

LE VIRUS BOUBOUI (BA 409)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS
ISOLÉ EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE (*)

par J. P. DIGOUTTE, F. X. PAJOT, P. BRÈS et P. N'GUYEN TRUNG LUONG
(avec la collaboration technique de M^{me} C. LEGUAY)

*(Institut Pasteur de Bangui
et Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,
Bangui, République Centrafricaine
et Institut Pasteur de Dakar, Sénégal)*

SUMMARY

A NEW ARBOVIRUS ISOLATED IN THE CENTRAL AFRICAN REPUBLIC

Virus Bouboui, a new type of arbovirus, was isolated in 1967, from a pool of *Anopheles paludis*, collected in a village 45 km north of Bangui. The isolation was difficult because in three inoculated litters only one baby-mouse was found paralysed. After the third passage, death of mice regularly occurred three days after inoculation. Attempts to recover the virus after 22 days of preservation at -65° C failed. The strain is inactivated by ether and by sodium deoxycholate. It yields a haemagglutinin of high titre, active at 4, 22 and 37° C. The haemagglutination inhibition, complement fixation and sero neutralisation tests established the relationship of the new virus with the group B Arboviruses and distinguished it from the african arboviruses obtained from the Reference Centre collection of the Pasteur Institute, Dakar. An identical virus was isolated from a pool of *Aedes africanus* collected in a neighbouring village benefiting from similar ecological conditions. It appears to be an unfrequent virus and serological investigations do not show any significant human incidence.

*
**

Key words : Bouboui virus. Group B arboviruses. Arboviruses epidemiology. Mosquitos. Uganda S.

INTRODUCTION

Depuis 1966, une enquête sérologique a été menée point par point, d'abord dans les environs immédiats de Bangui, puis en s'en éloignant progressivement. Cette série d'investigations portant, dans chaque village, sur environ 150 sérums prélevés dans toutes les classes d'âge, mais particulièrement dans les tranches d'âge les plus jeunes, avait pour but de mettre en

(*) Manuscrit reçu le 24 avril 1970.

évidence des zones d'hyperendémie où les chances d'isolement de virus, à partir des vecteurs et des hôtes sensibles, seraient plus élevées. Parmi les villages prospectés, celui de Bouboui, situé à 45 km environ au Nord de Bangui, avait attiré l'attention; il se distinguait en effet par l'abondance des anticorps anti-Chikungunya, décelés dans près de 90 p. 100 de l'ensemble de la population. Cette région a été particulièrement prospectée au point de vue entomologique, et, du matériel recueilli au cours d'une capture du 2 au 3 novembre 1967, nous avons isolé une souche d'arbovirus d'un lot d'*Anopheles paludis* Theo; une souche identique a été isolée ensuite d'un lot d'*Aedes St africanus* Theo capturés en février 1968, au village de Bobia, situé dans le même complexe écologique. La souche prototype présentée sous l'appellation de Bouboui, appartient au groupe B et est apparentée à Uganda S, mais les différences antigéniques permettent de la considérer comme nouvelle.

Le village de Bouboui est situé à proximité d'une galerie forestière qui appartient au système sillonnant le district des savanes préforestières inclus, en grande partie, dans la zone de climat soudano-oubanguien ou climat de bord de la forêt. Dans l'ensemble de ce district, prédomine le faciès de la savane arbustive claire que parcourent d'innombrables galeries forestières, larges et denses. Ces galeries forestières, dont l'aspect tranche nettement sur la savane environnante, suivent le cours de marigots dont le débit n'est jamais très important. Leur largeur est variable et dépasse rarement 750 m. La galerie de Bouboui, par exemple, longue de 6 km, ne dépasse pas 700 m dans sa plus grande largeur, sa plus petite largeur étant de 50 m environ. Quelques grands arbres, pouvant atteindre 34-40 m, surplombent un couvert d'arbres et d'arbustes dense. Ces galeries sont, fort probablement, des vestiges de la forêt tropophile. Bouboui se trouve d'ailleurs à 10 km, à vol d'oiseau, de cette dernière.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MOUSTIQUES.

A l'époque de l'isolement de ces deux souches, les moustiques étaient capturés par prélèvement direct, au tube de verre, des femelles venant se poser sur l'homme servant d'appât; chacun des captureurs procédait à cette capture sur lui-même. Les captures duraient 24 h sans discontinuité. Trois équipes de cinq captureurs étaient employées. Pendant 24 h, les trois équipes alternaient, chaque équipe ne travaillant que par périodes de 2 h, suivies de périodes de repos de 4 h. Au cours de leur travail, les captureurs étaient assis à un endroit donné, jambes et bras nus, et capturaient les moustiques sur eux-mêmes, à l'aide de petits tubes de verre. Chaque tube ne servait qu'à la capture d'une femelle et était ensuite immédiatement bouché avec du coton. Le tube était ensuite placé dans une glacière portative.

