmembranaire. (*Image inspirée de Lee JE, Sapphire EO et al.*²⁸) Image créée avec BioRender.

1.4 Entrée du virus dans les cellules hôtes et réplication

a. Adhésion cellulaire

L'entrée du virus dans les cellules lors de l'infection est médiée par la GP et se fait premièrement par une interaction du virus avec les facteurs d'attachement⁷⁶. Le virus va se lier à la cellule cible via deux types d'interaction. La première est l'interaction des glycanes de la GP avec les lectines de type C⁸⁵. La deuxième est l'interaction des phosphatidylsérines de l'enveloppe virale avec différents récepteurs tels que les récepteurs à la phosphatidylsérine⁸⁶.

b. Internalisation

Cette interaction avec les facteurs d'attachement va engendrer l'internalisation du virion par macropinocytose qui est un processus non sélectif d'engloutissement³² (Figure 6). La macropinocytose est la voie principale d'internalisation du virus avec une formation de vésicule de 200 à 10 000 nm^{32,33}. La macropinocytose est un processus d'internalisation qui nécessite d'être stimulé par la cellule cible³³. Cette stimulation se fait par l'activation de la voie de signalisation PI3 kinase par mobilisation du cytosquelette d'actine^{32,33,34}.

c. Trafic intracellulaire

Après internalisation, la particule filovirale va transiter à travers le système de trafic vésiculaire de la cellule pour être acheminée au compartiment cellulaire où la GP va être activée³². Ce voyage endosomal va nécessiter la présence des petites protéines GTPases, Rab5 et Rab7 qui vont réguler le transport vésiculaire⁴⁰. En résumé, les virions d'Ébola s'introduisent dans les endosomes hâtifs et circulent vers l'endosome tardif/lysosome tardif dépendant de Rab5 et Rab7^{39,40}.

d. Activation de la glycoprotéine virale

La glycoprotéine dans son état précurseur GP₀ est un trimère et doit subir un clivage par des protéases de type furine pour générer une trimère hétérodimère de GP₁ et GP₂ qui est la forme active à la surface du virus^{35,41}. Lors de l'entrée, la GP₁ est clivée dans les

endosomes par les cathepsines B et L³⁵. Le clivage permet d'exposer le domaine de liaison au récepteur de la GP1. Elle est alors capable d'interagir avec le récepteur viral, la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1), se trouvant dans les endosomes tardifs/ lysosomes^{42,76} (Figure 6).

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

La liaison de GP1 à NPC1, dont le rôle physiologique est d'assurer le transport du cholestérol dérivé des LDL des lysosomes vers les compartiments intracellulaires, est essentielle pour la fusion membranaire des filovirus à celle de la cellule cible⁴².

L'activation de la GP1 par sa liaison à NPC1 va faire en sorte que la sous-unité GP2 ne soit plus restreinte, de sorte qu'elle expose sa boucle hydrophobe qui est une région riche en acides aminés hydrophobes^{87,43}. Cette boucle hydrophobe est essentielle pour l'interaction avec la membrane cellulaire de la cellule cible⁸⁷. Une fois exposée, la boucle hydrophobe de la GP2 s'insère dans la membrane cellulaire de la cellule cible pour créer un point d'ancrage pour la GP2 et facilite son interaction avec la membrane cellulaire³¹. Par la suite, la GP2 subit un changement conformationnel majeur en se repliant dans une conformation à six hélices de façon à permettre la fusion des membranes tout en libérant la nucléocapside virale dans le cytoplasme³¹. Ce changement de conformation de la GP2 est celui qui permet de libérer l'énergie nécessaire à la fusion des membranes³¹.

f. Transcription, réplication et l'assemblage du virion

La fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale/lysosomale, va conduire à la libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme, entraînant la transcription et la réplication du génome viral, suivie de l'assemblage et du bourgeonnement de la descendance virale³¹ (Figure 6). La transcription est médiée par le complexe VP30-VP35-L⁸⁸. La protéine L, l'ARN polymérase ARN dépendante, synthétise un ARN messenger de polarité positive qui va être traduit en protéines virales⁸⁸. La protéine VP40 a un rôle majeur dans l'assemblage et la libération du virus^{89,90}.

Elle va s'accumuler à la face interne de la membrane plasmique de la cellule hôte pour recruter les autres composants viraux nécessaires à la formation de la particule virale^{89,90}. La VP40 interagit alors avec les composants de la nucléocapside virale composée de l'ARN viral et des protéines nucléaires, ainsi qu'avec les glycoprotéines de surface afin de favoriser l'assemblage des nouveaux virus⁹⁰. Au moment de l'assemblage L va être associé au complexe ribonucléoprotéique à l'aide de son interaction avec la VP35⁸⁹. La nucléoprotéine va par la suite servir de noyau pour l'assemblage de la nucléocapside tout en nécessitant la VP35 et la VP24^{31,89}.

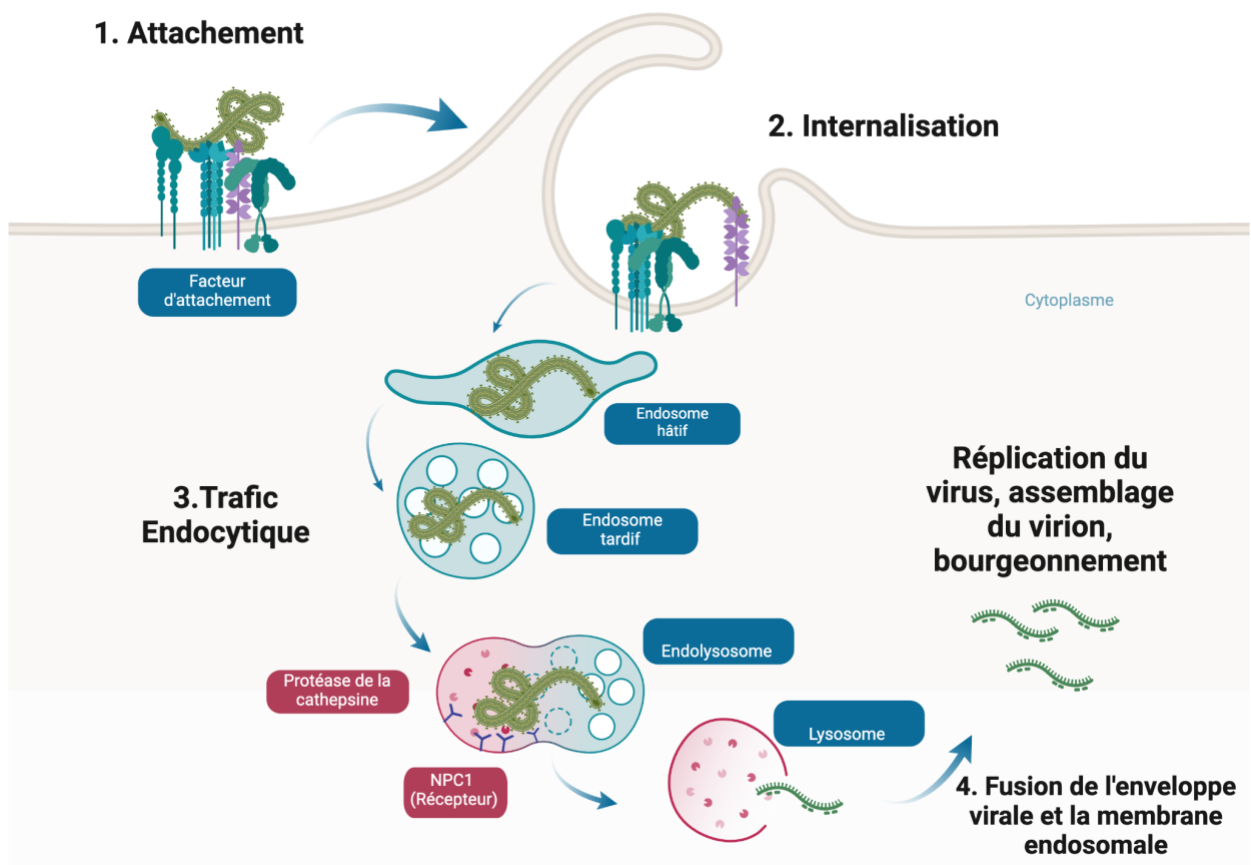


Figure 6. Processus d'entrée des filovirus dans les cellules cibles. Le processus d'entrée d'EBOV commence par l'attachement spécifique du virus aux facteurs d'attachement qui sont des récepteurs cellulaires à la surface des cellules hôtes. Ensuite le virus est internalisé dans la cellule hôte par macropinocytose et va être ensuite s'introduire dans un endosome hâtif puis tardifs jusqu'à arriver dans l'endolysosome où la GP1 est clivée par des cathepsines, exposant le domaine de liaison au récepteur de la GP1. La GP1 va par la suite se lier au récepteur NPC1, rendant la GP2 opérationnelle pour effectuer son changement de conformation qui catalyse la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule hôte. Cette fusion membranaire va conduire à la libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme, ce qui va entraîner la transcription et la réplication du génome viral suivie de l'assemblage et du bourgeonnement de la descendance virale. *(Image inspirée de Corina M.Stewart et créée avec BioRender)*

1.5. Réservoirs des Filovirus

Plusieurs études mentionnent les chauves-souris frugivores de la famille des *Pteropodidae* comme réserves naturelles des filovirus. Particulièrement pour le virus Marburg dont des fragments du génome viral ainsi que des anticorps ont été retrouvés dans les sérums de chauves-souris frugivores égyptiennes de l'espèce *Rousette aegyptiacus*⁴⁴. De plus, certains chercheurs ont isolé des anticorps spécifiques IgG dirigés contre le virus Ébola ainsi que des fragments de génome viral dans le foie et la rate de trois espèces de chauves-souris frugivores^{44,45}. Contrairement aux autres espèces, les chauves-souris ne présentent pas ou peu de symptômes face à l'infection aux filovirus. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les chauves-souris ont co-évolué avec ces virus depuis des millions d'années⁸.

Cette co-évolution a probablement conduit les chauves-souris à développer des adaptations évolutives. Ce qui leur a permis de tolérer la présence du virus sans pour autant présenter les symptômes sévères de la maladie^{94,46}. Les chauves-souris sont connues pour être porteuses de nombreux virus tels que les Paramyxovirus, les Astrovirus ou encore les Rhabdovirus sans développer les symptômes des maladies^{44,46}. Cette adaptation peut également être expliquée par leur système immunitaire robuste et unique, leur ayant permis de développer une réponse immunitaire particulière capable de contrôler l'infection et de limiter les dommages tissulaires causés par ces virus⁴⁸. Aussi, les chauves-souris possèdent des caractéristiques physiologiques uniques telles que leur température corporelle élevée, leur métabolisme rapide, leur longévité qui pourraient avoir une incidence sur leur tolérance face aux infections virales des filovirus⁹².

Un fait intéressant avec les chauves-souris c'est qu'au moment du vol, leur température corporelle s'élève au-dessus de 40°C, tandis que pendant la torpeur quotidienne, elle est nettement inférieure, atteignant dans certains cas 10°C^{91,92}. Il s'agit d'une méthode

efficace de conservation de l'énergie qui est particulièrement utile aux chauves-souris, car le vol a un coût énergétique élevé⁹². La plupart des chauves-souris durant la journée, diminuent leur activité et entrent en torpeur pour pouvoir chasser à l'aube lorsque la température extérieure est basse et que la nourriture est plus abondante⁹². Tout ceci pourrait avoir une corrélation avec la thermostabilité des filovirus dont ils sont les réservoirs naturels.

1.6 Cycle de transmission virale

Comme cycle de transmission virale, les chauves-souris vont créer une épizootie en infectant d'autres animaux tels que les primates non-humains⁸. Le virus est ensuite transmis à l'homme soit par des contacts étroits avec les liquides biologiques de ces animaux, leurs viandes ou par les chauves-souris elles-mêmes⁵. Le virus se propage ensuite dans les populations par transmission interhumaine avec des liquides biologiques des personnes infectées^{5,8}.

La transmission épizootique se fait surtout par contamination des espèces d'animaux, le plus souvent des frugivores tels que les antilopes ou les grands singes qui mangent des fruits⁹⁵. Des études ont rapporté que cela a souvent lieu à la fin de la saison sèche où les ressources alimentaires deviennent de plus en plus rares, et c'est alors que les chauves-souris et les autres espèces frugivores entrent en compétition pour manger les mêmes fruits. À ce moment-là, il y a contact entre les espèces et une probable contamination a lieu⁹⁵.

La transmission zoonotique se fait des animaux infectés à l'homme. Cela se fait suite à des contacts directs avec les dépouilles mortelles des animaux infectés, la consommation des viandes infectées par le virus, etc. La transmission peut aussi se faire des chauves-souris directement à l'homme⁵. Par exemple, l'événement de transmission zoonotique à l'origine de la plus grande épidémie du virus Ébola qui a sévi l'Afrique de l'Ouest est un enfant de 2 ans

dans un village près de Meliandou en Guinée suspecté d'avoir été contaminé en jouant dans un site où se trouvait des chauves-souris⁹⁶.

La transmission interhumaine se fait alors d'homme à homme par des contacts directs ou étroits avec des liquides biologiques (sueurs, urine, salive, selles, vomissements, lait maternel, etc.), de sang, des organes et des sécrétions de personnes infectées par le virus. L'une des difficultés rencontrées lors des épidémies est les rites funéraires⁹⁷. Ceux-ci ont joué un rôle important dans la transmission du virus en Afrique. La charge virale dans les dépouilles mortelles des individus infectés est à son point culminant, de ce fait lors de lavement des dépouilles ou des contacts directs des proches avec le défunt, cela occasionne une contamination directe des proches⁹⁸.

1.7 La maladie à Filovirus et Pathologie

La maladie à virus Ébola est une maladie grave et souvent mortelle chez l'homme et les primates non-humains. Le cycle de maladie se divise en trois étapes après la période d'incubation du virus chez l'hôte. La période d'incubation qui est le temps écoulé entre l'infection par le virus et l'apparition des premiers symptômes varie généralement entre 2 à 21 jours en fonction de la méthode de transmission du virus^{49,3}. Au stade précoce de la maladie, les symptômes ne sont pas spécifiques, prêtant à confusion la maladie à virus Ébola avec d'autres maladies infectieuses en Afrique³. Dans la phase 1, les symptômes sont du type pseudo-grippal avec l'apparition d'une forte fièvre, des malaises, une intense asthénie, des myalgies, des arthralgies, des céphalées persistantes et même des pharyngites accompagnées de toux⁵⁰.

Dans la phase II, la maladie progresse avec l'apparition des symptômes gastro-intestinaux tels que des douleurs abdominales, des diarrhées aqueuses profuses et des vomissements ce qui entraîne la déshydratation du patient. Environ 5 à 7 jours après

l'apparition des symptômes, une éruption cutanée se manifeste suivie d'un érythème violacé qui souvent se généralise dans l'ensemble du corps⁵⁰. Après l'installation de la maladie, une coagulation intravasculaire disséminée se met en place, obstruant les capillaires sanguins. Ce processus conduit à la formation de caillots, entraînant ainsi la nécrose de plusieurs organes vitaux, tels que le foie, la rate, les reins, ou encore le cerveau⁵⁰. Ce phénomène provoque, dans la majorité des cas, une insuffisance rénale et hépatique, phénomène aggravé par la cytotoxicité propre au virus⁵⁰.

