

**LE VIRUS M'POKO (BA 365)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS ISOLÉ
EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE (*)**

par J.-P. DIGOUTTE, F.-X. PAJOT, BRIAN E. HENDERSON, P. BRÈS
et P. NGUYEN TRUNG LUONG

(avec la collaboration technique de P. DIEDERICH)

(Institut Pasteur de Bangui, Office de la Recherche Scientifique
et Technique Outre-Mer, Bangui, East African Research Institute,
Entebbe et Institut Pasteur de Dakar)

SUMMARY

A new type of arbovirus, M'Poko virus (IP BA 365) has been isolated from a batch of mosquitoes captured in 1966 on the bank of a river near a site called « M'Poko Bridge ». The prototype was isolated from a pool of mixed mosquitoes in which three species predominated: *Culex Culex pruina*, *Culex Culex weschei* and *Culex Culex perfuscus*. The survival of inoculated new-born mice was eight days at the time of isolation and two days after the second passage. The virus has shown the physical and chemical properties of an arbovirus but it has not yielded an hemagglutinating antigen. By complement fixation, the strain is closely related to Yaba I of the Simbu group and cross reacts with Turlock and Umbre viruses. By neutralisation tests, Yaba I and M'Poko are distinct. M'Poko serves as a « link » between the Simbu and the Turlock groups.

The same virus was isolated from two pools of mixed *Culex* and from a pool of *Culex Culex perfuscus*.

The ecological cycle seems to develop in the savanna forest mosaic near Bangui. The human incidence seems to be low.

**

Key words: Arboviruses. M'Poko virus. Arboviruses epidemiology.

INTRODUCTION

Les enquêtes sérologiques préliminaires entreprises en République Centrafricaine ont mis en évidence la présence d'anticorps anti-arbovirus chez de nombreux sujets, mais la gamme d'antigènes a été choisie arbitrairement en fonction de ce qui avait été utilisé par les chercheurs d'Entebbe et de Dakar. Afin de connaître de manière plus exacte les virus en circulation et

(*) Manuscrit reçu le 16 janvier 1970.

leurs vecteurs, les captures de moustiques et les prélèvements de sérums ont été multipliés. Ceci nous a conduit à l'isolement de plusieurs souches de virus déjà cataloguées, puis de quatre souches d'un même virus lié à Yaba I mais possédant cependant des différences antigéniques qui permettent de le considérer comme différent des virus connus actuellement. Il est présenté sous l'appellation de M'Poko.

La première souche, considérée comme prototype, a été isolée de *Culex* divers capturés le 21 novembre 1966 à 12 km au sud de Bangui au lieu dit « Pont de la M'Poko », à la limite nord de la forêt équatoriale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° MOUSTIQUES.

En 1966, les captures de moustiques étaient réalisées par prélèvement direct au tube de verre. Les femelles venaient se poser sur l'homme servant d'appât et cette récolte était effectuée par chacun des captureurs sur lui-même. Les *Culex* vecteurs de BA 365 furent pris au cours d'une capture de jour de 12 heures. La souche fut isolée d'un lot de 116 *Culex* divers constitués d'individus appartenant en majorité à l'une des trois espèces suivantes : *Culex Culex pruina* Theobald, *Culex Culex weschei* Edwards et *Culex Culex perfuscus* Edwards.

2° INOCULATIONS.

Les inoculations étaient pratiquées chez des souriceaux que nous considérons comme nouveau-nés du jour, c'est-à-dire nés entre la veille treize heures et le matin de l'inoculation. Les moustiques étaient broyés dans un mortier de porcelaine avec 6 ml de liquide de Hanks albuminé additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Trois portées ont été inoculées, deux avec le produit pur, une avec le produit dilué à 1/5, par voie mixte intrapéritonéale (0,02 ml) et intracérébrale (0,02 ml).

Les passages suivants ont été inoculés par voie intracérébrale seulement, un cerveau étant broyé dans 2 ml de diluant.

Les réislements ont été tentés par inoculation, dans des conditions techniques identiques à celles de l'isolement, du broyat de moustiques conservé à -65°C .

3° MÉTHODES D'IDENTIFICATION.

