

**LE VIRUS NKOLBISSON (YM 31/65),
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS ISOLÉ
AU CAMEROUN (*)**

par J. J. SALAUN, A. RICKENBACH, P. BRÈS, H. BROTTES,
M. GERMAIN, J. P. EOUZAN et L. FERRARA

(*Institut Pasteur du Cameroun* [Directeur: H. Brottes], *Institut Pasteur de Dakar* [Directeur: A. Chambon] et *Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer* [Directeur: R. Maignien])

Les différents travaux entrepris depuis la création d'une section de virologie, à l'Institut Pasteur du Cameroun, ont montré une remarquable richesse en arbovirus dans la région de Yaoundé. Chaque année, de nombreuses souches différentes les unes des autres, sont isolées. Des recherches sur la faune culicidienne aux alentours de la capitale du Cameroun ont fait découvrir plusieurs souches d'un même virus, le virus Nkolbisson (YM 31/65), différent des arbovirus africains actuellement identifiés et classés.

Le village de Nkolbisson, où se trouve un centre important de recherches agronomiques, est situé à 8 km de Yaoundé. Ses caractéristiques géographiques, climatologiques et phytogéographiques ont été décrites dans un précédent article [3] où sont aussi indiqués le matériel et les méthodes employés dans nos recherches des arbovirus.

Les moustiques ont été capturés de jour, au filet, dans la végétation. Après identification, on les a conservés à -70° C, en attendant leur broyage en milieu tamponné phosphaté, albuminé à 0,75 p. 100 et additionné d'antibiotiques. Dix-sept *Eretmapodites leucopus* ssp *productus* Edw. (1) femelles, capturés entre le 26 octobre 1964 et le 14 avril 1965 à la station de Nkolbisson, ont été, après identification, inoculés à deux portées de souriceaux de 24 heures, le 20 avril 1965, par voies intracérébrale (0,02 ml) et intrapéritonéale (0,03 ml).

(*) Manuscrit reçu le 21 juin 1968.

(1) Tous les mâles disséqués de la région de Yaoundé appartiennent à cette sous-espèce.

RÉSULTATS

HISTORIQUE DES PASSAGES.

La première portée était intacte après quinze jours d'observation. Dans la deuxième, on a noté la disparition par cannibalisme de 2 souriceaux le sixième jour, de 2 autres le lendemain, pendant qu'un autre présentait des crises de tétanie, accompagnées de cyanose et était prélevé aux fins de passage. Le dernier souriceau de la portée a disparu le onzième jour après l'inoculation.

Dès le premier passage, la période d'incubation est passée à trois jours, puis s'est stabilisée à deux jours au sixième passage. Le titre s'est élevé à $10^{8,2}$ DL₅₀/0,02 ml. L'adaptation au cerveau de souriceau a donc été rapide. Cependant les lésions anatomo-pathologiques ont été très discrètes et peu évocatrices, même après le seizième passage. Le réisolement, tenté le 17 mai 1965, a échoué. La faible quantité de l'inoculum ne permettait pas plusieurs tentatives.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.

L'épreuve de sensibilité à l'éther a été positive (titre témoin $10^{7,67}$ DL₅₀/0,02 ml ; titre éther $10^{4,43}$ DL₅₀/0,02 ml) ainsi que l'épreuve au désoxycholate qui a montré une différence de 3 logarithmes avec l'épreuve témoin. Les tentatives faites pour obtenir un antigène hémagglutinant, au quatrième et au dixième passage, en fréon 113 et en saccharose-acétone, ont échoué. La lyophilisation, pratiquée le 19 juin 1965, en sérum de veau dilué au 1/3 en eau physiologique, a été facile et le titre n'a pas varié.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

La souche s'est montrée pathogène pour la souris adulte par voie intracrânienne dès le cinquième passage alors que la voie intrapéritonéale n'a rien donné. Elle n'a produit aucun effet cytopathogène sur les cultures cellulaires suivantes : KB, rein de singe drill (*Mandrillus leucophaeus*), rein de hamster, fibroblastes de poulet.

IDENTIFICATION.

En inhibition de l'hémagglutination le sérum homologue n'a donné aucun résultat sur les antigènes de référence suivants : Chikungunya, O'nyong nyong, Sindbis, Semliki forest, Middelburg, Ntaya, Wesselsbron, Usutu, West-Nile, Dakar bat, Uganda S, Fièvre jaune, Zika et Bunyamwera.