Dans la phase III, la maladie est caractérisée par l'apparition des symptômes hémorragiques qui se présentent souvent comme des hémorragies conjonctivales, des ecchymoses, des pétéchies (taches rougeâtres sur la peau), des saignements des cavités nasales, des saignements des gencives, des voies orales ou vaginales⁶⁴. Par la suite les saignements deviennent généralisés avec un méléna (hémorragie du tube digestif par des diarrhées de sang) puis des hématomèses qui sont des vomissements de sang^{50,51}. Ces symptômes apparaissent généralement chez 30 à 50% des patients. Au stade terminal de la maladie, la faible pression artérielle accompagnée de la coagulation intravasculaire va entraîner un état similaire à un choc septique, ce qui peut entraîner à un collapsus et une défaillance multiviscérale conduisant à la mort du patient. Lorsque le cerveau est atteint, cela peut entraîner une perte de conscience, des crises épileptiques, puis l'état de mort cérébrale^{49,50,51}.

La maladie à filovirus se caractérise par une réponse immunitaire incontrôlée qui entraîne une tempête de cytokines⁵. Les macrophages sont les principales cibles du virus, et ces cellules contribuent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles sont infectées et à la dissémination du virus dans le corps en migrant du site initial de l'infection

vers les ganglions lymphatiques, le foie et de nombreux autres organes qui deviennent des sites actifs de réplication⁵².

Le virus atteint les ganglions lymphatiques régionaux provoquant une lymphadénopathie et une propagation hématogène vers le foie et la rate. La libération de médiateurs chimiques de l'inflammation (cytokines et chimiokines) provoque une réponse immunitaire dérégulée en perturbant l'harmonie du système vasculaire, provoquant éventuellement une coagulation intravasculaire disséminée et un dysfonctionnement de plusieurs organes^{52,53}.

a. Réponse inflammatoire dérégulée

Des études ont montré que les principales premières cibles des filovirus sont les macrophages et les cellules dendritiques⁵². La réplication du virus au sein des cellules immunitaires va inhiber l'action d'une réponse immunitaire efficace, ce qui va permettre la diffusion de l'infection au sein de l'organisme pour ensuite déclencher une réaction inflammatoire inappropriée⁵².

b. Immunosuppression

Le virus va bloquer de façon précoce le système immunitaire inné et va par la suite affaiblir de manière très efficace la mise en place de la réponse antivirale précoce^{54,60}. Le virus va également inhiber l'activation de la réponse immunitaire spécifique en induisant une sécrétion inappropriée des cytokines, ce qui fait que les cellules dendritiques ne parviennent pas à subir une maturation efficace^{61,56}.

c. Diffusion virale

En raison de l'inefficacité du système immunitaire à exécuter ses fonctions antivirales, la plupart des cellules immunitaires recrutées pendant la réponse inflammatoire initiale seront infectées par les particules virales, qui sont attirées par la sécrétion de chimiokines^{56,57}. Les cellules dendritiques vont survivre quelques jours pour permettre la

diffusion du virus au sein des cellules immunitaires vers les ganglions lymphatiques, puis dans la circulation sanguine pour atteindre le foie, la rate ainsi que d'autres organes^{55,60}. Plus le virus va se diffuser, plus la réplication intense du virus va entraîner une réponse inflammatoire incontrôlée ce qui mène à l'issue fatale de la maladie⁶².

d. Cellules cibles

L'une des particularités du virus Ebola est son large tropisme cellulaire⁶³. C'est également l'une des caractéristiques faisant la gravité de la maladie à Filovirus. Le virus peut infecter de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules épithéliales et corticales surrénales⁶³. Au stade précoce de la maladie, les cellules infectent principalement les macrophages, le foie et la rate⁵³. Au stade terminal de la maladie, la plupart des tissus et organes sont saturés par le virus⁵³.

1.8. Effet de la température

La température est un facteur critique et crucial qui définit ou affecte l'issue des infections virales et la direction des infections virales des virus à ARN à la fois ex vivo et in vivo. Certaines études ont notifié que la température a un impact sur la réplication, la stabilité, la transmission ainsi que la réponse immunitaire innée de l'hôte sur les virus à ARN ce qui peut également être appliqué sur le virus Ebola⁶⁵. Dépendamment des hôtes réservoirs des virus à ARN, ces derniers ont développé certaines spécificités quant à leur température optimale de réplication et de viabilité. Par exemple, les virus respiratoires à ARN chez les oiseaux se répliquent à 41°C⁶⁶. Plusieurs études ont exploré la manière dont la température affecte la réplication, module la réponse immunitaire et influence la survie du virus à ARN en dehors de l'hôte⁶⁷. Les virus à ARN après leur liaison aux récepteurs de la cellule hôte, sont répliqués dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule hôte par une ARN polymérase virale ARN-dépendante. Cette ARN polymérase interagit avec un ou plusieurs facteurs de l'hôte

pour copier et transcrire le génome de l'ARN viral⁷¹. Les ARNm viraux sont par la suite traduits en protéines virales qui vont s'assembler avec l'ARN virale pour former de nouveaux virions⁶⁷.

Ils ont démontré que la température à laquelle la synthèse de l'ARN et l'assemblage des virions ont lieu, a un impact sur le repliement des structures secondaires de l'ARN dans le génome, les interactions protéine-ARN, les interactions protéine-protéine ainsi que sur la conformation et l'activité des enzymes virales^{67,69,70}.

Chez les virus à ARN, la stabilité et la transmissibilité du virus dépendent de plusieurs variables telles que la température et l'humidité^{65,68}. Des études ont démontré que la transmission de certains virus à ARN respiratoires était inhibée à température relativement élevée à plus de 30°C⁶⁵. Une autre étude a démontré que l'exposition des particules virales (VLP) du SARS-CoV-2 à une température de 34°C a induit une dégradation structurelle des particules virales et donc a réduit la transmission du virus⁶⁵. En somme, cette étude a démontré que les virus à ARN respiratoires se propagent mieux à des basses températures, car le virus reste stable contrairement aux températures élevées.

Il a également été démontré que la température avait un effet sur la réplication, la transcription et la structure de l'ARN viral⁶⁵. La littérature nous indique que les virus à ARN de sens positif tel que le SARS-CoV-2 ont montré qu'une augmentation de la température à 39 ou à 40°C limite le taux de synthèse de l'ARN virale et réduit davantage le titre viral⁶⁵.

La littérature nous indique également que la température a un impact direct sur la réponse de l'hôte aux infections par les virus à ARN. Par exemple, à des températures supérieures à 40°C la réponse immunitaire de l'hôte est réduite⁶⁵. Des études ont démontré qu'une température élevée à plus de 40°C, réduisait la production des cytokines

inflammatoires interleukine 6 (IL-6), IL-1B et IL-8 au moment où des cellules épithéliales trachéales humaines étaient infectées par le virus à ARN respiratoire^{72,65}.

Il est intéressant de noter que la température au moment de l'infection affecte également la réponse immunitaire innée déclenchée par l'infection et la production de molécules d'ARN viral, la croissance virale ainsi que l'efficacité de la transmission^{73,24,25}.

a. La température de la fièvre

La fièvre étant une réponse immunitaire courante à une infection virale, vise à combattre l'infection en augmentant la température corporelle du corps⁹⁹. La température normale du corps humain est d'environ 37°C. Cependant, en cas de fièvre, l'augmentation de la température est généralement supérieure à 0,5°C. La fièvre peut être classée en quatre stades principaux : la fièvre légère, qui se situe entre 37,5°C et 38°C ; la fièvre modérée, avec une température comprise entre 38°C et 39°C ; la fièvre élevée, entre 39°C et 40°C ; et enfin, l'hyperpyrexie, qui correspond à une température supérieure à 41°C, représentant le stade le plus critique de la fièvre¹²⁴.

L'augmentation de la température vise à réduire la charge virale en inactivant certains virus tels que les virus à ARN qui sont sensibles à des températures élevées⁶⁵. La température de la fièvre peut également avoir un impact sur la réplication virale de certains virus à ARN tel que le virus de la grippe qui montre une réplication réduite à des températures élevées⁶⁵.

Certaines études ont démontré que lorsque la température du corps humain atteint plus ou moins 40°C en condition de fièvre, l'efficacité de la réplication virale, la croissance virale, les réponses immunitaires de l'hôte sont fortement affectées par celle-ci⁶⁵. Non seulement elle affecte les éléments cités précédemment, mais elle peut aussi avoir un impact sur la capacité du virus à s'adapter à différents environnements⁶⁵.

Somme toute, la température présente plusieurs effets sur les virus à ARN et peut également avoir un impact sur les filovirus.

2. Hypothèse et objectifs

Sachant que la température a un impact particulier sur les virus à ARN et que les chauves-souris qui ont des températures qui fluctue aux extrêmes sont les réservoirs naturels des filovirus, nous supposons que *Les filovirus sont très stables à des températures élevées et peuvent être capables d'infecter les cellules à des températures élevées également*. Ayant co-évolué avec les chauves-souris, nous pensons que le virus Ébola est habilité à persister à de hautes températures. Nous pensons également qu'une hausse de température similaire à celle de la fièvre engendrée par une réponse immunitaire peut avoir des effets sur le taux d'infection du virus dans les cellules humaines.

Pour tester ces hypothèses, nous avons établi trois objectifs. Le premier est de vérifier la stabilité du virus à la suite d'une augmentation de température. Le deuxième objectif est de vérifier si la macropinocytose est inhibée dans les cellules à la suite d'une augmentation de température et le troisième objectif est de tester l'effet de la température de la fièvre sur les virus Ébola et Marburg en effectuant une infection à 37°C qui est la température normale du corps humain et à la température du corps humain en condition de fièvre. Par la suite, nous allons élargir cette étude et tester les autres filovirus soient RESTV, BOMV, TAFV, MLAV, BDBV, LLOV et SUDV.

3. Matériels et méthodes

3.1 Lignées cellulaires et culture cellulaire

Les cellules HT1080 (ATCC), les cellules Huh7.5 et les cellules HEK293T de rein embryonnaire humain (ATCC) ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Wisent). Le milieu de culture a été complété avec 10% de sérum bovin foetal (FBS, Sigma), 0.3 mg/mL de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Wisent). Les cellules ont été maintenues à 37°C dans 5% de CO₂ à 100% d'humidité relative.

Des cellules monocytes THP-1 (ATCC TIB-202TM) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 additionné de 8% de sérum bovin foetal (FBS) et de 50µg/mL de gentamicine. Pour différencier les monocytes de THP-1 en phénotype macrophage, 50 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ont été ajoutés au milieu de culture pendant 72h. Les cellules ont ensuite été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et maintenues dans un milieu RPMI 1640 additionné de 8% de FBS sans antibiotique ni PMA pendant 24h. Les cellules ont été incubées à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂ pendant 3 jours pour permettre la différenciation des macrophages

3.2 Clonage

Des plasmides d'expression des glycoprotéines (GP) des filovirus ont été générés par technique de clonage conventionnelle. Des fragments de gènes de Glycoprotéine (GP) de chaque filovirus, dont BOMB GP, MLAV GP, TAFV GP, BDBV GP, RESTV GP, LLOV GP, SUDV GP, MARV GP et EBOV GP ont été respectivement amplifiés par une première PCR et ensuite respectivement assemblés en un seul gène à l'aide d'une seconde PCR. EcoRI et NheI ont été utilisés afin d'insérer le gène dans un vecteur Pcaggs. La déphosphorylation

du vecteur ainsi que la ligation du gène avec le vecteur ont été effectuées. Des bactéries *E. coli* DH5 alpha ont été ajoutées à la solution du gène ligué au vecteur pour faire la transformation. Les solutions de transformation de chaque filovirus GP respectivement ont été appliquées sur des plaques de pétries avec Carbenicillin et incubées à 37°C pendant 18h. L'extraction des plasmides a eu lieu à l'aide d'une mini-prep (Qiagen) après avoir piqué les colonies et fait pousser dans du LB avec Carbenicillin.

3.3 Production et purification des particules pseudo-virales (VLP)

Les cellules HEK293T ont étéensemencées dans une plaque de Petri de 10 cm et ont été laissées pousser jusqu'à une confluence de 90% avant d'être co-transfecté par des quantités stoechiométriques de plasmides codant pour EBOV NP, EBOV VP40 fusionné à la β -lactamase et la glycoprotéine de pleine longueur de chaque virus voulant être exprimé dont EBOV GP FL, MARV GP, BDBV GP, SUDV GP, RESTV GP et VSV-G qui nous ont été offert de la part du Dr. James Cunningham de Birgham and Women's Hospital à Boston. TAFV GP et LLOV GP qui ont été cloné par Rory Mulloy, un étudiant à la maîtrise dans le laboratoire M.Côté. Et finalement MLAV GP et BOMV GP qui ont été cloné par moi-même dans le laboratoire M.Côté. La co-transfection a été faite en utilisant le réactif de transfection JetPRIME dans un rapport de 1:1:1,15. Les surnageant contenant le virus ont été collectés et concentrés par ultracentrifugation à 20 000 tr/min pendant 1,5h à 4°C à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman Coulter Optima XPN-100, rotor SW32Ti. La concentration et la purification a été faite à travers un coussin de sucrose 20% (poids/vol). Les virus ont été remis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et stockés à -80°C.

3.4 Cytométrie de flux

Pour nos expériences sur les infections virales, nous avons utilisé un test de β -lactamase basé sur le substrat CCF2-AM, qui repose sur le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET). Le CCF2-AM, constitué d'hydroxycoumarine et de fluorescéine attachée à un cycle β -lactame, agit comme un rapporteur efficace. En présence de la β -lactamase, ce substrat subit un clivage rapide, entraînant un décalage significatif de la longueur d'onde d'émission de fluorescence¹²⁵.

Nous avons préparé une solution de CCF2-AM conformément aux instructions du kit, et nous l'avons appliquée aux cellules infectées pendant 1 heure. Les cellules ont ensuite été lavées, transférées dans des tubes, et centrifugées. Une petite quantité de PBS avec 2 % de FBS a été ajoutée aux cellules pour les resuspendre.

Nous avons ensuite mesuré par cytométrie de flux la fusion virale, où le matériel génétique des particules virales est libéré dans le cytosol après une entrée réussie. La protéine VP40 a été conjuguée à la β -lactamase pour cliver le CCF2-AM dans les cellules après coloration. En l'absence de β -lactamase, l'excitation de l'hydroxycoumarine à 409 nm entraîne un transfert d'énergie FRET vers la fluorescéine, produisant une émission de lumière verte à 520 nm (BV-510A dans le cytomètre de flux). En présence de β -lactamase, le clivage du cycle β -lactame sépare la fluorescéine, perturbant le FRET et provoquant une émission directe à 447 nm (BV-421A dans le cytomètre de flux). Voir image supplémentaire 1.

Ainsi, cette méthode nous a permis de mesurer l'entrée virale des filovirus dans les cellules et de quantifier la présence de dextran fluorescent.

3.5 Tests d'entrée des particules pseudo-virales (VLP)

Pour tester l'entrée des VLPs, des cellules HT1080 ont étéensemencées dans des plaques de 48 puits pour avoir environ 90% de confluence le lendemain. Les VLPs ont ensuite été ajoutées, puis incubées à 37°C avec les cellules pendant 3h. Les cellules ont par la suite été lavées avec du DMEM sans sérum et chargées avec la solution de coloration au CCF2-AM (Invitrogen) conformément aux instructions du Kit pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution de coloration a été complétée avec 250µM de probénécide (Sigma). Après la coloration, les cellules ont été lavées à l'aide de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et ensuite trypsinisées. Le clivage du CCF2 a été analysé par cytométrie de flux à l'aide du cytomètre en flux BD LSRFortessa FORP. Les cellules colorées ont été définies comme des cellules qui étaient décalées positivement par rapport aux cellules non colorées (émission dans un filtre 525/50), et les cellules β-lactamase-positives (avec une libération réussie du rapporteur après la fusion des VLPs) ont été définies comme des cellules qui ont été décalées positivement (émission dans un filtre 450/50) par rapport aux cellules colorées et non infectées.