INOCULATIONS.

Les inoculations sont pratiquées chez des souriceaux dits nouveau-nés du jour, par voie mixte, intracérébrale (0,02 ml) et intra-péritonéale (0,02 ml).

Les moustiques sont broyés dans un mortier de porcelaine, avec du liquide de Hanks albuminé additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les

quantités de solvant vont de 0,5 ml à 6 ml pour un maximum de 100 moustiques. On laisse décanter le broyat pendant 15 mn, au réfrigérateur à 4° C; il est ensuite centrifugé pendant 5 mn, à 2 000 tours/mn, avant que soit prélevé pour l'inoculation, le liquide situé sous la couche grasseuse. Deux portées de souriceaux sont inoculées avec le produit pur, une portée avec le produit dilué au 1/5. Les suspensions pour passage sont préparées en broyant un cerveau dans 2 ml de diluant. Le produit est décanté à 4° C, pendant 15 mn, puis centrifugé 5 mn à 2 000 tours/mn.

Le réisolement est tenté dans les mêmes conditions, à partir du broyat conservé à —65° C.

MÉTHODES D'IDENTIFICATION.

L'épreuve de sensibilité au désoxycholate de soude a été menée selon la technique originale de Theiler [8] et la technique de Chastel [2]. Les tests à l'éther, selon la technique de Sunaga [7].

Les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination ont été mises en œuvre en plaques O. M. S., selon la méthode de Clarke et Casals [3], avec des antigènes préparés au saccharose acétone, après traitement des sérums avec du kaolin. Les mêmes antigènes ont été utilisés dans les réactions de fixation du complément, suivant la méthode L. B. C. F. [4], adaptée par Sever [6] à la microtechnique sur plaques.

Comme technique de séro-neutralisation, nous avons employé, ou bien celle qui mettait en présence pendant 1 h, au bain-marie à 37° C, le sérum à étudier et le virus en dilutions successives de raison 10, ou bien celle de Causey [4] qui utilisait 0,1 ml de virus dilué à 1/25, 1/250, 1/2 500, etc..., 0,1 ml de sérum hyperimmun et 0,2 ml de sérum frais de cobaye ou de souris, maintenus pendant 1 h au bain-marie, à 37° C, avant qu'ils soient inoculés au souriceau par voie intracérébrale; un titrage témoin fut effectué dans les mêmes conditions, avec un sérum normal de souris.

Les identifications ont été menées soit avec des sérums hyperimmuns de souris, récoltés après inoculation intra-péritonéale de cerveaux de souriceaux infectés, soit avec des liquides d'ascites obtenus avec la souche de sarcome T 180.

RÉSULTATS

I. — HISTORIQUE DES PASSAGES

La souche fut difficile à isoler. En effet, sur les 3 portées, un seul souriceau inoculé avec le produit dilué à 1/5 et paralysé au 7^e jour fit l'objet de prélèvements. Tous les autres souriceaux sont restés indemnes au 20^e jour d'observation. Dès le premier passage tous les souriceaux sont morts. Au premier et deuxième passage, le temps moyen de survie est passé à 4 jours, puis s'est stabilisé à 3 jours à partir du troisième. L'adaptation a été assez rapide et nous avons commencé l'étude de la souche à partir du cinquième passage. Le réisolement a échoué sur le broyat conservé 22 jours à —65° C.

II. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

La souche est sensible à l'éther. Le titre est de $10^{4,2} \text{DL}_{50}/0,02 \text{ ml}$ après traitement alors qu'avant il était supérieur à 10^8 . Elle est également sensible

au désoxycholate de soude ; par les deux méthodes utilisées, le titre était inférieur à 10^3 , alors que celui des suspensions témoins était respectivement de $10^{7,6}$ et de 10^8 .

II. — POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Par inoculation intracérébrale, le titre sur souriceaux âgés de 48 heures est élevé puisqu'il atteint 10^9 DL₅₀/0,02 ml. Par contre, la souche est irrégulièrement pathogène par voie intracérébrale pour les souris sevrées âgées de 21 jours et est non pathogène par voie intrapéritonéale pour la souris adulte.

Elle ne produit, ni plaques sur fibroblastes de poulet, selon la méthode de Porterfield, modifiée par Hannoun, [5] ni effet cytopathique sur cellules HeLa.

III. — PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES

L'antigène au saccharose acétone, préparé à partir de cerveaux du septième passage, hémagglutine les globules rouges d'oie à la dilution de 1/5120 à pH 6,4 - 6,6 aux trois températures : 4° C, 22° C, 37° C.

Le même antigène fixe le complément à la dilution optimale de 1/16 en présence du sérum hyperimmun de souris à la dilution de 1/64.

IV. — IDENTIFICATION

Réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

L'antigène hémagglutinant est inhibé au titre de 1/1280, par son sérum homologue ; comparé à 15 sérums immuns il a donné des résultats négatifs avec les suivants : Chikungunya, O'Nyong-Nyong, Sindbis, Bwamba, Wesselsbron, Zika, A 209 (sous-type de Ntaya), M'Poko, Mossuril et Tataguine.

Les résultats positifs sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Résultats des réactions d'inhibition de l'hémagglutination avec la souche étudiée. (A 490) 4 souches-types et les immunosérums correspondants.

SÉRUMS	ANTIGÈNES				
	Fièvre Jaune	West Nile	Uganda S	Dakar Bat	A 490
Fièvre Jaune	320				160
West Nile.....		2 560			160
Uganda S			640		320
Dakar Bat				2 560	160
A 490	20	80	160		1 280

V. — RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÈMENT

L'antigène dilué au 1/8 et 1/32 a été opposé, à l'Institut Pasteur de Bangui, à 20 sérums hyperimmuns.

Les résultats ont été négatifs avec :

Groupe A : Chikungunya, O'Nyong-Nyong, Sindbis, Semliki.

Groupe B : Fièvre Jaune, West Nile, Zika, Wesselsbron, Dakar Bat, A 209 (sous-type de Ntaya).

Groupe Bunyamwera : Bunyamwera, Ilesha, Germiston.

Groupe Bwamba : Bwamba, Pongola.

Non groupés : Mossuril, Tataguine, Dugbe, M'Poko.

La seule réaction positive est donnée par Uganda S, qui a été comparée alors, en réaction-croisée, avec A 490 : tableau II.

TABLEAU II. — Fixation du complément en réaction croisée.

SÉRUMS	ANTIGÈNES	
	A 490	Uganda S
A 490	64/16 (*)	16/8
Uganda S	16/8	64/16
(*) Titre du sérum/antigène.		

A l'Institut Pasteur de Dakar, les titres d'ascite immune (souris 3 inoculations) et de l'antigène homologue ont été respectivement de 1/256 et 1/32.

Le criblage effectué avec cet antigène a donné des réactions négatives avec les immunsérums suivants :

Groupe A : Virus de la forêt de Semliki, Chikungunya, O'Nyong-Nyong, Sindbis, Middelburg, Ndumu.

Groupe B : Ntaya, Wesselsbron, Usutu, West Nile, Zika, Spondweni, Entebbe Bat, Dakar Bat, Bukalasa, BA 209 (sous-type de Ntaya).

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

Groupe Bwamba : Bwamba, Pongola.

Groupe Simbu : Simbu, Ingwavuma, Yaba 7.

Groupe Turlock : M'Poko.

Groupe Nyando : Nyando, Eretmapodites 124.

Non groupés : Vecteur tiques : Quarantfil, Chenuda, Nyamamini, Thogoto; Wad Medani, Bandia. Autres vecteurs : Lebombo, Mossuril, Tataguine, Ntaya, Witwatersrand.

Non classés : Dakar : IPD/RV 318, IPD/RV 401, IPD-SM 763, IPD/RV 3150. Yaoundé : YM 50/64, YM 55/67.

L'antigène donne une réaction de fixation du complément positive avec deux immunsérums : Uganda S et Fièvre Jaune (souche française neurotrope) et a été repris en réaction croisée avec ces deux souches. Les résultats sont reportés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Fixation du complément en réaction croisée.

SÉRUMS		ANTIGÈNES		
		A 490	Uganda S	Fièvre Jaune
A 490	A2 (*)	16/32	0/0	0/0
	A3	256/32	32/16	8/16
Uganda S	A1	16/8	64/16	8/4
Fièvre Jaune	A2	16/16	32/16	256/16

(*) A1, 2, 3 signifie liquide d'ascite de souris immunisée par 1, 2 ou 3 inoculations.

VI. — RÉACTIONS DE NEUTRALISATION

Les réactions de neutralisation ont été menées parallèlement dans les Instituts Pasteur de Bangui et de Dakar. La méthode utilisée à Bangui fait appel au facteur accessoire en système strictement homologue, sous forme de sérum frais de souris non immune. Les résultats sont donnés dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Séro-neutralisations croisées.