Nous avons recherché la sensibilité des souches au désoxycholate de soude selon la méthode originale de Theiler [41] et la technique de Chastel [2]. Les tests à l'éther ont été conduits selon la méthode de Sunaga [40].

Les réactions d'inhibition de l'hémagglutination ont été mises en œuvre en plaque O.M.S. selon la méthode de Clarke et Casals [3] avec des antigènes préparés au saccharose acétone ou au fréon 113 [8]. Les mêmes antigènes préparés au saccharose acétone ont été utilisés dans les réactions de fixation du complément suivant la méthode L. B. C. F. [4] adaptée par Sever [9] à la microtechnique sur plaque.

Pour les identifications, les techniques de séro-neutralisation étaient exécutées en mettant en présence pendant une heure au bain-marie à 37°C le sérum à étudier et le virus en dilutions successives de raison 10.

Dans les enquêtes sérologiques, nous employions la technique de Causey [4] utilisant 0,1 ml de virus en dilution progressive, 0,1 ml de sérum à tester et 0,2 ml de sérum frais de cobaye, maintenus pendant une heure au bain-marie

à 37° C avant de les inoculer au souriceau par voie intracérébrale. Un sérum de souris était utilisé comme témoin négatif.

Les identifications ont été menées, soit avec des sérums hyperimmuns de souris, récoltés après inoculation intrapéritonéale de suspension de cerveau de souriceaux infectés, soit avec des liquides d'ascite obtenus avec la souche de Sarcome T 180.

RÉSULTATS

I. — HISTORIQUE DES PASSAGES

Sur les 2 portées inoculées avec le produit non dilué, 2 souriceaux disparurent, au troisième jour et au septième jour, et 2 furent prélevés au huitième jour, présentant une légère parésie du train postérieur. Les autres restaient indemnes durant les vingt et un jours d'observation ainsi que tous les souriceaux inoculés avec le produit dilué à 1/5. Le temps de survie fut de trois à quatre jours au premier passage, puis se stabilisa à deux jours à partir du deuxième. Tenté sur le broyat conservé cinquante-cinq jours à -65° C, le réisolement a échoué.

II. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

La suspension virale du huitième passage a été utilisée pour les deux tests à l'éther et au désoxycholate. Le titre chute de plus de 5 log. en présence de désoxycholate et de plus de 4 log. en présence d'éther. Le titre sur souriceau de soixante-douze heures au huitième passage a atteint $10^{7,6} \text{DL}_{50}/0,02 \text{ ml}$. La lyophilisation des cerveaux de ce même passage dans du sérum de cobaye inactivé a fourni une suspension ayant exactement le même titre.

III. — POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Par inoculation intracérébrale chez des souris sevrées, âgées de 21 jours, le titre a atteint $10^{7,5} \text{DL}_{50}/0,03 \text{ ml}$. Par contre, la souche n'est pas pathogène par voie intrapéritonéale pour la souris adulte.

La suspension virale du huitième passage inoculée aux cellules HeLa, a donné un effet cytopathogène au huitième jour et le titre s'éleva à $10^{7,4} \text{DCP}_{50}/0,10 \text{ ml}$.

Examiné selon la technique de Porterfield, modifiée par Hannoun [7] sur fibroblastes de poulet, le virus a donné au troisième jour des plages de 2 à 3 mm de diamètre qui grandissent progressivement pour atteindre 6 à 8 mm de diamètre au huitième jour. Le titre était identique à celui que l'on obtenait sur cellules HeLa.

IV. — PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES

Tous les essais de préparation d'un antigène hémagglutinant ont échoué, que ce soit par la méthode au saccharose acétone ou au fréon 113.

L'antigène saccharose acétone testé en fixation du complément avec le sérum hyperimmun de souris obtenu après trois inoculations intrapéritonéales

de la souche homologue eut un titre optimum de 1/64, le titre maximum du sérum étant identique.

Dans un premier temps, l'antigène dilué à 1/16 a été éprouvé par l'un d'entre nous (P. B.) contre 47 arbovirus différents isolés en Afrique. Les résultats ont été négatifs avec les sérums hyperimmuns suivants :

Groupe A : Chikungunya, O'Nyong-nyong, Middelburg, virus de la Forêt de Semliki, Sindbis, Ndumu.