3.6 Infection pour vérification de la thermostabilité des filovirus

Les cellules HT1080 ont étéensemencées dans une plaque de 48 puits pour une quantité de 70 000 cellules/puits visant à une confluence de 90% le lendemain. 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture des cellules a été changé pour un milieu DMEM sans sérum bovin foetal (FBS). Les VLPs sont diluées dans du milieu DMEM pour obtenir des volumes similaires dans chaque tube qui vont être chauffés à l'aide d'un thermocycleur où un gradient de température de 37°C, 40°C, 45°C et 50°C est établi. Avec ce gradient de température, chacun des trois virus a trois réplicats correspondant aux températures du gradient. Les virus préchauffés vont par la suite être ajoutés aux cellules traitées avec du

milieu DMEM sans sérum précédemment et incuber à 37°C pendant 3 h. Les cellules ont par la suite été lavées avec du DMEM sans sérum et traitées avec la solution de coloration au CCF2-AM (Invitrogen) conformément aux instructions du Kit pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution de coloration a été complétée avec 250µM de probénécide (Sigma). Après la coloration, les cellules ont été lavées à l'aide de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et ensuite trypsinisées. Les cellules ont été récoltées et centrifugées à 1500 RPM pendant 5 minutes à 4°C. L'analyse de l'infection se fait par cytométrie de flux, qui est une technique polyvalente permettant de quantifier la fluorescence et les caractéristiques structurelles des particules. Le cytomètre de flux utilisé est la BD LSRFortessa FORP.

3.7 Infection de température fièvre

Les cellules HT1080 ont étéensemencées dans deux plaques de 48 puits pour une quantité de 70 000 cellules/puits visant à une confluence de 90% le lendemain. 24 h après l'ensemencement, une plaque a été mise à 39°C pendant une heure et l'autre est restée à 37°C. Après 1h, le milieu de culture des cellules a été changé pour un milieu DMEM sans sérum bovin foetal (FBS). Les mêmes étapes ont été appliquées avec les cellules Huh7.5. Par la suite, 2µL des VLPs purifiées du virus EBOV, 2µL du virus MARV et 0.3µL du virus VSV ont été ajoutés aux cellules des différentes plaques et incubés à 37°C pour la première plaque et à 39°C pour la deuxième plaque pendant 3h.

Pour les cellules de macrophages, les monocytes de THP-1 ont été différenciés en phénotype macrophage après l'ajout de 50 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) dans le milieu de culture et laissé incubé à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂ pendant 3 jours pour permettre la différenciation des macrophages. Par la suite, les cellules ont étéensemencées dans deux différentes plaques de 48 puits. Après 24h l'une des plaques a été

pré-incubée à 39°C pendant 1h et l'autre est restée à 37°C. Par la suite, 2µL des VLPs purifiées du virus EBOV, 2µL du virus MARV et 0.3µL du virus VSV ont été ajoutés aux cellules des différentes plaques et incubés à 37°C pour la première plaque et à 39°C pour la deuxième plaque pendant 3h.

Après infection, les cellules ont été lavées avec du DMEM sans sérum et traitées avec la solution de coloration au CCF2-AM (Invitrogen) conformément aux instructions du Kit pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution de coloration a été complétée avec 250µM de probénécide (Sigma). Après la coloration, les cellules ont été lavées à l'aide de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et ensuite trypsinisées. Les cellules ont été récoltées et centrifugées à 1500 RPM pendant 5 minutes à 4°C. L'analyse de l'infection se fait par cytométrie de flux où les cellules sont absorbées afin d'identifier l'effet de la bêta-lactamase sur le CCF2 lors de l'infection, voir l'exemple de stratégie de sélection de sous-population pour l'analyse des cellules infectées (Image supplémentaire 1). Le cytomètre de flux utilisé est la BD LSRFortessa FORP.

3.8 Internalisation du Dextran

Les cellules HT1080 et Huh7.5 ont étéensemencées dans deux plaques de 48 puits pour une quantité de 70 000 cellules/puits visant à une confluence de 90% le lendemain. Les monocytes de THP-1 ont été différenciés en phénotype macrophage après l'ajout de 50 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) dans le milieu de culture et laissé incubé à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂ pendant 3 jours pour permettre la différenciation des macrophages. 24 h après l'ensemencement, une plaque a été mise à 39°C pendant une heure et l'autre est restée à 37°C. Par la suite, le dextran, fluorescein, 10,000 MW, anionique, lysine fixable (fluoro-emerald) et 70,000 MW de la compagnie Thermo Fisher a été suspendu à nouveau dans du PBS et 0.5 mg/mL a été ajouté aux cellules et incubé pendant 3 heures à 37

ou 39°C. Après incubation, les cellules ont été lavées à l'aide de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et ensuite trypsinisées. Les cellules ont été récoltées et centrifugées à 1500 RPM pendant 5 minutes à 4°C. La quantification du signal fluorescent du dextran se fait par cytométrie de flux à l'aide de leurs différents fluorochromes soient le FITC pour le 70kDa et le PE-CE594 pour le 10kDa. Le cytomètre de flux utilisé est la BD LSRFortessa FORP.

3.9 Analyse statistique

Les données expérimentales relatives aux tests de thermostabilité ont été analysées à l'aide du logiciel **GraphPad Prism version 10.2**. Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) avec le **test post-hoc de Tukey** a été effectuée pour comparer les différents groupes lors des expériences de thermostabilité, impliquant des comparaisons multiples. La signification statistique des résultats a été évaluée selon les critères suivants : **ns = non significatif**, ***p < 0,05**, ****p < 0,01**, *****p < 0,001**, et ******p < 0,0001**.

Les données expérimentales concernant les tests de température fièvre ont été analysées à l'aide du **test t de Welch**, en raison de la variance inégale entre les groupes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM) à partir de trois répétitions expérimentales. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns = non significatif**, ***p < 0,05** ****p < 0,01**.

Les données expérimentales concernant la quantification de la fluorescence du dextran dans les cellules ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 10.2. Pour comparer les différents groupes impliquant des comparaisons multiples, une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) a été réalisée, suivie d'un test de Bonferroni. La signification statistique a été définie comme suit : **ns = non significatif**, ****p < 0,01**. Les graphiques présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

4. Résultats

4.1 Vérification de la thermostabilité d'EBOV et MARV par augmentation graduelle de la température.

Afin de déterminer la thermostabilité d'EBOV et MARV, nous avons employé des VLPs contenant les protéines structurales virales d'EBOV, la NP, la VP40, et la GP d'EBOV, MARV, ou la glycoprotéine, G, de VSV. Ces particules sont sécuritaires et peuvent être manipulées en BSL-2, et ont la même morphologie qu'EBOV¹⁰³. Elles nous permettent également de mesurer l'entrée virale dans des cellules par la fusion de VP40 à la Bêta-lactamase (Blam) et la détection de l'activité de Blam dans les cellules hôtes via le clivage du substrat CCF2 dans la cellule suite à la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule et le transfert de VP40-Blam dans le cytoplasme de la cellule.

Ces particules virales ont été exposées à un gradient de température soit 37°C, 40°C, 45°C et 50°C afin de subir un choc de chaleur et ainsi tester la thermostabilité intrinsèque de chaque virus. Comme contrôle nous avons utilisé la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV G) pour sa capacité à induire une fusion membranaire efficace et à permettre l'entrée de particules virales dans une large gamme de types cellulaires ainsi que sa faible stabilité face à la chaleur. Avec ce gradient de température, chacun des trois différents VLPs avait trois réplicats correspondants aux températures du gradient. L'infection s'est faite en ajoutant une quantité de volume de VLP afin d'obtenir un pourcentage d'infection d'environ 20% à 37°C pour chacun des virus.

Comme résultat, nous avons observé qu'EBOV est plus stable que MARV et VSV est beaucoup moins stable que EBOV et MARV (Figure 7). Le niveau d'infection des VLPs ayant VSV G baisse considérablement au fur et à mesure que la température augmente et nous constatons que le virus est presque inactivé à 50°C. Le niveau d'infection de MARV

présente une baisse significative lorsqu'il est exposé à 50°C, mais nous pouvons aussi observer une faible tendance de diminution de l'infection lorsqu'il est exposé à 45°C. Cependant, pour EBOV nous remarquons qu'il est très stable jusqu'à 50°C et semble d'ailleurs être plus performant lorsqu'il est pré-traité à de hautes températures.

Nous avons également testé la thermostabilité des autres filovirus dont les virus BDBV, RESTV, LLOV, TAFV en comparaison avec EBOV et VSV. Nous avons constaté que tous les virus de la classe des ébolavirus soient EBOV, RESTV, BDBV ont maintenu une stabilité similaire à celle de EBOV jusqu'à 50°C (Figure 8). Ils sont donc résistants face à la chaleur à l'exception de TAFV qui s'inactive graduellement face à l'augmentation de la température, nous pouvons observer une baisse significative du niveau de l'infection de ce dernier à 45 et à 50°C. Le virus LLOV de la classe des cuevavirus est également thermostable jusqu'à 50°C il n'y a pas de variation dans son habilité à entrer les cellules.

Nous concluons en disant que EBOV est plus stable que MARV et que VSV n'est pas thermostable. Les filovirus de la classe des cuevavirus et des ébolavirus sont thermostables à l'exception du virus TAFV qui est moins stable face à la chaleur.

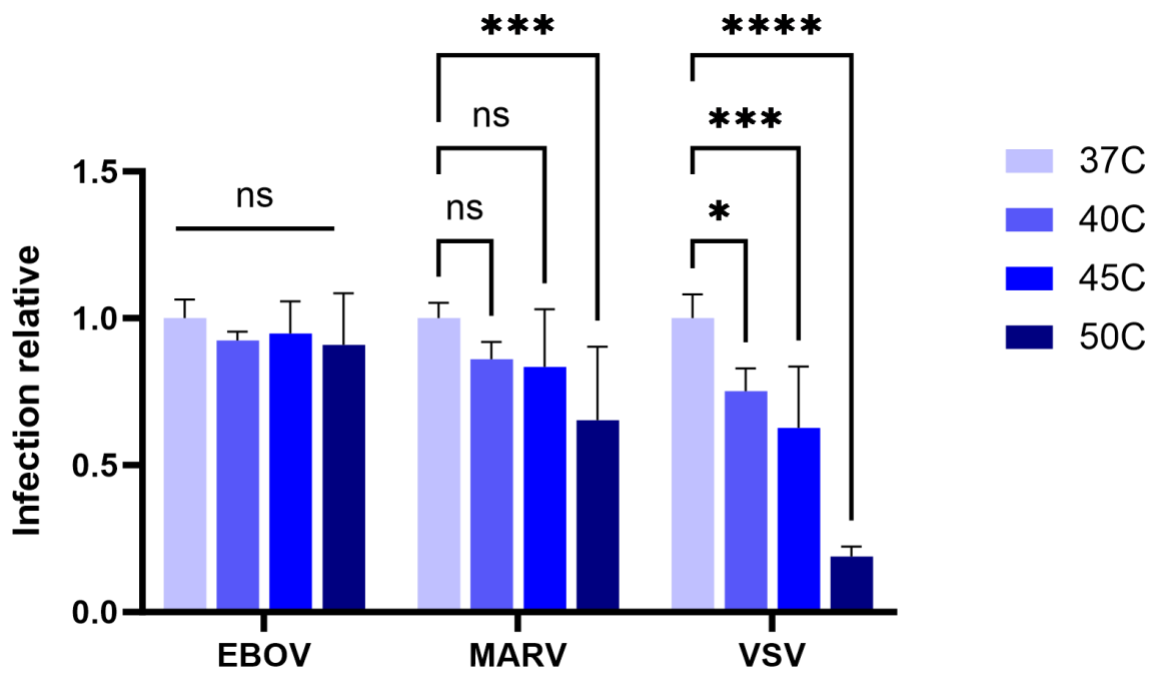


Figure 7. Effet de l'augmentation graduelle de la température sur la stabilité des virus EBOV et MARV. Un gradient de température (37°C, 40°C, 50°C et 55°C) a été établi à l'aide d'un thermocycleur, avec une exposition des virus à chaque température pendant 3 minutes. Les virus EBOV, MARV (2 µL) et VSV-g (0,3 µL) ont ensuite été ajoutés aux cellules HT1080 pour une infection de 3 heures. Après coloration au CCF2, les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux. La moyenne des infections, normalisée par rapport à l'infection à 37°C, est présentée sur trois réplicats biologiques, chaque réplicat étant effectué en triplicat technique. Les données de thermostabilité ont été analysées avec le logiciel **GraphPad Prism version 10.2**. Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) avec un test post-hoc de Tukey a été utilisée pour comparer les différents groupes dans les expériences de thermostabilité. La signification statistique a été évaluée comme suit : **ns** = non significatif, ***p < 0,05**, ****p < 0,01**, *****p < 0,001**, et ****p < 0,0001**.

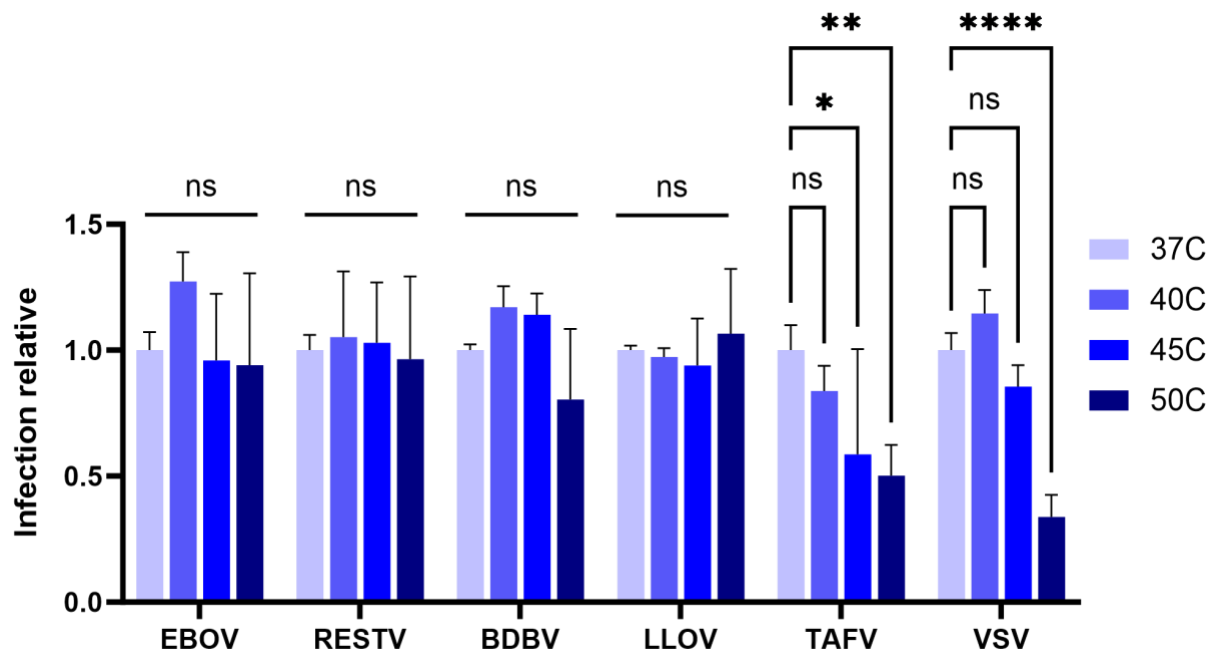


Figure 8. Effet de l'augmentation graduelle de la température sur la stabilité des Filovirus. Un gradient de température de 37°C, 40°C, 50°C et 55°C a été établi à l'aide d'une machine PCR, et les virus ont été chauffés pendant 3 minutes. Les virus EBOV (2 µL), RESTV, BDBV, LLOV, TAFV (3 µL chacun) ainsi que VSV-g (0,3 µL) ont été ajoutés aux cellules HT1080 pour une infection de 3 heures. Après la coloration avec le CCF2, les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux. La moyenne des infections, normalisée par rapport à l'infection à 37°C, est présentée à partir de trois réplicats biologiques, chacun effectué en triplicat technique. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel **GraphPad Prism version 10.2**. Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA), suivie du test post-hoc de Tukey, a été réalisée pour comparer les différents groupes dans les expériences de thermostabilité. La signification statistique des résultats a été évaluée comme suit : **ns** = non significatif, ***p < 0,05**, ****p < 0,01**, et *****p < 0,0001**.