L'antigène au saccharose-acétone fixe le complément à la dilution optimale de 1/32 en présence de sérum immun de souris à la dilution de 1/32 en utilisant la méthode de l'échiquier.

TABLEAU I. — Sérums de référence utilisés en fixation du complément pour l'identification de la souche YM 31/65.

TITRES HOMOLOGUES	TITRES HOMOLOGUES
<i>Groupe A :</i>	
Chikungunya (S 27) ...	128/10*
O'Nyong nyong (Ang'mom)	64/8
Semliki (Aedes Bwamba)	64/12
Sindbis (AR 339)	64/32
Middelburg (AR 749) ..	32/8
Ndumu (AR 2211)	64/8
<i>Groupe B :</i>	
Ntaya (Mosq lot 6 Bwamba) ..	16/16
Wesselsbron (H 177) ..	128/32
Usutu (AR 1776)	256/8
Dakar bat (IPD/A 249)	32/8
Uganda S (Tree Aedes)	32/6
West-Nile (E 101)	32/32
Fièvre jaune (F.N.V.) ..	16/16
Zika (MR 766)	64/6
Spondweni (TAR 94) ..	64/16
Bukalasa bat (IPD/A 595)	64/16
Entebbe bat (IL 30) ..	80/80
<i>Groupe bunyamwera :</i>	
Bunyamwera (Aedes Bwamba)	16/32
Germiston (AR 1050) ..	128/8
Ilesha (KO 2)	32/256
Olifantsvlei (AR 5133) ..	40/40
Shokwe (AR 4042)	512/128
<i>Groupe Bwamba :</i>	
Bwamba (M 459)	32/8
Pongola (TAR I)	32/8
<i>Groupe Simbu :</i>	
Simbu (TAR 53)	64/128
Ingwavuma (AN 4165) ..	128/128
<i>Non groupés :</i>	
Quaranfil (AN 4671) ..	64/8
Chenuda (AR 1170) ..	64/4
Nyamanini (AN 2526) ..	128/64
Wad Medani (AR 492) ..	**
Thogoto (2 A)	16/8
Mossuril (AR 1995) ..	32/128
Nyando (MP 401)	16/64
Lumbo (AR 1881)	128/4
Lebombo (AR 3896) ..	?
Tanga (MP 1329)	16/32
Tataguine (IPD/A 252)	64/64
Witvatersrand (?)	256/256
Lagos bat (?)	**
<i>Non classés :</i>	
YM 50/64 (Yaoundé) ..	?
YM 176/66 (Yaoundé) ..	64/32
BA 40 (Bangui)	32/64
IPD/A 318 (Dakar)	256/128
IPD/A 401 (Dakar)	64/16
IPD/A 611 Bandia (Dakar)	256/128
IPD/A 763 (Dakar)	16/8
* Inverse du titre sérum/inverse du titre antigène. Les titres des sérums sont les maximums. Les titres des antigènes sont les titres les plus élevés auxquels le titre sérum est maximal, c'est-à-dire le titre optimal de l'antigène.	
** Sérums fournis par le Centre International de Référence O.M.S.	

Les réactions hétérologues entre l'antigène YM 31/65 et sérums de référence de l'Institut Pasteur de Dakar ont toutes donné des résultats négatifs (tableau I).

Ce virus est donc différent de toutes les souches africaines actuellement connues. Cependant, pour affirmer cette identification, la souche YM 31/65 a été envoyée au Centre International O. M. S. pour les Arbovirus [Yale Arbovirus Research Unit] (2).

TABLEAU II. — Autres isollements de la souche Nkolbisson.

N° DU LOT	MOUSTIQUES	LIEUX	DATE DE CAPTURE	RÉSILEMENT
YM 34/65	133 <i>Culex telesilla</i> de M. et Lav.	Nkolbisson	2 et 6/04/1965	+
YM 55/66	102 <i>Eretmapodites</i> gr. <i>chrysogaster</i> gr.	Nkolbisson	24/03 au 15/05/1966	+
YM 148/66	73 <i>Aedes mutilus</i> Edw. 3 <i>Aedes argenteo-punctatus</i> (Theo.)	Nkolbisson	20/06 au 13/07/1966	+
YM 257/66	17 <i>E. gr. chrysogaster</i> gr. 5 <i>E. gr. oedipodius</i> gr. 2 <i>E. leucopus</i> ssp <i>productus</i> Edw.	Obout**	20/09/1966	+
YM 274/66	74 <i>Aedes cumminsi</i> (Theo.)	Nkolbisson	15/09 au 13/10/1966	Non pratiqué

** Village situé à proximité de la rivière Nyong, à 50 km au sud/sud-est de Yaoundé.

TABLEAU III. — Fixations du complément en réactions croisées.