SÉRUMS	INSTITUT PASTEUR BANGUI			INSTITUT PASTEUR DAKAR		
	Virus			Virus		
		A 490	Uganda S		A 490	Uganda S
Titre du virus		8,1	7		7,8	7,3
A 490 index neutralisant....	S 4 (*)	5	3,6	A 3 (*)	3,9	2,7
Uganda S index neutralisant	S 4	3,5	4,6	S 4	4,0	4,5

(*) Mode de préparation du sérum : S 4 - sérum souris 4 inoculations; A 3 - ascite souris 3 inoculations.

On peut considérer, d'après ces différents résultats, que le virus A 490 appartient au groupe B; proche d'Uganda S, il est cependant différent de toutes les souches africaines actuellement connues.

VII. — AUTRES ISOLEMENTS DU VIRUS BOUBOUI

Dans le même district de galeries forestières, se trouve un autre village, Bobia, situé à environ 12 km du lieu d'isolement de la souche prototype. Ce village, comme Bouboui, est particulièrement riche en *Aedes (St.) africanus* (Theo) qui sont très agressifs pour l'homme. Ils piquent toute la journée et la nuit sans interruption dans les galeries forestières, au niveau du sol. Ils piquent également au niveau supérieur dans les grands arbres. Afin de rechercher les vecteurs de Chikungunya et de Zika dont la présence avait été décelée par les enquêtes immunologiques, les captures de ce vecteur ont été multipliées. Une souche (A 651) du virus Bouboui a été isolée à partir d'un pool de 37 *Aedes africanus*, parmi 33 lots de cette espèce inoculés en 1968. La souche s'est adaptée progressivement et le temps moyen de survie est passé de 8 jours, à l'isolement, à 4 jours, au premier passage, pour se stabiliser à 3 jours à partir du troisième passage. Elle présente les mêmes caractéristiques que la souche prototype, avec cette exception qu'elle n'est pas pathogène par voie intracérébrale pour la souris âgée de 21 jours.

Cette souche a été comparée par l'un d'entre nous (P. B.), en réaction de fixation du complément, avec Bouboui, Uganda S, Fièvre Jaune en y ajoutant Banzi : tableau V.

TABLEAU V. — Fixations du complément en réactions croisées.

SÉRUMS		ANTIGÈNES				
		A 490	A 651	Banzi	Uganda S	Fièvre Jaune
A 490	A2	8/16	16/32	0	0	0
	A3	128/16	256/32	32/16	32/16	8/16
A 651	A2	32/32	32/32	16/16	32/16	8/8
	Banzi	A1	0/0	0/0	16/32	8/8
Banzi	A2	32/8	32/16	128/32	64/16	16/8
	Uganda S	A1	16/8	8/32	32/16	64/16
Uganda S	A2	16/16	16/16	32/32	64/16	—
	Fièvre Jaune	A3	16/16	16/16	16/16	32/16

Les résultats montrent que les deux souches sont identiques entre elles et confirment que Bouboui et A 651 sont différents des autres souches du Groupe B.

VIII. — ENQUÊTE SÉROLOGIQUE

Depuis janvier 1968, le virus Bouboui a été systématiquement inclus dans la gamme des antigènes utilisés dans les enquêtes sérologiques par réactions d'inhibition de l'hémagglutination. L'hémagglutination par le virus Bouboui est inhibée par les sérums présentant des réactions de type secondaire du

Groupe B ; par contre, aucune réaction isolée, ni aucune conversion sérologique n'a été observée. L'incidence en pathologie humaine du virus Bouboui paraît donc faible sinon nulle.

DISCUSSION

La validité de l'isolement ne saurait être mise en doute, car l'appartenance du virus Bouboui au Groupe B prouve qu'il s'agit bien d'un arbovirus, et les différents résultats d'identification montrent qu'il est différent des virus auxquels il a été comparé. En effet, si, en inhibition de l'hémagglutination, les différences entre les réactions homologues et hétérologues ne sont significatives que dans les épreuves où le sérum anti-virus Bouboui est opposé à différents antigènes, elles sont beaucoup plus nettes en réaction de fixation du complément : Uganda S est la seule souche qui y témoigne d'une parenté antigénique avec le virus Bouboui. Aussi bien à l'Institut Pasteur de Bangui qu'à celui de Dakar, l'écart est toujours significatif dans les deux sens puisqu'il est pour chaque sérum, d'au moins deux dilutions entre la réaction avec l'antigène homologue et la réaction avec l'antigène hétérologue. Ces résultats sont confirmés par l'épreuve de séro-neutralisation croisée qui, pratiquée dans les deux Instituts, montre des résultats absolument comparables, avec des écarts significatifs dans les deux sens.