4.2 Vérification de l'activité de la macropinocytose à température fièvre dans les Ht1080, Huh 7.5 et dans les macrophages (THP-1 différenciés)

Pour infecter les cellules, les filovirus doivent d'abord être internalisés par macropinocytose. Afin de vérifier l'activité de la macropinocytose lors d'une augmentation de température dans les cellules de façon générale, nous avons quantifié l'internalisation des différentes tailles de dextran à la température normale du corps humain soit 37°C et à la température du corps humain en condition de fièvre soit 39°C. Le dextran est un polysaccharide qui est généralement produit par la fermentation de sucres par certaines souches de bactéries. Le dextran peut avoir différentes tailles et structures. Dans notre cas, nous avons utilisé deux différentes tailles de dextran fluorescents. Le premier est le Dextran 10 KiloDalton (kDa) avec comme colorant fluorescent la Tetramethylrhodamine (TRITC) et le deuxième est le Dextran 70 KiloDalton (kDa) avec comme colorant fluorescent la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Les différentes tailles vont nous permettre de voir l'activité de la macropinocytose, particulièrement celle à 70 kDa. Les deux types de dextran ont été appliqués aux cellules HT1080 qui sont des cellules de tissus conjonctifs humains ainsi qu'aux cellules Huh7.5 qui sont des cellules de carcinome hépatocellulaire humain, elles sont particulièrement sensibles à l'infection au virus et elles soutiennent efficacement la réplication du virus Ebola. Ces cellules ont été préchauffées à différentes températures, soient à 39°C et 37°C à des fins de comparaisons.

Pour les macrophages qui sont les cibles primaires des filovirus lors de l'infection, les monocytes des Thp-1 ont été différenciés en macrophages à l'aide du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), ensuite ont été réchauffés à 39°C et 37°C comme avec les ht1080 et les huh7.5.

Comme résultat pour les cellules Ht1080, nous avons observé qu'il y avait un plus fort signal pour le dextran de 10 kDa comparativement à celui de 70 kDa, ce qui est normal puisque le dextran 10 kDa peut être internalisé via la micropinocytose, en plus de la macropinocytose¹⁰⁴. Au niveau de la température, nous avons observé qu'il n'y avait pas de différence significative du signal pour le dextran 10 kDa et 70 kDa aux deux différentes températures (Figure 9). Ceci nous indique que le processus de macropinocytose, qui est important pour l'entrée d'EBOV, n'est pas affecté à 39 °C lors de la fièvre dans les cellules en général.

Pour les Huh7.5 et les macrophages, nous avons obtenu un résultat généralement similaire à ceux des HT1080 (Figures 10 et 11). Nous avons observé qu'il y avait un plus fort signal pour le dextran de 10 kDa comparativement à celui de 70 kDa. Au niveau de la température nous avons observé qu'il y avait une légère augmentation du signal pour le dextran 10 kDa à 39 °C comparativement à 37°C. Contrairement au dextran de 70 kDa où il n'y avait pas de différence significative pour les deux températures. Ceci nous indique que la macropinocytose n'est pas affectée à 39 °C lors de la fièvre dans les macrophages et les huh7.5, cependant la micropinocytose est potentiellement augmentée à 39°C dans ces cellules.

HT1080

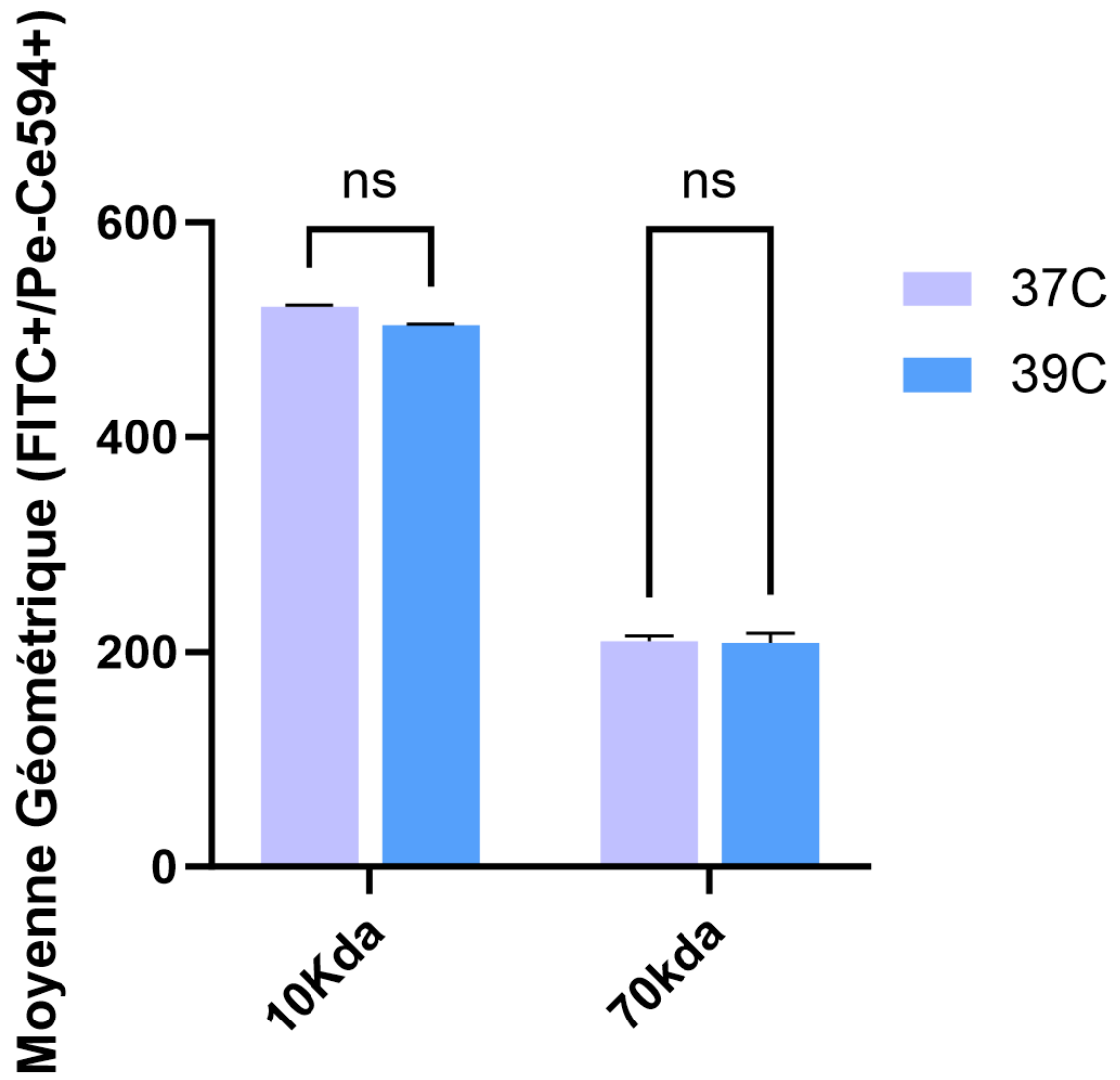


Figure 9. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules Ht1080 à 37°C et à 39°C. Les cellules Ht1080 ont étéensemencées dans deux plaques à 48 puits, l'une incubée à 37°C pendant la nuit et l'autre pré-incubée à 39°C pendant une heure. Un total de 0,5 mg de dextran de 10 kDa et 70 kDa, préparé dans du PBS et dilué dans du milieu DMEM sans sérum, a été appliqué aux cellules. Le temps d'incubation a duré 3 heures. Les résultats ont été mesurés par fluorescence à l'aide de la cytométrie de flux, utilisant le fluorophore PE-CE594 pour mesurer le dextran 10 kDa et le fluorophore FITC pour mesurer le dextran 70 kDa. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. L'axe des ordonnées représente la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence FITC et PE, avec n = 9 par échantillon. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée, suivie du test de comparaisons multiples de Bonferroni. La signification statistique a été déterminée comme suit : ns = non significatif.

Huh7.5

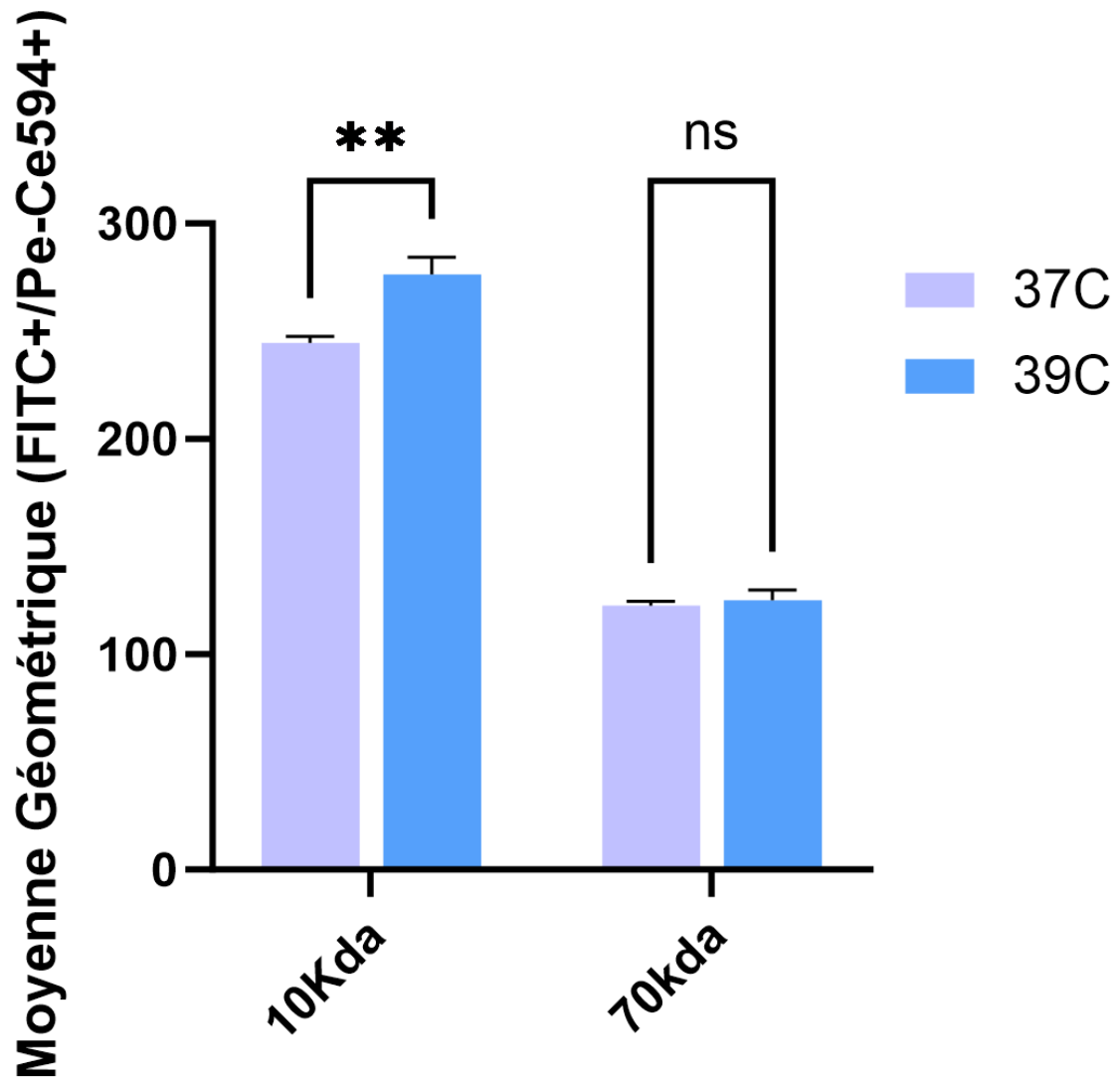


Figure 10. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules Huh7.5 à 37°C et à 39°C. Les cellules Huh7.5 ont étéensemencées dans deux plaques à 48 puits, l'une incubée à 37°C pendant la nuit et l'autre pré-incubée à 39°C pendant une heure. Un total de 0,5 mg de dextran de 10 kDa et 70 kDa a été préparé avec du PBS et dilué dans du milieu DMEM sans sérum avant d'être appliqué aux cellules. Le temps d'incubation a duré 3 heures. Les résultats ont été mesurés par fluorescence à l'aide de la cytométrie de flux, utilisant le fluorophore PE-CE594 pour mesurer le dextran 10 kDa et le fluorophore FITC pour le dextran 70 kDa. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. L'axe des ordonnées représente la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence FITC et PE, avec n = 9 par échantillon. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée, suivie du test de comparaisons multiples de Bonferroni. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns** = non significatif, ****p < 0,01**.