Groupe B : Ntaya, Wesselsbronn, Usutu, West-Nile, Dakar Chauve-Souris Uganda S, Fièvre Jaune (souche neurotrope française), Zika, Spondweni, Bukalasa Bat, Entebbe Bat.

Groupe Bunyamwera : Bunyamwera, Germiston, Ilesha, Olifantsvlei, Shokwe.

Groupe Bwamba : Bwamba, Pongola.

Groupe Simbu : Simbu, Ingwavuma, Yaba 7.

Non groupés : vecteurs Tiques, Quaranfil, Chenuda, Nyamamini, Thogoto, Wad Medani, Bandia.

Autres vecteurs, Lebombo, Lumbo, Mossuril, Nyando, Tanga, Tataguine, Witwatersrand, Lagos Bat.

Non classés : IPD/RV 318, IPD/RV 401, IPD/SH 763, YM 31, YM 176, YM 50.

Adressée au Centre International de Référence (Dr R. E. Shope), cette souche a été testée en fixation du complément avec Yaba I et les virus du groupe Turlock. Les résultats sont donnés dans le tableau I (Shope R. E., communication personnelle).

Cette souche a été reprise en réaction de séro-neutralisation à l'East African Research Institute à Entebbe par l'un d'entre nous (B. E. A.) et

TABLEAU I. — Réaction de fixation du complément avec : BA 365, Turlock, Umbre, Yaba I (Yaru).

ANTIGÈNES	SÉRUMS LIQUIDES D'ASCITE			
	Turlock Liquide d'ascite	Umbre Sérum	Yaba I Sérum	BA. 365 Liquide d'ascite
Turlock	64/256 (*)	64/64	16/64	4/256
Umbre	8/16	128/64	8/4	2/4
Yaba I	8/64	16/64	256/256	16/1024
BA 365	4/64	16/64	256/64	16/256
Cerveau normal de souris ceau	0/0	0/0	0/0	0/0

(*) Titre du sérum/antigène.

comparée aux souches Yaba I, Simbu et Ingwavuma. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

Si la réaction de fixation du complément montre que la souche BA 365 est proche de Yaba I et présente des réactions croisées avec Turlock et Umbre, les réactions de séro-neutralisation par contre montrent que Yaba I et BA 365 sont distinctes puisque le sérum hyperimmun BA 365 ne neutralise pas Yaba I et que le sérum Ingwavuma neutralise Yaba I alors qu'il ne neutralise pas BA 365.

Ces différents résultats prouvent que le virus BA 365 peut être considéré comme un nouveau prototype apparenté au groupe Turlock en fixation du complément, et au groupe Simbu en réaction de séro-neutralisation.

TABLEAU II. — Séro-neutralisation de BA 365 et Yaba I avec différents immunsérums du groupe Simbu.

VIRUS	SÉRUM			
	Yaba I (Z 5810)	BA 365 (672698)	Simbu (Z 5431)	Ingwavuma (Z 5330)
Yaba I	4,0 *	0,2	0,5	3,0
BA 365 ...	5,5	5,5	1,0	0,5

(*) Indice de neutralisation.

V. — AUTRES ISOLEMENTS DU VIRUS M'POKO

Depuis l'isolement de la souche BA 365 sur 2 000 lots de moustiques inoculés, 3 autres souches du virus M'Poko ont été mises en évidence : BA 451, BA 656 et BA 1111.

TABLEAU III. — Caractéristiques d'isolement de BA 451, BA 656 et BA 1 111.

	NUMÉRO DES SOUCHES		
	BA 451	BA 656	BA 1111
Lieu d'isolement	Plantation Armando 20 km Est de Bangui	Botambi 20 km Sud de Bangui	Ouango Banlieue Est Bangui
Temps d'incubation à l'isolement	8 à 19 jours	6 à 14 jours	6 à 10 jours
Temps de survie au P ₁	72 heures	5 à 7 jours	3 à 4 jours
Temps de survie au P ₂	48 heures	48 heures	48 heures
Réisolement	0	+	+

De même que la souche prototype, BA 451 et BA 656 furent isolées de lots de *Culex* divers constitués en majorité d'individus des trois espèces citées plus haut ; par contre, BA 1111 fut isolé d'un lot monospécifique de *Culex Culex perfuscus*. Les caractéristiques d'isolement des trois virus sont données dans le tableau III.