La validité de l'isolement de cette souche nouvelle est confirmée par le fait qu'une deuxième, absolument identique, a été découverte quelques mois plus tard. En réaction de fixation du complément, cette souche est semblable au virus Bouboui ; mais, surtout, elle se comporte exactement de la même façon avec les trois virus les plus proches : Uganda S, Banzi et Fièvre Jaune (tableau V).

Ce virus paraît rare, intermittent, car il n'a été isolé que deux fois, en novembre 1967 et en février 1968, sur plus de deux mille lots de moustiques inoculés.

Les deux isolements ont été effectués dans deux villages, très proches l'un de l'autre, sur lesquels notre attention avait été attirée par l'abondance des anticorps anti-Chikungunya et par la circulation permanente de ce virus, décelée par les conversions sérologiques observées d'année en année. L'étude entomologique a confirmé qu'il s'agissait bien là d'un foyer épidémiologique privilégié par l'abondance des vecteurs, l'agressivité des *Aedes africanus* et surtout par le nombre d'arbovirus différents en circulation. Si la souche prototype a été isolée à partir d'*Anopheles paludis*, la deuxième l'a été à partir d'*Aedes africanus* qui a fourni, dans la même région, une souche de virus Chikungunya et deux souches de virus Zika. Par ailleurs, dans cette même zone, plusieurs autres arbovirus ont été isolés ; ils sont actuellement en cours d'étude.

Les résultats sérologiques montrent que l'homme ne paraît pas intervenir dans le cycle de ce virus. Pour découvrir celui-ci, il nous faudra poursuivre nos investigations chez les vertébrés.

CONCLUSION

Un nouveau prototype d'arbovirus, le virus Bouboui A 490, a été isolé d'un lot d'*Anopheles paludis* capturés en 1967, dans un petit village, à 45 km au nord de Bangui. Cette souche, qui appartient au Groupe B, est proche du virus Uganda S, mais cependant différente des arbovirus africains auxquels elle a été comparée.

RÉSUMÉ

Un nouveau prototype d'arbovirus, le virus Bouboui, a été isolé en 1967, d'un lot d'*Anopheles paludis* capturés dans un village, à 45 km au nord de Bangui. La souche fut difficile à isoler, un seul souriceau étant trouvé paralysé sur les trois portées inoculées ; mais elle s'est ensuite adaptée rapidement, dès le troisième passage, avec une stabilisation à trois jours du temps moyen de survie. Le réisolement a échoué après 22 jours de conservation à -65°C . Sensible à l'éther et au désoxycholate de soude, la souche donne une hémagglutinine de titre élevé, active aux trois températures utilisées habituellement. Les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination, de fixation du complément et de séro-neutralisation ont établi qu'elle appartient au groupe B et qu'elle est différente des arbovirus africains de la collection du Centre de Référence de l'Institut Pasteur de Dakar (Dr Brès). Un virus identique a été isolé d'un lot d'*Aedes africanus* capturés dans un village situé dans le même complexe écologique. Il s'agit, semble-t-il, d'un agent peu fréquent et l'enquête sérologique ne démontre pas qu'il ait une incidence humaine significative.

*
*
*

Mots clés : Virus Bouboui. Arbovirus groupe B. Epidémiologie arbovirus. Moustiques. Uganda S.

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 undescribed serological groups in the Amazon Region of Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1961, 40, 227-249.
- [2] CHASTEL in SOHIER (R.). Diagnostic des maladies à virus. Flammarion edit., 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. The American Public Health Association, New York, 1964, 3rd Edition.
- [5] HANNOUN (C.), ASSO (J.) et ARDOIN (P.). Mutants à petite plage du virus Sindbis. *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 407, 598.
- [6] SEVER (J.). Application of microtechnique to viral serological investigation. *Immunology*, 1962, 88, 320.
- [7] SUNAGA (H.), TAYLOR (R.) and HENDERSON (J. R.). Comparative sensitivity of viruse to treatment with diethyl ether and sodium desoxycholate. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1960, 9, 419.
- [8] THELLER (M.). Action of sodium desoxycholate on arthropod borne viruses. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 1957, 96, 380.

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Janvier 1971, tome 120.)

LE VIRUS BOUBOUI (BA 409)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS
ISOLÉ EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

PAR

J.P. DIGOUTTE, F.X. PAJOT, P. BRÈS
et **P. N'GUYEN TRUNG LUONG**
(avec la collaboration technique de **M^{me} C. LEGUAY**)

O. R. S. T. O. M.

Collection de Mémoires

n°

4926

MASSON ET C^{ie}, EDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

18 AOÛT 1971

E-16
CA