	ANTIGÈNES					
	YM 31	YM 34	YM 55	YM 148	YM 257	YM 274
Sérums :						
YM 31 (S 3)*	32/64	32/64	32/64	—	32/64	16/64
YM 34 (S 3)	32/32	32/64	—	—	—	—
YM 55 (S 3)	256/32	—	256/32	256/64	128/64	128/64
YM 148 (S 3)	—	—	512/64	512/64	—	—
YM 257 (S 3)	32/64	—	64/64	—	128/64	64/64
YM 274 (S 3)	64/64	—	64/32	—	128/64	128/64

* S 1, 2, 3, L 1, 2, 3... = sérums immuns obtenus sur souris ou sur lapin, après 1, 2 ou 3 injections.

Les souches de Nkolbisson isolées par la suite (tableau II), ont fait preuve d'une adaptation rapide au cerveau du souriceau et leur période d'incubation s'est stabilisée à deux jours. Elles n'ont été

(2) Yale University School of Medicine, 60 College Street, New-Haven (Connecticut).

pathogènes au 1/100 pour la souris adulte que par voie intracrânienne. Les lésions anatomo-pathologiques spécifiques ont fait leur apparition après un nombre variable de passages, mais ont été en général plus marquées qu'avec la souche prototype. Le titre était élevé et oscillait autour de 10^8 DL₅₀/0,02 ml. Il n'a pas subi de modification après lyophilisation. Aucune souche n'a fourni d'hémagglutinine ni en fréon 113 ni en saccharose-acétone. Aucune n'a produit d'effet cytopathogène sur les cultures cellulaires déjà citées ni sur les cellules de rein de singe moustac, *Cercopithecus cephus*. La filtration sur Millipore de 220 m μ n'entraîna aucune baisse du titre. La résistance à l'éther et au desoxycholate a été parallèle à celle de la souche prototype.

Ce sont des souches identiques entre elles et très voisines, sinon identiques à Nkolbisson [YM 31/65] (tableaux III et IV).

TABLEAU IV. — Séro-neutralisations croisées (technique de Causey).

	ANTIGÈNES					
	YM 31	YM 34	YM 55	YM 148	YM 257	YM 274
Titre (log)	8,2	8,5	8,4	7,8	8,1	7,6
Sérums (Index)						
YM 31 (L 2)	+ 5,7**	—	+ 5,8	—	—	—
YM 34 (L 2)	—	+ 6,0	+ 5,8	—	—	—
YM 55 (L 2)	+ 5,7	5,9	+ 5,8	5,1	5,3	4,9
YM 148 (S 3)	—	—	+ 5,9	+ 5,3	—	—
YM 257 (S 3)	—	—	+ 5,8	—	+ 5,6	—
YM 274 (S 3)	—	—	+ 5,9	—	—	+ 5,1

** + = égal ou supérieur à...

DISCUSSION

Ces divers résultats d'identification permettent de penser que nous nous trouvons devant une nouvelle souche différente des 46 virus africains de la collection du Centre de Référence de l'Institut Pasteur de Dakar.

La validité de l'isolement de la souche YM 31/65 à partir d'*Eretmapodites leucopus* ssp *productus* ne saurait être contestée puisqu'il s'agit là d'un virus nouveau, dont la confirmation a été fournie par de nombreux isollements ultérieurs. Ce n'est pas un virus rare ni intermittent, car il a été isolé à 6 reprises différentes, deux fois en 1965 et quatre fois en 1966 sur une période de l'année allant au

minimum d'avril à septembre, c'est-à-dire pendant la saison des pluies. De plus, le virus n'est pas strictement localisé à Nkolbisson ; on le trouve à 50 km de là, à Obout. Enfin, l'éventualité de transmission semble assez large. Plusieurs espèces de moustiques sont impliquées dans nos isollements. Il a été isolé une fois de *Culex*, deux fois d'*Aedes* (dont au moins deux espèces hébergeaient le virus), trois fois d'*Eretmapodites* (avec également 2 espèces au moins porteuses de virus). Ces isollements étalés sur plusieurs mois, montrent qu'il s'agit d'un agent infectieux permanent et non d'un virus isolé au cours d'une vague épidémique hypothétique. Néanmoins, aucune enquête sérologique n'a été pratiquée et nous n'avons aucune indication sur l'aire d'incidence de ce virus chez l'homme, et sur la possibilité d'un réservoir animal de virus. Il convient donc maintenant, par des réactions de fixation du complément ou de séro-neutralisation, de localiser cette aire, de chercher à isoler cette souche chez l'homme, de voir si elle est pathogène pour celui-ci, de déceler un éventuel réservoir animal de virus.