Les trois souches ont été comparées en fixation du complément et en séro-neutralisation et ont donné des réactions croisées dans les deux sens ; elles sont identiques entre elles et identiques au prototype, le virus M'Poko.

VI. — ENQUÊTE SÉROLOGIQUE

Nous avons recherché les anticorps neutralisant le virus M'Poko dans des sérums prélevés chez des personnes vivant dans un village proche du lieu où furent capturés les moustiques vecteurs de la souche prototype. Quarante-trois sérums ont été examinés en séro-neutralisation quantitative : les résultats sont les suivants :

Indice de neutralisation	2 à 2,5	1,5 à 2	1 à 1,5	< 1
Nombre de sérums	1	1	9	32
Tranche d'âge :				
5 à 9 ans		1	4	5
10 à 14 ans			1	10
15 à 19 ans	1		2	8
20 ans et au-dessus			2	9

Par ailleurs, de 1966 à 1968, nous avons inclus cet antigène dans la gamme utilisée pour tester les sérums précoces et tardifs de 60 malades suspects d'arbovirose : nous n'avons relevé aucune réaction positive, que ce soit chez des malades atteints de fièvre exanthématique, de syndrome méningé ou simplement d'affections fébriles inexplicées.

DISCUSSION

La réalité de l'isolement du virus M'Poko est certaine puisqu'il s'agit d'un virus nouveau. Les essais d'identification ont prouvé qu'il n'existait aucune relation avec un virus de la collection de l'Institut Pasteur de Bangui. A l'époque de l'isolement, nous ne possédions aucune souche du groupe Turlock ou Simbu.

Le virus M'Poko semble assez répandu dans les alentours immédiats de Bangui ; il a été isolé à quatre reprises, d'abord de *Culex* indéterminés, puis d'un lot monospécifique de *Culex Culex perfuscus* qui est donc un des vecteurs probables.

Culex perfuscus est abondant dans les galeries forestières des savanes au nord de Bangui, mais est aussi communément rencontré en forêt au sud de Bangui (forêt de Botambi). Nous l'avons également capturé au bord et

sur quelques îles de l'Oubangui. Les récoltes ont eu lieu de jour sur appât humain mais quelques femelles ont aussi été prises lors de captures de nuit, ce qui a été également constaté par Van Someren et coll. [12] sur la côte du Kenya, Hamon [6] en Haute-Volta et Hamon et coll. [5] au Mali.

Le tableau des caractéristiques d'isolement montre bien que pour cette dernière souche il ne peut s'agir d'une contamination à partir des précédentes car il lui a fallu deux passages pour parvenir au temps moyen de survie de la souche prototype.

Le cycle écologique de ce virus paraît se dérouler dans cette mosaïque forêt-savane proche de Bangui où la forêt équatoriale a été savanisée par plaques à la suite de l'extension des cultures. Il n'a jamais été isolé au cours de nos prospections en savane arborée malgré les très nombreuses captures qui y ont été effectuées; 1 520 lots de moustique ont été inoculés en provenance de cette zone.

Son rôle en pathologie humaine paraît minime et l'homme intervient sans doute à titre tout à fait exceptionnel dans le cycle. Le pourcentage d'anticorps neutralisant est faible. Aucune conversion n'a été mise en évidence chez des malades suspects d'arboviroses. Aucune souche n'a été isolée de 611 sérums inoculés de 1966 à 1968.

L'originalité du virus M'Poko réside dans sa double parenté avec le groupe Turlock et le groupe Simbu. En fixation du complément (tableau I), il est très proche de Yaba I, et, comme Yaba I, il présente des réactions croisées avec Turlock et Umbre. Cette relation avec Yaba I est très étroite puisque les deux immunsérums ont des titres identiques en présence des deux antigènes. En réaction de séro-neutralisation (tableau II) par contre, les deux virus Yaba I et M'Poko sont différents; en effet le sérum Yaba I neutralise les deux virus mais le sérum M'Poko ne neutralise pas Yaba I. Le sérum Ingwavuma du groupe Simbu neutralise Yaba I mais ne neutralise pas M'Poko. Ainsi M'Poko, s'il appartient au groupe Turlock en fixation du complément, a malgré tout quelques parentés avec le groupe Simbu et peut être considéré, ainsi que Yaba I d'ailleurs, comme un lien entre les deux groupes.