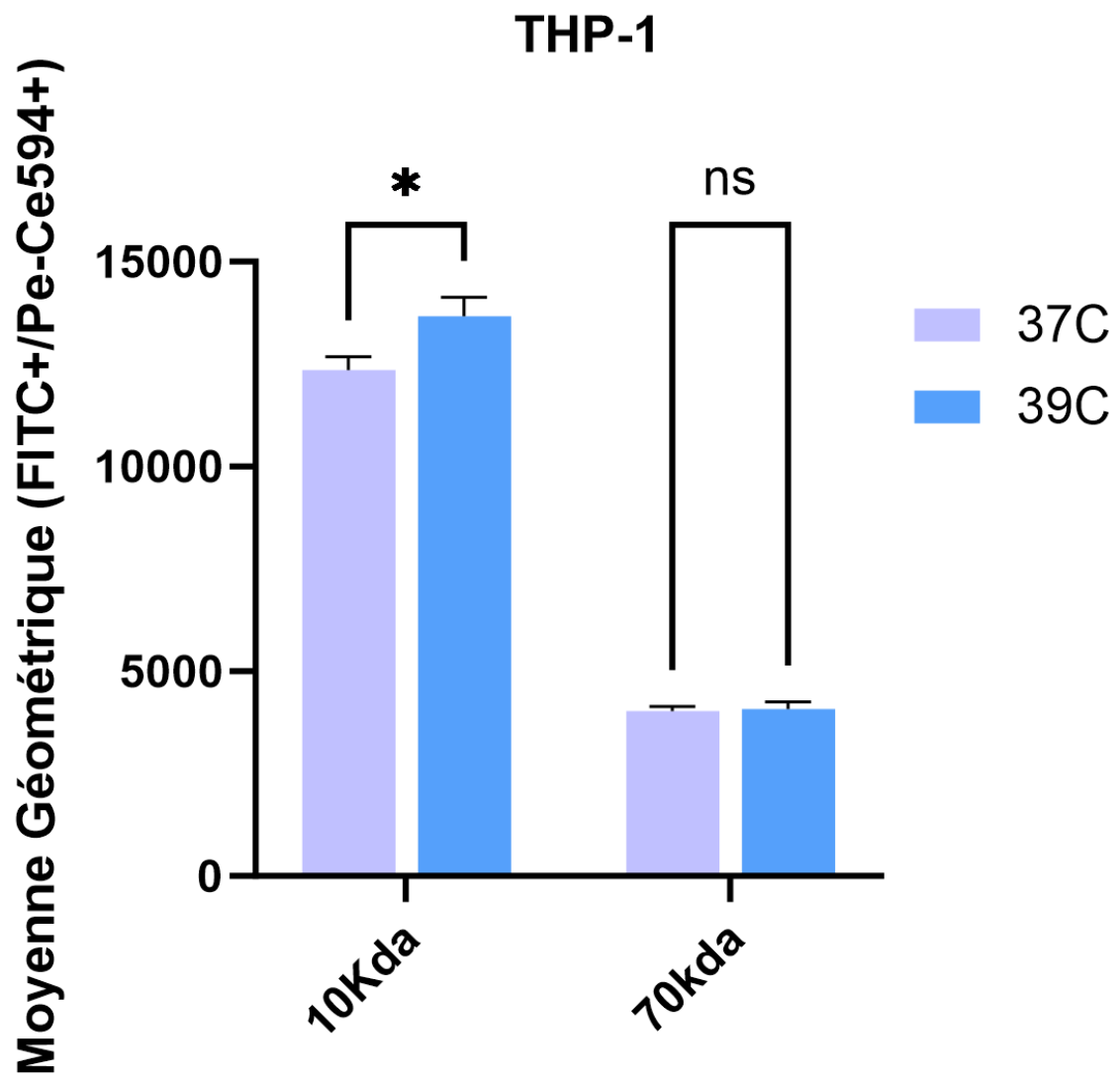


Figure 11. Vérification de l'effet de la température fièvre sur l'activité de la macropinocytose à l'aide du dextran dans les cellules THP-1 à 37°C et à 39°C. Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages par exposition au PMA, puis ensemencées dans deux plaques à 48 puits, l'une incubée à 37°C pendant la nuit et l'autre pré-incubée à 39°C pendant une heure. Un total de 0,5 mg de dextran de 10 kDa et 70 kDa a été préparé avec du PBS et dilué dans du milieu DMEM sans sérum, puis appliqué aux cellules. Le temps d'incubation a duré 3 heures. Les résultats ont été mesurés par fluorescence à l'aide de la cytométrie de flux, utilisant le fluorophore FITC pour mesurer le dextran 10 kDa et le dextran 70 kDa. Les données sont représentatives de quatre expériences indépendantes. L'axe des ordonnées représente la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence FITC et PE, avec $n = 9$ par échantillon. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée, suivie du test de comparaisons multiples de Bonferroni. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns** = non significatif, ***p < 0,05**.

4.3 Effet de la température fièvre par infection des cellules HT1080, Huh 7.5 et dans les macrophages (THP-1 différenciés) à 37°C et à 39°C

Nos résultats précédents démontrent qu'EBOV est stable à des températures élevées et que la macropinocytose, un processus crucial lors de l'entrée d'EBOV, n'est pas affectée lorsque les cellules sont incubées à la température de la fièvre, suggérant que l'entrée et l'infectivité d'EBOV devraient être maintenues à cette même température. Afin de directement déterminer l'effet de la température fièvre sur l'entrée par le virus EBOV et MARV dans les cellules, les cellules HT1080, Huh7.5 et Thp-1 différenciées en macrophages ont été infectées dans deux conditions différentes : la première à 37°C qui est la température normale du corps humain et la deuxième à 39°C qui est une température du corps humain en condition de fièvre. La fièvre étant une réaction normale à une infection qui augmente la température lorsqu'un agent pathogène pénètre dans l'organisme, la simulation de celle-ci permet de voir l'impact de la température sur l'infection des cellules. Pour l'infection, les cellules ont été ensemencées dans deux différentes plaques 48 puits, l'une a été préchauffée à 39°C pendant une heure et l'autre à 37°C. Celles-ci ont été infectées par les VLPs de EBOV, MARV et VSV-g qui est notre contrôle. Particulièrement pour les Thp-1, les cellules ont été différenciées en macrophages trois jours avant l'expérience par exposition au phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA).

Après analyse du taux d'infection du virus par cytométrie de flux dans les deux conditions de température, nous avons observé dans les ht1080, une tendance vers une augmentation du taux d'infection d'EBOV et MARV à 39°C comparativement à 37°C (Figure 12). Nous avons également observé une diminution significative du taux d'infection de notre contrôle VSV-g à 39°C. Dans les cellules Huh7.5, nous avons observé une petite tendance vers une augmentation du taux d'infection pour EBOV à 39°C, une diminution significative du taux d'infection de MARV à 39°C ainsi que pour notre contrôle VSV (Figure

13). Ceci nous indique que l'augmentation de température au niveau cellulaire n'affecte pas significativement l'habilité du virus à entrer dans les cellules. Car les résultats sont similaires à lorsque l'augmentation de la température est appliquée directement sur le virus.

Dans les macrophages, nous avons observé une tendance vers une augmentation pour EBOV à 39°C et pas de différence notable pour MARV (Figure 14). Cependant, nous avons observé une tendance vers une augmentation pour VSV à 39°C comparativement aux cellules Ht1080 et Huh7.5. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'entrée dans les macrophages est particulièrement rapide, ce qui nous fait penser que l'effet de la température directe sur le virus est possiblement limité car l'infection se fait très rapidement et le temps que la température puisse agir sur le virus est assez court comparativement aux autres lignées cellulaires où la température a le temps d'agir sur le virus avant l'internalisation de celui-ci.

HT1080

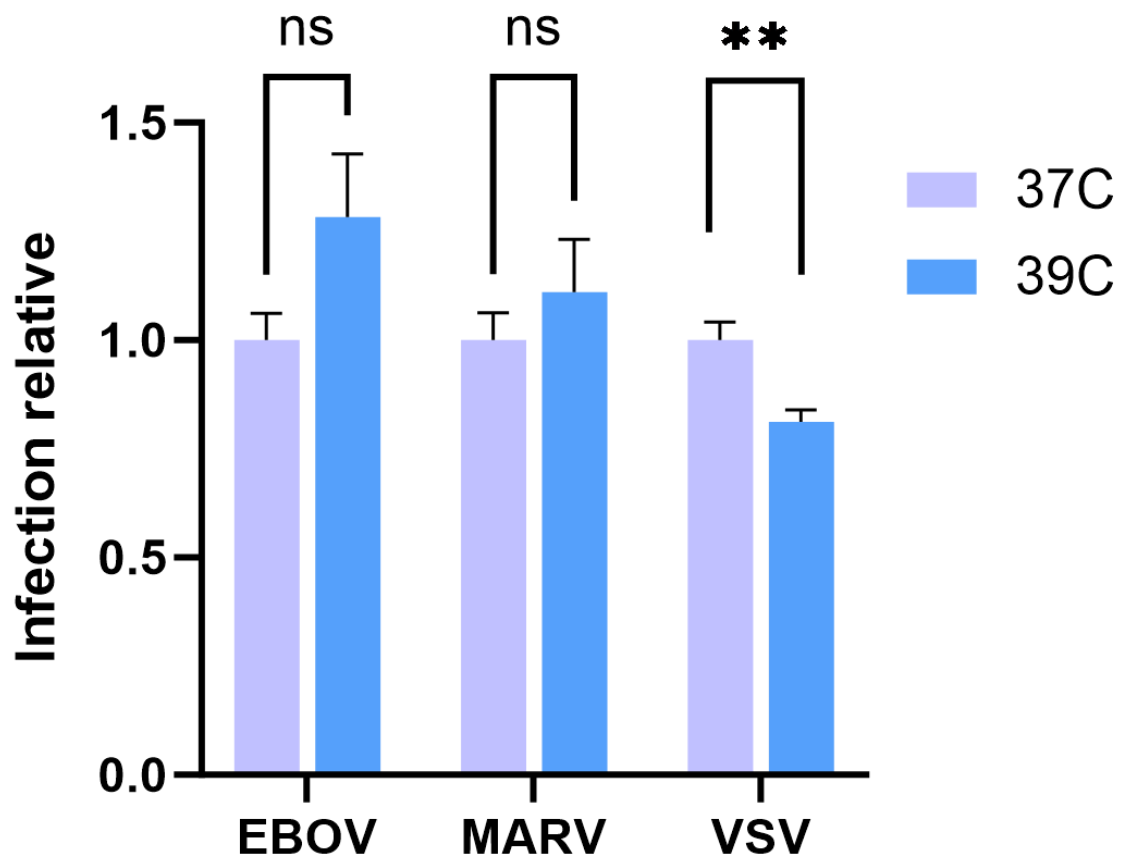


Figure 12. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules Ht1080. Les particules pseudo-virales (VLP) d'EBOV, MARV, et VSV ont été utilisées pour infecter des cellules HT1080, cultivées dans deux plaques de 48 puits pré-incubées à 37°C et 40°C respectivement. Après 3 heures d'infection, les cellules ont été lavées puis colorées avec une solution de CCF2 pendant 1 heure. L'analyse des échantillons a été réalisée par cytométrie en flux à l'aide de la machine BD Fortessa. Le contrôle négatif comprenait des cellules non infectées, mais colorées au CCF2. L'expérience a été reproduite quatre fois, avec trois réplicats par virus. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel **GraphPad Prism version 10.2**, et un test t de Welch a été utilisé en raison de la variance inégale entre les groupes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM) calculée à partir de trois répétitions expérimentales. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns** = non significatif, ****p < 0,01**.

Huh 7.5

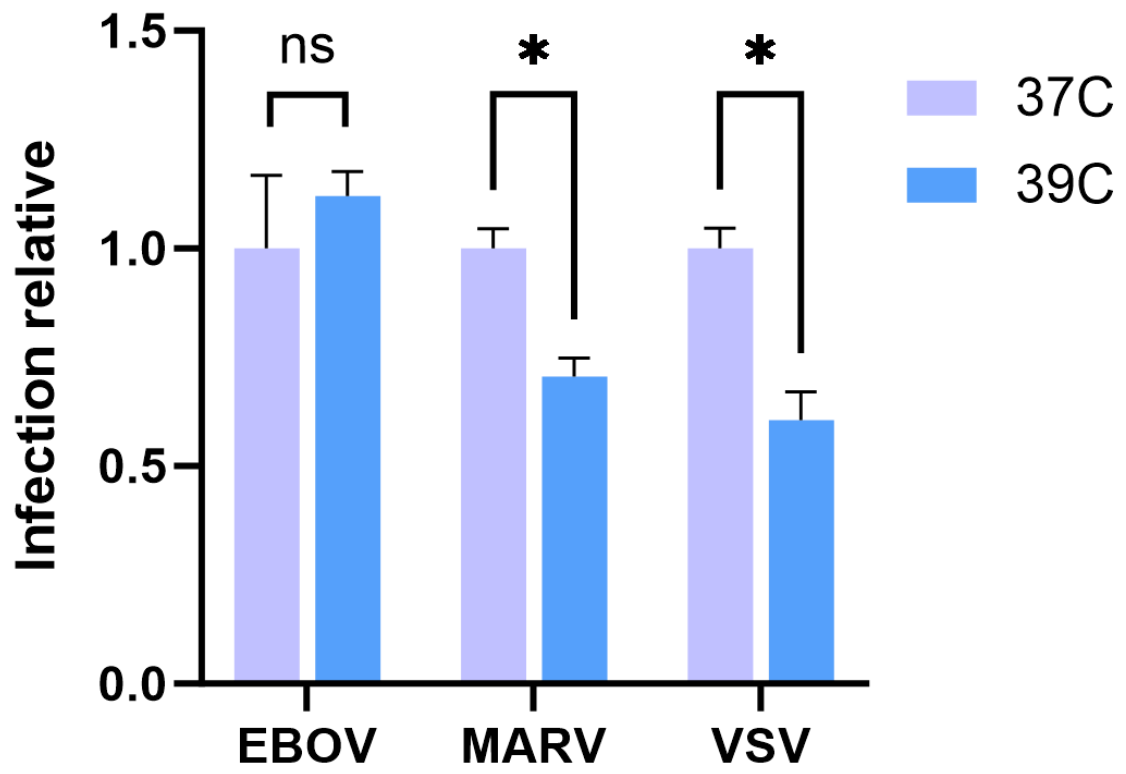


Figure 13. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules Huh 7.5. Les particules pseudo-virales (VLP) d'EBOV, MARV, ou VSV ont permis d'infecter les cellules Huh 7.5, qui ont étéensemencées dans deux plaques à 48 puits pré-incubées à 37°C et 40°C respectivement. Après 3 heures d'infection, les cellules ont été lavées et colorées avec une solution contenant du CCF2 pendant 1 heure. Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie de flux. Le contrôle négatif a inclus des cellules non infectées mais colorées par le CCF2. La machine de cytométrie de flux utilisé était la BD Fortessa. L'expérience a été reproduite quatre fois avec trois répliques pour chaque virus. L'axe des ordonnées représente l'infection relative par rapport à 37°C pour chaque virus. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 10.2, et un test t de Welch a été utilisé en raison de la variance inégale entre les groupes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM) calculée à partir de trois répétitions expérimentales. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns** = non significatif.