CONCLUSION

« Nkolbisson » est un nouveau prototype, isolé à 8 km de Yaoundé, paraissant assez largement répandu dans la faune culicidienne, souvent rencontré dans la région, différent de tous les virus de référence de l'Institut Pasteur de Dakar. Il est provisoirement classé dans les arbovirus non groupés. Aucune enquête sérologique n'a encore eu lieu.

RÉSUMÉ

Un nouveau prototype d'arbovirus a été isolé le 20 avril 1965, à 8 km de Yaoundé, en forêt dégradée, à partir de 17 *Eretmapodites leucopus* ssp *productus* Edw., inoculés à deux portées de souriceaux nouveau-nés. Les premiers signes n'apparaissent que chez une seule portée, après une incubation de six à sept jours qui se stabilise ensuite à deux jours avec un titre de $10^{8,2}$ DL₅₀/0,02 ml. Le réisolement a échoué. La souche n'a donné aucune hémagglutinine. Les différentes tentatives sur cultures cellulaires n'ont pas abouti. L'identification par fixation du complément a montré qu'il n'existait aucune relation avec les virus de référence du Centre de l'Institut Pasteur de Dakar. La souche est donc provisoirement classée dans les arbovirus non groupés transmis par les moustiques et appelée virus Nkolbisson. Le même virus a été isolé à 5 autres reprises de culicidés, *Culex* et surtout *Aedes* et *Eretmapodites*. Aucune enquête sérologique n'a été effectuée.

SUMMARY

Six isolations are reported of a new prototype strain (YM 31/65) designated as Nkolbisson virus, village at 8 km from Yaoundé, in partially degraded semi-deciduous forest. The strains were isolated from pools of *Eretmapodites* (*leucopus* ssp *productus* Edw., *chryso-gaster* Gr. and *oedipodius* Gr.), *Aedes* (*cumminsi* [Theo.], *mutilus* Edw. and *argenteopunctatus* [Theo.]) and *Culex telesilla* M. and Lav. After adaptation, the survival time of the inoculated suckling mice is two days. The titre is $10^{8.2}$ DL₅₀/0,02 ml. Nkolbisson is ether and desoxycholate sensitive and passes through Millipore 220 μ filter. It does not possess haemagglutinating antigen. The new strain is found not to correspond to any of the 46 african viruses in the collection of the Reference Center of Dakar. This virus seems relatively common and settled, but the area is unknown. There is no serological survey of the country.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRÈS (P.), CORNET (M.) et ROBIN (Y.). Le virus de la forêt de Bandia (IPD/A611), nouveau prototype d'arbovirus isolé au Sénégal. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **113**, 739-747.
- [2] BRÈS (P.), WILLIAMS (M. C.) et CHAMBON (L.). Isolement au Sénégal d'un nouveau prototype d'arbovirus : la souche Tataguine (IPD/A252). *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **111**, 585-591.
- [3] BROTTES (H.), RICKENBACH (A.), BRÈS (P.), SALAÛN (J. J.) et FERRARA (L.). Les arbovirus au Cameroun ; isolements à partir de moustiques. *Bull. Org. mond. Santé*, 1966, **35**, 811-825.
- [4] CLARKE (D. H.) and CASALS (J.). Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. trop. Med. Hyg.*, 1958, **7**, 561-573.
- [5] PORTEFIELD (J. S.) and ROWE (C. E.). Hemagglutination with arthropod-borne viruses and its inhibition by certain phospholipids. *Virology*, 1960, **11**, 765-770.
- [6] SALAÛN (J. J.) et BROTTES (H.). Les arbovirus au Cameroun ; enquête sérologique. *Bull. Org. mond. Santé*, 1967, **37**, 343-361.

Ent. 100

03-d

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Février 1969, Tome 116.)

LE VIRUS NKOLBISSON (YM 31/65)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS ISOLÉ
AU CAMEROUN

PAR

J. J. SALAUN, A. RICKENBACH, P. BRÈS, H. BROTTES,
M. GERMAIN, J. P. FOUZAN et L. FERRARA

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

901

13192ca