RÉSUMÉ

Un nouveau prototype d'arbovirus (IPBA 365) a été isolé durant 1966 en République Centrafricaine sur les berges d'une rivière au lieu dit « Pont de la M'Poko ». Le lot de moustiques qui a permis l'isolement de la souche prototype était composé d'un mélange de *Culex* où prédominaient trois espèces: *Culex pruina*, *Culex weschei* et *Culex perfuscus*. Le temps de survie fut de huit jours à l'isolement et de deux jours après adaptation à partir du deuxième passage. Cette souche est sensible à l'éther et au désoxycholate. L'antigène, extrait par la méthode au saccharose acétone, fixe le complément en présence d'un sérum homologue hyperimmum de souris mais n'hémagglutine pas les globules rouges d'oie. Ce prototype est très proche de Yaba I du groupe Simbu en fixation du complément et possède une parenté avec Turlock et Umbre; par contre, il se différencie nettement de Yaba I en séro-neutralisation; il est donc différent des arbovirus déjà connus et sert de lien entre les deux groupes Turlock et Simbu.

Le même virus a été isolé de deux autres lots de *Culex* non déterminés, puis d'un lot de *Culex perfuscus*. Son cycle écologique paraît se dérouler dans la mosaïque forêt-savane proche de Bangui mais l'incidence humaine semble faible.

*
*
*

Mots clés : Arbovirus. Virus M'Poko. Epidémiologie des arbovirus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAUSEY (O. R.), CAUSEY (C. E.), MAROJA (O. M.) and MACEDO (D. G.). The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto underscribed serological groups in the Amazon regions of Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1961, 10, 227.
- [2] CHASTEL in Schier : Diagnostic des maladies à virus. Flammarion édit., 1964.
- [3] CLARKE (J.) and CASALS (D. H.). Techniques for hemagglutination and the hemagglutination inhibition with arthropod-borne virus. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 561.
- [4] Diagnostic procedures for viral and Rickettsial diseases. *Amer. publ. Health Ass.*, New York, 1964, 3rd edit.
- [5] HAMON (J.), EYRAUD (M.), DIALLO (B.), DYEMKOUA (A.), BAILLY-CHOUMARA (H.) et OUANOU (S.). Les moustiques de la République du Mali (Diptères, Culicidés). *Ann. Soc. Ent. France*, 1968, 130, 95.
- [6] HAMON (J.). Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta). *Ann. Soc. Ent. France*, 1963, 132, 85.
- [7] HANNOUN (C.), ASSO (J.) et ARDOIN (P.). Mutants à petites plages du virus Sindbis. *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 107, 598.
- [8] PORTERFIELD (J.) and ROWE (C.). Hemagglutination with arthropod-borne viruses and its inhibition by certain phospholipids. *Virology*, 1960, 11, 765.
- [9] SEVER (J.). Application of microtechnique to viral serological investigation. *Immunology*, 1962, 88, 320.
- [10] SUNAGA (H.), TAYLOR (R.) and HENDERSON (J. R.). Comparative sensibility of viruses to treatment with diethyl ether and sodium desoxycholate. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1960, 9, 419.
- [11] THEILER (M.). Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1957, 96, 380.
- [12] VAN SOMEREN (E. C. C.), HEISCH (R. B.) and FURONG (M.). Observations on the behaviour of some mosquitoes in the Kenya coast. *Bull. Ent. Res.*, 1958, 49, 643.

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Octobre 1970, tome 119.)

**LE VIRUS M'POKO (BA 365)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS ISOLÉ
EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE**

PAR

**J.-P. DIGOUTTE, F.-X. PAJOT, BRIAN E. HENDERSON, P. BRÈS
et P.-NGUYEN-TRUNG LUONG**

(avec la collaboration technique de P. DIEDERICH)

18 AOUT 1971

MASSON ET C^{IE}, EDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

S. T. O. M.
Collection de Référence

4925

Ent.
S. T.