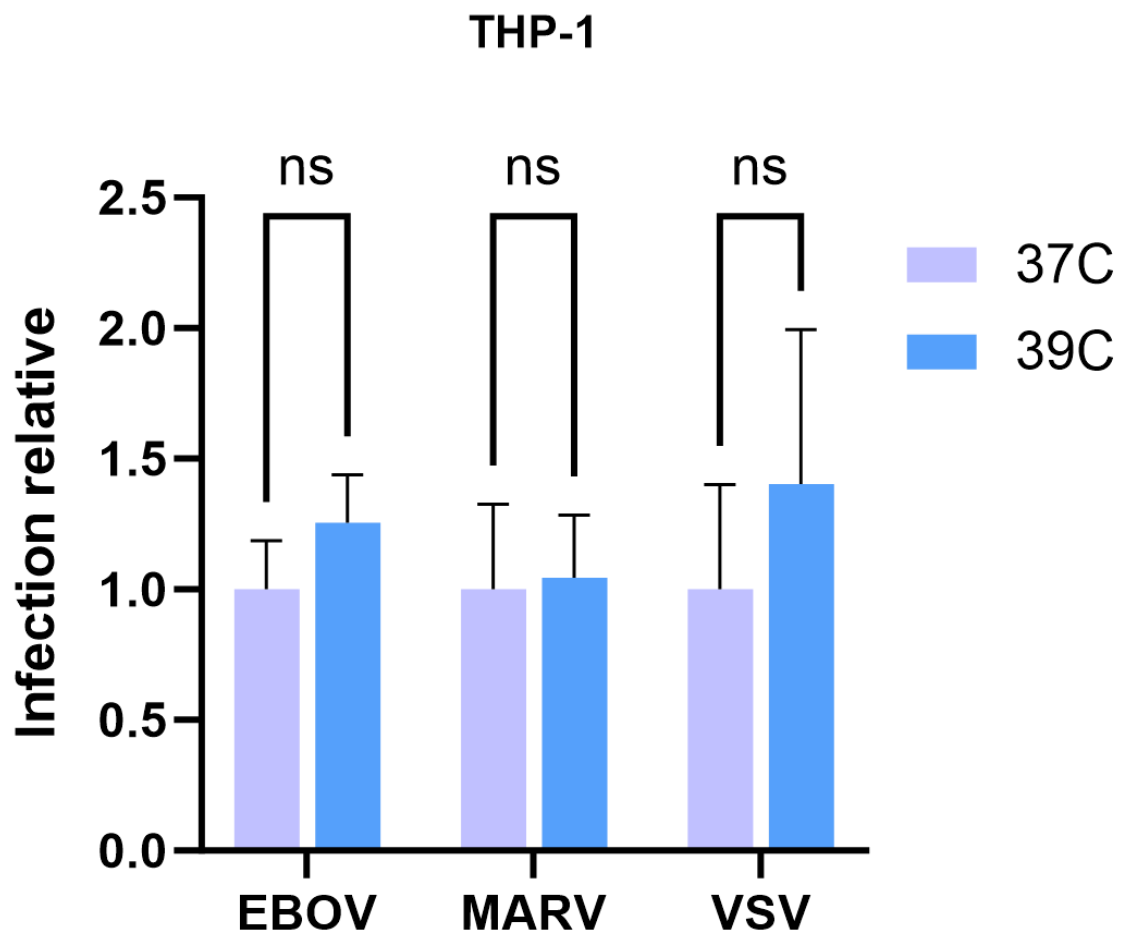


Figure 14. Visualisation de l'effet de la température fièvre sur l'infection des virus EBOV et MARV dans les cellules THP-1. Les cellules THP-1 ont été différenciées en macrophages par exposition au PMA, puisensemencées dans deux plaques de 48 puits, l'une incubée à 37°C overnight et l'autre pré-incubée à 39°C pendant 1 heure. Les particules pseudo-virales (VLP) d'EBOV, MARV, et VSV ont été utilisées pour infecter les cellules. Après 3 heures d'infection, les cellules ont été lavées puis colorées avec une solution de CCF2 pendant 1 heure. Les échantillons ont été analysés par cytométrie de flux à l'aide de la machine BD Fortessa. Le contrôle négatif contenait des cellules non infectées, mais colorées au CCF2. L'expérience a été reproduite quatre fois, avec trois réplicats par virus. L'axe des ordonnées représente l'infection relative par rapport à 37°C pour chaque virus. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel **GraphPad Prism version 10.2**, et un test t de Welch a été appliqué en raison de la variance inégale entre les groupes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM) calculée à partir de trois répétitions expérimentales. La signification statistique a été déterminée comme suit : **ns** = non significatif.

5. Discussion

Dans cette étude, le but était de déterminer l'effet direct de la température sur les virus, mais aussi lors de l'infection au moment de l'entrée du virus dans les cellules hôtes. La température ayant un impact sur plusieurs aspects des virus à ARN, nous avons voulu tester les impacts que peut avoir la température sur le virus Ébola, Marburg et les autres filovirus. De façon générale, nous avons trouvé que le virus Ébola était très stable et demeure performant à température élevée. Le virus Marburg est également stable à température élevée, mais un peu moins que le virus Ébola. Les autres filovirus aussi sont stables généralement bien qu'il y ait quelques exceptions comme pour le virus Tai Forest qui lui ne maintient pas une stabilité constante au gradient de température comparativement aux autres filovirus. Nous avons également observé que les cellules sont capables d'internaliser les particules à haute température et même que dans certains cas il y a un plus grand taux d'internalisation dépendamment de la taille de la particule que la cellule absorbe. De plus, nous avons observé que la température de la fièvre, qui de façon générale a été reportée de limiter plusieurs aspects de la réplication des virus à ARN, ne présente pas d'effet négatif sur l'entrée par le virus Ébola particulièrement, mais elle diminue le taux d'infection du virus Marburg à température de la fièvre dans les cellules huh7.5. Nous avons aussi remarqué qu'avec les macrophages différenciés, l'effet de la température n'interfère pas avec l'infection, et ce pour tous les virus y compris le contrôle VSV.

1. Le virus Ébola et les autres filovirus sont stables à température élevée

Dans le cadre de cette étude, nous avons produit des particules pseudo-virales (VLP) de chacun des virus en incorporant la glycoprotéine de chaque virus respectivement. Pour cette expérience nous avons soumis la glycoprotéine des virus EBOV, MARV et VSV à un gradient de température croissant. Nous avons observé que notre contrôle négatif VSV était

instable face à l'augmentation de température. Une baisse considérable du pouvoir infectieux a été observée lorsque le virus était exposé à des températures allant de 40°C ou plus, et à partir de 50°C le virus était presque inactivé (Figure 7). Ceci suggère que le virus VSV présente une sensibilité thermique et qu'il est possible de le désactiver rapidement au moyen de la température. D'autres études ont démontré que l'exposition du virus à des températures élevées réduit sa durée de survie et qu'il était rapidement inactivé par chauffage^{101,106}. Ceci est probablement dû au fait que la structure du virus est sensible à la chaleur, les protéines virales ou les composantes de l'enveloppe virale peuvent être endommagées ou dénaturées à température élevée¹⁰¹. Cette dénaturation peut endommager la capacité du virus à infecter les cellules hôtes.

Cependant, pour EBOV nous avons observé qu'il demeure très stable à température élevée allant jusqu'à 50°C et même qu'il peut être très performant à haute température (Figure 7 et 8). MARV lui en revanche est moins stable que EBOV, car on observe une diminution lorsque la glycoprotéine est prétraitée à 50°C (Figure 7). Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs intrinsèques liés à la glycoprotéine virale tels que :

a. La glycosylation

La glycoprotéine d'Ébola est fortement glycosylée et cette glycosylation est importante pour la fixation du virus aux cellules hôtes, pour la stabilité des GP, pour l'activité de fusion ainsi que pour la protection contre la neutralisation par les anticorps sériques. Les sites de glycosylation de la GP peuvent avoir un impact important sur sa structure tridimensionnelle, son interaction avec les récepteurs cellulaires ainsi que sur son immunogénicité¹⁰². La glycoprotéine d'EBOV possède jusqu'à 17 sites de glycosylations dont 15 se trouvent dans la sous-unité GP1 particulièrement dans la coiffe de glycanes et dans le domaine mucine¹⁰². Cette glycosylation est fortement hétérogène, elle possède plusieurs

types de glucides¹⁰². Des études ont démontré que la glycosylation de la GP d'EBOV stabilise la conformation de la GP et protège la protéine contre toute forme de dénaturation ou de dégradation enzymatique¹⁰². Ceci peut expliquer la grande thermostabilité du virus Ebola face à la dénaturation conformationnel que peut apporter la chaleur sur la glycoprotéine du virus. En revanche VSV est beaucoup moins glycosylé que EBOV, elle possède 6 sites de glycosylation confirmés comparativement à EBOV qui en a 17¹⁰⁶. Ceci peut expliquer la différence de thermostabilité entre les deux virus.

b. Les ponts disulfures

Un autre élément que nous pouvons citer sont les ponts disulfures. La GP des filovirus possède deux sous-unités qui sont la GP1 et la GP2, ces dernières restent attachées ensemble par des ponts disulfures qui jouent un rôle important dans la structure et la fonction de la protéine²⁸. Elles stabilisent la structure tridimensionnelle de la GP en formant des liens covalents entre les résidus cystéine des sous-unités de la protéine²⁸. Étant des liens covalents très stables, les ponts disulfures peuvent être un élément qui renforce la stabilité des glycoprotéines face à la chaleur^{31,108}. En stabilisant la structure de la protéine, ces ponts disulfures peuvent protéger la GP des facteurs intrinsèques ou extrinsèques de l'environnement tels que les attaques enzymatiques ou la chaleur^{107,108}. Les ponts disulfures sont donc un bon élément à prendre en considération.

Nous avons également observé une grande stabilité chez les autres filovirus de la classe des Ebolavirus face à la chaleur. Il s'agit des virus RESTV et BDBV, ces derniers ont présenté une stabilité thermique similaire à celle d'EBOV. Aussi, le virus Lloviu (LLOV) qui fait partie de la classe des cuevavirus présente une forte stabilité thermique similaire à celle d'EBOV. Ceci est probablement dû à la présence des deux motifs de glycane de C-mannosylation, ceux-ci jouent un rôle dans le repliement, et la stabilité des GP¹⁰². Ces motifs

de C-mannosylation des GP sont conservés dans toutes les espèces de la classe des Ébolavirus, chez le virus LLOV mais pas chez le virus MARV¹⁰². Ceci pourrait expliquer pourquoi MARV est moins stable que les Ébolavirus ainsi que LLOV. Cependant, il y a une exception pour le virus TAFV faisant partie de la classe, celui-ci présente une moins grande stabilité que les autres Ébolavirus. Ceci est peut-être dû au fait que TAFV présente une différence génétique et phénotypique comparativement aux autres souches d'Ébolavirus et sa pathogénicité très faible chez les humains. Plus d'investigations ont besoin d'être faites pour comprendre les différences dans la thermostabilité des filovirus.

2. Fièvre et internalisation

L'internalisation des filovirus dans les cellules hôtes se fait par macropinocytose, nous avons donc voulu vérifier l'effet de la température sur l'activité de celle-ci en condition de fièvre. Pour ce faire nous avons utilisé le Dextran qui est un polysaccharide de grande taille et nous avons quantifié son internalisation dans différents types cellulaires en condition de température normale du corps humain soit 37°C et en condition de fièvre soit 39°C. Nous avons observé qu'il n'y avait pas de différence dans l'internalisation du dextran de petite taille et de grande taille en condition de fièvre dans les cellules ht1080 qui sont des cellules représentatives de tissus conjonctifs (Figure 9). Ceci indique que de façon générale, les cellules n'ont pas de problème à internaliser des particules à 39°C.

Cependant, nous avons observé que pour les petites particules, il y avait une légère augmentation de l'internalisation des petites particules à 39°C dans les cellules Huh7.5 qui sont des cellules dérivées des hépatocytes humaines ainsi que dans les cellules thp-1 différenciées en macrophage (Figures 10 et 11). Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'il y a une augmentation de l'activité et de la fluidité membranaire ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette d'actine dans les macrophages en condition de fièvre^{100,109,113}.

a. Réorganisation du cytosquelette d'actine

En condition de fièvre, l'augmentation de température entraîne des changements conformationnels des protéines du cytosquelette d'actine favorisant une réorganisation du cytosquelette d'actine^{109,111,114}. Cette réorganisation du cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la phagocytose, le processus par lequel les macrophages absorbent et détruisent les agents pathogènes^{109,110,111,114}. Elle influence également la motilité des macrophages^{112,100}. Ce phénomène peut expliquer le fait qu'il y a une légère augmentation des particules de Dextran à température de la fièvre.

b. Modulation de la fluidité membranaire

En plus de la réorganisation du cytosquelette, l'augmentation de température en condition de fièvre peut influencer la fluidité membranaire des macrophages^{116,117}. Les lipides membranaires à température élevée ont tendance à être plus mobiles ce qui augmente la fluidité de la membrane cellulaire¹¹⁶. Cette augmentation de la fluidité membranaire favorise l'endocytose, un processus par lequel les macrophages captent les particules étrangères¹¹⁸. Ce phénomène peut aussi justifier l'augmentation de l'internalisation des particules de dextran en condition de fièvre¹⁰⁰.

3. Effet de l'environnement de fièvre sur les virus Ébola et Marburg

Après avoir testé l'effet de la température sur le virus directement, nous avons voulu tester l'effet qu'aurait un environnement de fièvre sur l'internalisation du virus. Pour ce faire, nous avons préchauffé et infecté les cellules à 39°C représentant la température de la fièvre chez l'humain. Premièrement, nous avons observé qu'il n'y avait pas d'effet négatif pour EBOV dans tous les types cellulaires (Figures 12,13 et 14). La température de la fièvre n'a donc aucun effet significatif sur son internalisation dans les cellules. Ceci pourrait être dû à la

thermostabilité intrinsèque du virus qui résiste fortement aux températures élevées (Figure 6). Cela peut être également lié au fait que les Filovirus ont longtemps co-évolué avec les chauves-souris qui ont la particularité de fluctuer énormément de température aux extrêmes⁸. Au moment du vol, la température corporelle des chauves-souris s'élève à plus de 40°C alors que, dans leur torpeur quotidienne, leur température corporelle est nettement plus basse allant jusqu'à 10°C^{91,92}. Ce phénomène est un élément qui a permis au virus de développer une adaptation face à la température.

Pour MARV, nous n'avons observé aucun effet négatif sur l'internalisation du virus en condition de fièvre à 39°C dans les cellules Ht1080 ainsi que dans les macrophages, mais nous avons observé une faible diminution de l'internalisation du virus dans les cellules Huh7.5. Ceci pourrait être expliqué par sa moins grande stabilité thermique en comparaison à EBOV dû au manque de certains motifs de glycanes dans la structure tridimensionnelle de sa GP¹⁰².

Pour VSV, nous avons observé qu'il y avait une diminution de l'infectivité à 39°C dans tous les types cellulaires à l'exception des Thp-1 différenciées en macrophages. Les macrophages sont généralement connus pour être très actifs à température élevée et l'internalisation virale dans celle-ci est possiblement particulièrement rapide^{100,112,120}. Des études ont démontré que des températures élevées peuvent améliorer l'efficacité de l'endocytose en favorisant l'expression et l'activation des récepteurs cellulaires nécessaires à l'attachement et à l'entrée virale dans les macrophages¹¹². Ils ont constaté que l'incubation des cellules à des températures élevées allant de 37 à 40°C, permettait l'augmentation de l'internalisation des particules comparativement à lorsqu'elle était incubée à des températures plus basses allant de 4 à 20°C¹. Ceci peut expliquer le fait que les particules virales sont rapidement internalisées dans les cellules hôte ne laissant pas le temps à la température

d'avoir effet sur le virus. Ceci explique également la grande quantité de dextran internalisée dans les cellules des macrophages comparativement aux autres types cellulaires.

Bien que nous ayons mentionné tous ces éléments, les mécanismes qui bloquent ou diminuent l'internalisation des particules virales à température de la fièvre lors de l'entrée virale restent très flous et peu étudiés. Plus d'investigations ont besoin d'être réalisées afin de bien comprendre les mécanismes d'entrée virale ainsi que l'effet qu'à la température sur celle-ci.

7. Directions futures

Comme direction future, il serait intéressant de vérifier la réplication des filovirus lors de l'infection des cellules après avoir exposé le virus à différentes températures ainsi qu'en condition de fièvre. Étant un virus de niveau BSL-4 nous ne pouvons pas utiliser le véritable virus dans nos laboratoires, mais il existe un système de " Mini-genome assay " qui peut nous permettre d'étudier la réplication du virus.

Il serait également intéressant d'étudier en profondeur la glycosylation de la GP des différents filovirus pour comprendre davantage la thermostabilité de ces dernières. Nous pouvons aussi étudier l'effet de la température fièvre sur l'infection dans des lignées cellulaires d'autres espèces tels que les chauves-souris pour étudier ce qui se passe lors de l'infection des filovirus chez leur hôte naturel.

8. Conclusion

Pour conclure, nous soulignons le fait que le Virus Ébola est particulièrement stable et performant à de hautes températures comparativement au virus MARV qui l'est beaucoup moins. Nous soulignons également le fait que la température n'a pas d'impact particulier sur la macropinocytose, ce qui nous indique que l'internalisation des Filovirus n'est pas affectée au moment de l'infection à la température de la fièvre. Et pour finir, l'impact de la température sur les cellules n'a pas d'effet particulier sur la performance du virus en tant que tel, mais c'est plutôt l'effet de la température directement sur le virus qui a un impact.

L'impact de ce projet est de pouvoir caractériser et comprendre davantage la pathogénicité des filovirus. L'information sur l'effet de la température tel que celle de la fièvre peut avoir un impact clinique sur le traitement des patients atteints du virus. L'information sur la stabilité du virus peut nous aider à comprendre davantage la stabilité du virus ainsi que savoir comment le déstabiliser et l'inactiver. L'étude faite sur les différents filovirus permettra de relever les différences entre eux afin de mieux savoir comment les traiter. Il s'avère que les vaccins contre le virus Ébola Zaïre ne sont pas fonctionnels sur le virus Ébola Soudan ainsi que les autres filovirus, d'où l'importance d'étudier les différents filovirus existants.

Information supplémentaire

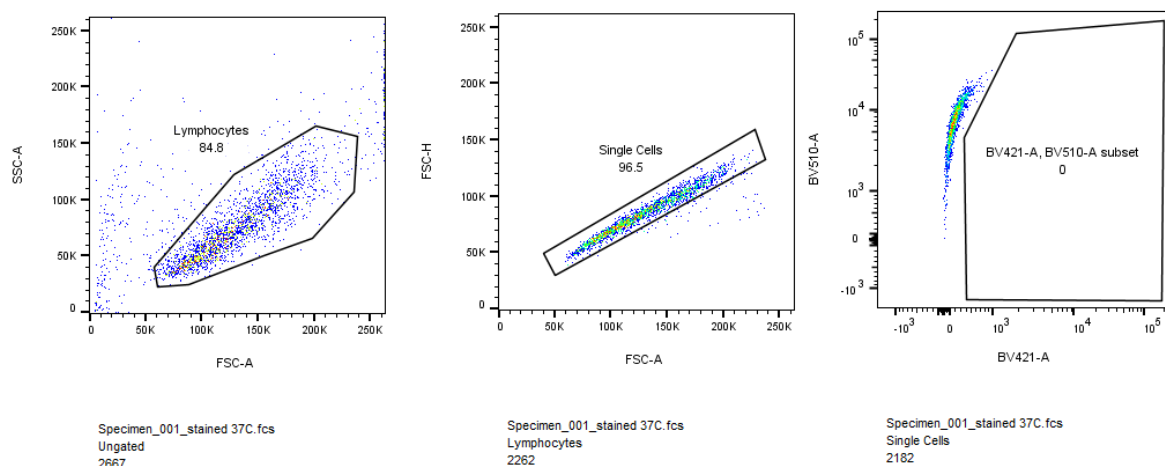


Figure supplémentaire 1. Stratégie de sélection de sous-population pour l'analyse des cellules infectées par Cytométrie de Flux Utilisant le BD Fortessa. L'analyse de cytométrie de flux a été réalisée sur un échantillon coloré à l'aide du BD Fortessa, avec des données analysées à l'aide du logiciel FlowJo. La stratégie de sélection a impliqué les étapes suivantes : 1. **Identification de la Population Initiale** : Le graphique de gauche présente un nuage de points montrant la diffusion latérale (SSC-A) par rapport à la diffusion avant (FSC-A), où les lymphocytes sont identifiés et sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granularité. La population de lymphocytes sélectionnée représente 84,8 % des événements totaux (n = 2 667). 2. **Sélection des Cellules Isolées** : Le graphique du milieu affine davantage la population en sélectionnant les cellules isolées, les distinguant ainsi des doublets et des agrégats. Cette sélection identifie 96,5 % de la population comme étant des cellules isolées (n = 2 262). 3. **Analyse du Sous-ensemble Final** : Le graphique de droite illustre l'analyse de fluorescence de BV421-A par rapport à BV510-A, en se concentrant sur les cellules isolées précédemment identifiées. Le sous-ensemble sélectionné, étiqueté "sous-ensemble BV421-A, BV510-A", montre 0 événement, confirmant la spécificité des marqueurs de fluorescence utilisés. Cette stratégie de sélection permet une discrimination efficace entre les populations de lymphocytes et garantit l'intégrité de l'analyse des cellules isolées pour les applications ultérieures.

9. Références

1. Martini GA, Siegert R, Marburg Virus Disease (1971) Report of the International Commission for the investigation of Marburg Virus Disease. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-65849-4_1
2. Johnson KM, Lange JV, Webb PA, Murphy FA. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*. 1977;1(8011):569-571. DOI: 10.1016/s0140-6736(77)92000-1
3. Alexandra Houot. Le virus Ebola, de sa découverte au développement d'une vaccination efficace. *Sciences pharmaceutiques*. 2016. dumas-01344215
4. Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA. Ebola Virus Disease in Southern Sudan: Hospital Dissemination and Intrafamilial Spread. *Bull World Health Organ*. 1983;61(6):997-1003.
5. Saeed, Shazina, et al. "Ebola Virus: A Global Public Health Menace: A Narrative Review." *Journal of Family Medicine and Primary Care*, vol. 8, no. 7, 2019, p. 2189., https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_297_19.
6. Nicholas, Veronica V, et al. "Distinct Biological Phenotypes of Marburg and Ravn Virus Infection in Macaques." *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 218, no. suppl_5, 2018, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy456>.
7. Werner Slenczka, Hans Dieter Klenk, Quarante ans de virus de Marburg, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 196, Issue Supplement_2, novembre 2007, Pages S131–S135, <https://doi.org/10.1086/520551>
8. Leroy, E.M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.P., Muyembe-Tamfum, J.J., et al. (2009). Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007, *Vector-borne and zoonotic diseases*, 9(6), 723-728.
9. Sullivan, N.J., Geisbert, T.W., Geisbert, J.B., Shedlock, D.J., Xu, L., Lamoreaux, L., et al. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low- dose adenovirus vectors encoding modified GPs, *PLoS Medicine*, 3(6), e177.
10. Colebunders, R., Tshomba, A., Van Kerkhove, M.D., Bausch, D.G., Campbell, P., Libande, M., et al. (2007). Marburg hemorrhagic fever in Durba and Watsa, Democratic Republic of the Congo: clinical documentation, features of illness, and treatment, *Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 148-153
11. CJ Peters, JW Peters, An Introduction to Ebola: The Virus and the Disease, *The Journal of Infectious Diseases*, volume 179, numéro Supplément_1, février 1999, pages ix à xvi, <https://doi.org/10.1086/514322>
12. "Maladie à Virus Ebola Causée Par Le Virus Soudan – Ouganda." *World Health Organization*, World Health Organization, <https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON433>.

13. Baron, R.C., Mc Cormick, J.B., Zubeir, O.A. (1983) Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread, *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), 997-1003
14. Smith, D.I.H. (1978) Ebola hemorrhagic fever in Sudan, 1976, *Bulletin of the World Health Organization*, 56(2), 247-270
15. Johnson, K.M. (1978). Ebola hemorrhagic fever in Zaire, 1976, *Bulletin of the World Health Organization*, 56(2), 271–293.
16. Hayes, C.G., Burans, J.P., Ksiazek, T.G., Del Rosario, R.A., Miranda, M.E., Manaloto, C.R., et al. (1992). Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 46(6), 664-671
17. Jahrling, P.B., Geisbert T.W., Dalgard D.W., Johnson E.D., et al. (1990) Preliminary Report: Isolation of Ebola Virus from Monkeys Imported to USA, *Lancet*, 335(3), 502-505
18. Miranda, M.E.G., Miranda, N.L.J. (2011). Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: a review, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 757-760.
19. Formenty, P., Boesch, C., Wyers, M., Steiner, C. (1999). Ebola Virus Outbreak among Wild Chimpanzees Living in a Rain Forest of Côte d'Ivoire, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 120-126
20. Formenty, P., Hatz, C., Le Guenno, B., Stoll, A. (1999). Human Infection Due to Ebola Virus, Subtype Côte d'Ivoire: Clinical and Biologic Presentation, *Journal of Infectious Disease*, 179(1), 48-53
21. Roddy, P., Howard, N., Van Kerkhove, M.D., Lutwama, J. (2012). Clinical Manifestations and Case Management of Ebola Haemorrhagic Fever Caused by a Newly Identified Virus Strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008, *PLoS One*, 7(12): e52986.
22. Tóth, G.E., Hume, A.J., Suder, E.L. *et al.* Isolation and genome characterization of Lloviu virus from Italian Schreibers's bats. *Sci Rep* 13, 11310 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38364-7>
23. Negrodo A, Palacios G, Vázquez-Morón S, González F, Dopazo H, Molero F, et al. (2011) Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathog* 7(10): e1002304.
24. Yang, XL., Tan, C.W., Anderson, D.E. *et al.* Characterization of a filovirus (Měnglà virus) from *Rousettus* bats in China. *Nat Microbiol* 4, 390–395 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0328-y>
25. Muhammad Munir, Lecturer in Biomedicine. “Mengla: The Ebola-like Virus Recently Found in China.” *The Conversation*, 8 June 2023, theconversation.com/mengla-the-ebola-like-virus-recently-found-in-china-1096.

26. Goldstein, T., Anthony, S.J., Gbakima, A. *et al.* The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat Microbiol* 3, 1084–1089 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2>
27. Karan, L. et coll. Virus Bombali chez les chauves-souris Mops condylurus, Guinée. *Émerger. Infecter. Dis.*
28. Lee JE, Saphire EO. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.* 2009;4(6):621-635. doi: 10.2217/fv1.09.56. PMID: 20198110; PMCID: PMC2829775.
29. Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Dolnik, O., Feldmann, H., Klenk, H.D. (2005). Polymorphism of filovirus glycoproteins, *Advances in virus research*, 64, 359-381. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(05\)64011-0](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(05)64011-0)
30. Geisbert, Thomas W. “Marburg and ebola hemorrhagic fevers (Filoviruses).” *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2015, <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-4801-3.00166-1>.
31. Moller-Tank S, Maury W (2015) Ebola Virus Entry: A Curious and Complex Series of Events. *PLoS Pathog* 11(4): e1004731. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004731>
32. Saeed MF, Kolokoltsov AA, Albrecht T, Davey RA (2010) L'entrée cellulaire du virus Ebola implique une absorption par un mécanisme de type macropinocytose et un trafic ultérieur à travers les endosomes précoces et tardifs. *PLoS Pathog* 6(9) : e1001110. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001110>
33. Mulherkar N, Raaben M, de la Torre JC, Whelan SP, Chandran K. 2011. La glycoprotéine du virus Ebola médie l'entrée via une voie macropinocytaire non classique dépendante de la dynamine. *Virologie* **419** : 72–83. DOI: 10.1016/j.virol.2011.08.009.
34. Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y. 2010. Le virus Ebola est internalisé dans les cellules hôtes via la macropinocytose d'une manière dépendante des glycoprotéines virales. *PLoS Pathog*6: e1001121. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001121.
35. Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, Delos S, Bouton A, White J. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol.* 2006 Apr;80(8):4174-8. doi: 10.1128/JVI.80.8.4174-4178.2006. PMID: 16571833; PMCID: PMC1440424.
36. Bhattacharyya, S., Warfield, K.L., Ruthel, G., Bavari, S. (2010) Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway, *Virology*, 401 (1), 18-28
37. Empig, C.J., Goldsmith, M.A. (2002). Association of the Caveola Vesicular System with Cellular Entry by Filoviruses, *Journal of Virology*, 76(10), 5266-5270
38. Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, et al. (2010). Ebolavirus Is Internalized into Host Cells via Macropinocytosis in a Viral Glycoprotein- Dependent Manner, *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001121.

39. Nanbo, A., Masaki, I., Watanabe, S., Noda, et al. (2010). Cellular Entry of Ebola Virus Involves Uptake by a Macropinocytosis-Like Mechanism and Subsequent Trafficking through Early and Late Endosomes, *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001121.
40. Saeed, M.F., Kolokoltsov, A.A., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R., Davey, R.A. (2008). Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus, *PLoS Pathogens*, 4, e1000141.
41. Brecher, M., Schornberg, K.L., Delos, S.E., Fusco, M.L., Saphire, E.O., White, J.M. (2012). Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change, *Journal of Virology*, 86(1), 364-372.
42. Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., et al. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1, *Nature*, 477(7364), 340-343.
43. Côté, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C. M., et al. (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection, *Nature*, 477(7364), 344-348.
44. Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., et al. (2005), Fruit bats as reservoirs of Ebola virus, *Nature*, 438(7068), 575-576.
45. Towner, J.S., Amman, B.R., Sealy, T.K., Carroll, S.A.R., Comer, J.A., Kemp, A., et al. (2009). Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats, *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000536.
46. Morvan, J. M., Nakouné, E., Deubel, V., Colyn, M. (2000). Ecosystèmes forestiers et virus Ebola. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 93(3), 172-175.
47. Biek, R., Walsh, P. D., Leroy, E. M., & Real, L. A. (2006). Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathogens*, 2(10).
48. Wang, Y., Liu, Z., Dai, Q. (2014). A highly immunogenic fragment derived from Zaire Ebola virus glycoprotein elicits effective neutralizing antibody, *Virus research*, 189, 254-261
49. Kortepeter, M.G., Bausch, D.G., Bray, M. (2011). Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 810-816.
50. Chertow, D.S., Kleine, C., Edwards, J.K., Scaini, R., Giuliani, R., Sprecher, A. (2014). Ebola virus disease in West Africa—clinical manifestations and management, *New England Journal of Medicine*, 371(22), 2054-2057.
51. Bwaka, M.A., Bonnet, M.J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., et al. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 1-7.
52. Bray M, Geisbert TW. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005

Aug;37(8):1560-1566. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.018. Epub 2005 Mar 7. PMID: 15896665.

53. Geisbert, T. W., Hensley, L.E., Larsen, T., Young, H.A., Reed, D.S., Geisbert, J.B., et al. (2003). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection, *The American journal of pathology*, 163(6), 2347-2370
54. Basler, C.F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., et al. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12289-12294.
55. Mateo, M., Carbonnelle, C., Reynard, O., Kolesnikova, L., Nemirov, K., Page, A., et al. (2011). VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1011-1020.
56. Falasca, L., Agrati, C., Petrosillo, N., Di Caro, A., Capobianchi, M.R., Ippolito, G., Piacentini, M. (2015). Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: focus on cell death, *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1250-1259.
57. Mahanty, S., Bray, M. (2004). Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers, *The Lancet infectious diseases*, 4(8), 487-498.
58. Messaoudi, I., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2015). Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus, *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 663-676.
59. Wauquier, N., Becquart, P., Padilla, C., Baize, S., Leroy, E.M. (2010). Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis, *PLoS Negl Trop Dis*, 4(10), e837.
60. Basler, C.F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., et al. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12289-12294.
61. Mateo, M., Carbonnelle, C., Reynard, O., Kolesnikova, L., Nemirov, K., Page, A., et al. (2011). VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs, *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 1011-1020
62. Villinger, F., Rollin, P.E., Brar, S.S., Chikkala, N.F., Winter, J., Sundstrom, J.B., et al. (1999). Markedly elevated levels of interferon (IFN)- γ , IFN- α , interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor- α associated with fatal Ebola virus infection, *Journal of Infectious Diseases*, 179(1), 188-191
63. Martines, R.B., Ng, L.D., Greer, P.W., Rollin, P.E., et al. (2015). Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses, *Journal of Pathology*, 235(2), 153-174.
64. Gedigk P, Korb G, Bechtelsheimer H. L'anatomie pathologique de la maladie à virus de Marburg. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1968 ; 52 : 317 – 320.

65. Bisht K, de Vethuis UNJ, W. 2022. Décoder le rôle de la température dans les infections par virus à ARN. *mBio* 13 : e02021-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.02021-22>
66. Chen H, Smith GJD, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y. 2005. Grippe aviaire : épidémie de virus H5N1 chez la sauvagine migratrice. *Nature* 436 : 191-192.
67. Dalton RM, Mullin AE, Amorim MJ, Medcalf E, Tiley LS, Digard P. 2006. La réplication du génome du virus de la grippe A sensible à la température résulte de la faible stabilité thermique des complexes polymérase-ARNc. *Virology* 358:58.
68. Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Kalonji N, Deng X, Momma H, Shimotai Y, Nagatomi R. 2019. Effets de la température élevée sur la réplication virale de la grippe humaine pandémique et saisonnière et les dommages induits par l'infection dans les cultures primaires de cellules épithéliales trachéales humaines. *Héliyon* 5 : e01149.
69. Meyer A, Freier M, Schmidt T, Rostowski K, Zwoch J, Lilie H, Behrens SE, Friedrich S. 2020. Une activité de thermomètre à ARN de l'élément tige-boucle génomique 3'-terminal du virus du Nil occidental module l'efficacité de la réplication virale pendant l'hôte commutation. *Virus* 12:104.
70. Li XD, Deng CL, Yuan ZM, Ye HQ, Zhang B. 2020. Différents degrés d'interactions DAR 5'-à-3' modulent la cyclisation du génome du virus Zika et la réplication spécifique à l'hôte. *J Virol* 94 : e01602-19.
71. Ackermann M, Padmanabhan R. 2001. La synthèse de novo de l'ARN par l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus de la dengue présente une dépendance à la température lors de la phase d'initiation mais pas d'élongation. *J Biol Chem* 276 : 39926-39937.
72. Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Kalonji N, Deng X, Momma H, Shimotai Y, Nagatomi R. 2019. Effets de la température élevée sur la réplication virale de la grippe humaine pandémique et saisonnière et les dommages induits par l'infection dans les cultures primaires de cellules épithéliales trachéales humaines. *Héliyon* 5 : e01149.
73. Herder V, Dee K, Wojtus JK, Epifano I, Goldfarb D, Rozario C, Gu Q, Da Silva Filipe A, Nomikou K, Nichols J, Jarrett RF, Stevenson A, McFarlane S, Stewart ME, Szemiel AM, Pinto RM, Masdefiol Garriga A, Davis C, Allan J, Graham SV, Murcia PR, Boutell C. 2021. La température élevée inhibe la réplication du SRAS-CoV-2 dans l'épithélium respiratoire indépendamment des défenses immunitaires innées médiées par l'IFN. *PLoS Biol* 19 : e3001065.
74. Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, Wasik BR, Hou L, Zhao H, Turner PE, Pyle AM, Iwasaki A. 2015. La défense innée dépendante de la température contre le virus du rhume limite la réplication virale à température chaude dans les cellules des voies respiratoires de souris. *Proc Natl Acad Sci USA* 112 : 827-832.
75. V'kovski P, Gultom M, Kelly JN, Steiner S, Russeil J, Mangeat B, Cora E, Pezoldt J, Holwerda M, Kratzel A, Laloli L, Wider M, Portmann J, Tran T, Ebert N, Stalder H, Hartmann R, Gardeux V, Alpern D, Deplancke B, Thiel V, Dijkman R. 2021.

Dynamiques virus-hôte disparates dépendant de la température pour le SRAS-CoV-2 et le SRAS-CoV dans l'épithélium respiratoire humain. *PLoS Biol* 19 : e3001158

76. Salata C, Calistri A, Alvisi G, Celestino M, Parolin C, Palù G. Entrée du virus Ebola : de la caractérisation moléculaire à la découverte de médicaments. *Virus*. 2019 ; 11(3):274. <https://doi.org/10.3390/v11030274>
77. Sanchez, Anthony, et al. "Sequence Analysis of the Ebola virus genome: Organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus." *Virus Research*, vol. 29, no. 3, Sept. 1993, pp. 215–240, [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(93\)90063-s](https://doi.org/10.1016/0168-1702(93)90063-s).
78. Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*. 1985 Nov;147(1):169-76. doi: 10.1016/0042-6822(85)90236-3. PMID: 4060597. (Pour analyse protéine ebov)
79. "Family: Filoviridae." *ICTV*, ictv.global/report/chapter/filoviridae/filoviridae. Accessed 27 May 2024. Viralzone : <https://viralzone.expasy.org/23>
80. Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3602-7. PMID: 8622982; PMCID: PMC39657. [10.1073/pnas.93.8.3602](https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3602)
81. Wahl-Jensen VM, Afanasieva TA, Seebach J, Ströher U, Feldmann H, Schnittler HJ. Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. *J Virol*. 2005 Aug;79(16):10442-50. PMID: 16051836; PMCID: PMC1182673. DOI: [10.1128/JVI.79.16.10442-10450.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10442-10450.2005)
82. Yang ZY, Duckers HJ, Sullivan NJ, Sanchez A, Nabel EG, Nabel GJ. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med*. 2000 Aug;6(8):886-9. doi: 10.1038/78645. PMID: 10932225.
83. Cook JD, Lee JE (2013) The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion. *PLoS Pathog* 9(5): e1003258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003258>
84. Francica JR, Varela-Rohena A, Medvec A, Plesa G, Riley JL, Bates P (2010) Steric Shielding of Surface Epitopes and Impaired Immune Recognition Induced by the Ebola Virus Glycoprotein. *PLoS Pathog* 6(9): e1001098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001098>
85. Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pöhlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*. 2003 Jan 5;305(1):115-23. doi: 10.1006/viro.2002.1730. PMID: 12504546.
86. Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol*. 2006 Oct;80(20):10109-16. doi: 10.1128/JVI.01157-06. PMID: 17005688; PMCID: PMC1617303.

87. Gregory SM, Harada E, Liang B, Delos SE, White JM, Tamm LK. Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):11211-6. doi: 10.1073/pnas.1104760108. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21690393; PMCID: PMC3131375.
88. Biedenkopf N, Hartlieb B, Hoenen T, Becker S. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem*. 2013 Apr 19;288(16):11165-74. doi: 10.1074/jbc.M113.461285. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23493393; PMCID: PMC3630872.
89. Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, et al. (2006) Assembly and Budding of *Ebolavirus*. *PLoS Pathog* 2(9): e99. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020099>
90. Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol*. 2002 May;76(10):4855-65. doi: 10.1128/jvi.76.10.4855-4865.2002. PMID: 11967302; PMCID: PMC136157.
91. Leendertz, Siv Aina, et al. “Assessing the evidence supporting fruit bats as the primary reservoirs for ebola viruses.” *EcoHealth*, vol. 13, no. 1, 13 Aug. 2015, pp. 18–25, <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1053-0>.
92. Fumagalli, Maria Rita, et al. “Role of body temperature variations in bat immune response to viral infections.” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 18, no. 180, July 2021, p. 20210211, <https://doi.org/10.1098/rsif.2021.0211>.
93. Morvan JM, Deubel V, Gounon P, Nakouné E, Barrière P, Murri S, Perpète O, Selekon B, Coudrier D, Gautier-Hion A, Colyn M, Volehkov V. Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(14):1193-201. PMID: 10580275. DOI: [10.1016/s1286-4579\(99\)00242-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)00242-7)
94. Taylor, D.J., Leach, R.W. & Bruenn, J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol* 10, 193 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>
95. Leroy E, Pourrut X, Gonzalez JP. Les chauves-souris, réservoirs du virus Ebola: le mystère se dissipe [Bats, reserves of the Ebola virus: the mystery is dissipated]. *Med Sci (Paris)*. 2006 Jan;22(1):78-9. French. PMID: 16386226. DOI: [10.1051/medsci/200622178](https://doi.org/10.1051/medsci/200622178)
96. “Ground Zero in Guinea: The Ebola Outbreak Smoulders – Undetected – for More than 3 Months.” *World Health Organization*, World Health Organization, www.who.int/news/item/04-09-2015-ground-zero-in-guinea-the-ebola-outbreak-smoulders-undetected-for-more-than-3-months. Accessed 27 May 2024.
97. Bausch DG, Towner JS, Dowell SF, Kaducu F, Lukwiya M, Sanchez A, Nichol ST, Ksiazek TG, Rollin PE. Assessment of the risk of Ebola virus transmission from bodily fluids and fomites. *J Infect Dis*. 2007 Nov 15;196 Suppl 2: S142-7. PMID: 17940942. DOI: [10.1086/520545](https://doi.org/10.1086/520545)

98. Richards P, Amara J, Ferme MC, Kamara P, Mokuwa E, Sheriff AI, et al. (2015) Social Pathways for Ebola Virus Disease in Rural Sierra Leone, and Some Implications for Containment. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4): e0003567. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003567>
99. Immunité : l'armée qui nous protège, infection et fièvre. www.linternaute.com/science/biologie/dossiers/07/immunité/6.shtml.
100. Zynda, E. R., Grimm, M. J., Yuan, M., Zhong, L., Mace, T. A., Capitano, M., ... Repasky, E. A. (2015). A role for the thermal environment in defining co-stimulation requirements for CD4+ T cell activation. *Cell Cycle*, 14(14), 2340–2354. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1049782>
101. Zimmer B, Summermatter K, Zimmer G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype rhabdovirus. *Vet Microbiol.* 2013 Feb 22;162(1):78-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.023. Epub 2012 Sep 1. PMID: 22995872.
102. Peng W, Rayaprolu V, Parvate AD, Pronker MF, Hui S, Parekh D, Shaffer K, Yu X, Saphire EO, Snijder J. Glycan shield of the ebolavirus envelope glycoprotein GP. *Commun Biol.* 2022 Aug 4 ;5(1) :785. doi : 10.1038/s42003-022-03767-1. PMID : 35927436 ; PMCID : PMC9352669.
103. Noda TSagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y 2002. Ebola Virus VP40 Drives the Formation of Virus-Like Filamentous Particles Along with GP. *J Virol* 76: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4855-4865.2002>
104. Li L, Wan T, Wan M, Liu B, Cheng R, Zhang R. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol Int.* 2015 May;39(5):531-9. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25623938. DOI: [10.1002/cbin.10424](https://doi.org/10.1002/cbin.10424)
105. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet.* 2011 Mar 5;377(9768):849-62. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60667-8. PMID: 21084112; PMCID: PMC3406178. DOI: [10.1016/S0140-6736\(10\)60667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60667-8)
106. Machamer CE, Rose JK. Influence of new glycosylation sites on expression of the vesicular stomatitis virus G protein at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1988 Apr 25;263(12):5948-54. PMID: 2833523.
107. Jeffers SA, Sanders DA, Sanchez A. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *J Virol.* 2002 Dec;76(24):12463-72. doi: 10.1128/jvi.76.24.12463-12472.2002. PMID: 12438572; PMCID: PMC136726
108. Barrientos LG, Martin AM, Rollin PE, Sanchez A. Disulfide bond assignment of the Ebola virus secreted glycoprotein SGP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 15;323(2):696-702. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.148. PMID: 15369806.
109. Ronzier E, Laurenson AJ, Manickam R, Liu S, Saintilma IM, Schrock DC, Hammer JA, Rotty JD. The Actin Cytoskeleton Responds to Inflammatory Cues and Alters Macrophage Activation. *Cells.* 2022 May 31;11(11):1806. doi: 10.3390/cells11111806. PMID: 35681501; PMCID: PMC9180445.

110. Jönsson F, Gurniak CB, Fleischer B, Kirfel G, Witke W (2012) Immunological Responses and Actin Dynamics in Macrophages Are Controlled by N-Cofilin but Are Independent from ADF. *PLoS ONE* 7(4): e36034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036034>
111. Moral J, Montilla-Bascón G, Canales FJ, Rubiales D, Prats E. Cytoskeleton reorganization/disorganization is a key feature of induced inaccessibility for defence to successive pathogen attacks. *Mol Plant Pathol.* 2017 Jun;18(5):662-671. doi: 10.1111/mpp.12424. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27147535; PMCID: PMC6638220.
112. Lee CT, Zhong L, Mace TA, Repasky EA. Elevation in body temperature to fever range enhances and prolongs subsequent responsiveness of macrophages to endotoxin challenge. *PLoS One.* 2012;7(1): e30077. doi: 10.1371/journal.pone.0030077. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22253887; PMCID: PMC3254634.
113. Lee C-T and Repasky EA (2012) Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activation state? *Front. Immun.* 3:140. doi: 10.3389/fimmu.2012.00140
114. Colonne PM, Winchell CG, Voth DE. Hijacking Host Cell Highways: Manipulation of the Host Actin Cytoskeleton by Obligate Intracellular Bacterial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Sep 22; 6:107. doi: 10.3389/fcimb.2016.00107. PMID: 27713866; PMCID: PMC5031698.
115. Chandler, Stephanie. (2024, June 5). The Effect of Temperature on Cell Membranes. *sciencing.com*. Retrieved from <https://sciencing.com/effect-temperature-cell-membranes-5516866.html>
116. De la Haba C, Morros A, Martínez P, Palacio JR. LPS-Induced Macrophage Activation and Plasma Membrane Fluidity Changes are Inhibited Under Oxidative Stress. *J Membr Biol.* 2016 Dec;249(6):789-800. doi: 10.1007/s00232-016-9927-9. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27619206.
117. Guihur A, Rebeaud ME, Fauvet B, Tiwari S, Weiss YG, Goloubinoff P. Moderate Fever Cycles as a Potential Mechanism to Protect the Respiratory System in COVID-19 Patients. *Front Med (Lausanne).* 2020 Sep 11;7:564170. doi: 10.3389/fmed.2020.564170. PMID: 33043037; PMCID: PMC7517715.
118. Noutsi P, Gratton E, Chaieb S. Assessment of Membrane Fluidity Fluctuations during Cellular Development Reveals Time and Cell Type Specificity. *PLoS One.* 2016 Jun 30;11(6):e0158313. doi: 10.1371/journal.pone.0158313. PMID: 27362860; PMCID: PMC4928918.
119. Lu J, Gullett JM, Kanneganti TD. Filoviruses: Innate Immunity, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. *Pathogens.* 2022 Nov 23;11(12):1400. doi: 10.3390/pathogens11121400. PMID: 36558734; PMCID: PMC9785368.
120. “Advancing Understanding of Filoviruses: From Pathogenesis to Therapeutic Strategies.” *Frontiers*, www.frontiersin.org/research-topics/59161/advancing-

understanding-of-filoviruses-from-pathogenesis-to-therapeutic-strategies. Accessed 5 June 2024

121. Tomoda H, Kishimoto Y, Lee YC. Temperature effect on endocytosis and exocytosis by rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1989 Sep 15;264(26):15445-50. PMID: 2768271.
122. Stoorvogel W, Geuze HJ, Griffith JM, Strous GJ. The pathways of endocytosed transferrin and secretory protein are connected in the trans-Golgi reticulum. *J Cell Biol*. 1988 Jun;106(6):1821-9. doi: 10.1083/jcb.106.6.1821. PMID: 3260238; PMCID: PMC2115149.
123. Takada, Ayato. "Ebola virus and other Filoviruses." *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 2022, pp. 292–300, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818731-9.00026-4>.
124. Balli S, Shumway KR, Sharan S. Physiologie, fièvre. [Mis à jour le 4 septembre 2023]. Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing ; 2024 janv.-. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562334/>
125. Jones, Daniel M., and Sergi Padilla-Parra. "The β -Lactamase Assay: Harnessing a FRET Biosensor to Analyse Viral Fusion Mechanisms." *MDPI*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 23 June 2016, www.mdpi.com/1424-8220/16/7/950.