

03 - d

LE VIRUS OKOLA (YM 50/64)
NOUVEAU PROTOTYPE D'ARBOVIRUS
ISOLÉ AU CAMEROUN A PARTIR DE MOUSTIQUES (*)

par H. BROTTES, A. RICKENBACH, P. BRÈS, M. C. WILLIAMS,
J. J. SALAÜN et L. FERRARA

(avec la collaboration technique de J. MENO)

(Institut Pasteur du Cameroun, Institut Pasteur de Dakar, Office de
Recherches Scientifiques et Techniques Outre-Mer, et East African
Virus Research Institute [Uganda])

A mesure que progresse l'étude des arbovirus africains entreprise depuis 1940 par les chercheurs de l'équipe de l'*East African Virus Research Institute* à Entebbe, l'intérêt suscité par la complexité et la diversité des modalités épidémiologiques rencontrées à leur propos ne fait que croître. Les travaux des auteurs sud-africains, puis ceux des auteurs de langue française, ont confirmé l'absolue nécessité d'une collaboration étroite entre plusieurs disciplines scientifiques pour l'investigation des cycles de ces virus. Le travail d'équipe de base est par évidence celui du virologue et de l'entomologiste.

Depuis 1964, la prospection des vecteurs possibles des arbovirus parmi les moustiques du centre-sud Cameroun nous a conduits à l'isolement de diverses souches connues de ces agents. Quelques souches ont posé des problèmes d'identification et semblent différentes des arbovirus africains actuellement répertoriés. L'une d'elles, YM 50/64, faisant partie de nos premiers isollements en 1964, a été particulièrement étudiée et peut être considérée comme nouvelle. Nous la présentons sous l'appellation de virus Okola.

Par Okola, nous entendons les quelques villages qui précèdent la petite ville d'Okola, à 25 km environ de Yaoundé. Les caractéristiques

(*) Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr Brottes, Médecin-Commandant, E.A.C.I.R.S.S.T.D.M., Parc du Pharo, 13-Marseille-7^e (France).

28 oct. 85

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 18 743

Cote : B 21

108

climatiques et géographiques de cette région ont été décrites dans un article précédent [3]. Nous ne ferons que rappeler qu'elle est située dans la zone de forêt semi décidue à *Celtis* et sterculiacées, mais très remaniée par l'implantation de nombreuses bananeraies et cacaoyères, surtout le long des axes routiers, particulièrement denses autour de Yaoundé. Le paysage est celui d'un plateau volcanique très ancien, d'une altitude moyenne de 600 à 700 m, largement arrosé sous un climat équatorial, avec quatre saisons bien marquées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel et les méthodes employés pour la récolte des moustiques, l'isolement et l'identification des virus ont été détaillés dans des publications antérieures [1, 2, 3]. La capture des moustiques a eu lieu de jour, au filet, le 21 mai 1964, dans les bananeraies entourant les villages. Le lot YM 50 a été constitué de façon homogène par 15 *Eretmapodites* groupe *chrysogaster* Graham.

L'inoculation a été pratiquée le 2 juin 1964, à partir des moustiques femelles conservés à -65°C , sur deux portées de souris âgées de 24 heures, en utilisant le broyat non dilué par voies intracérébrale (0,02 ml) et intrapéritonéale (0,03 ml).

RÉSULTATS

OBSERVATION DES PASSAGES

Sur les deux portées inoculées, tous les animaux sont restés indemnes pendant vingt et un jours, sauf deux qui présentèrent des signes d'atteinte nerveuse (chute sur le côté, paralysie du train postérieur) au treizième jour. Leur cerveau prélevé a servi à pratiquer le premier passage à la dilution arbitraire de 10^{-2} sur deux autres portées de souris dont l'ensemble a présenté des signes pathologiques au cinquième jour. Le virus s'est adapté au cerveau de souris dès le troisième passage avec généralisation de la mortalité pour un temps moyen de survie de quatre jours avec un inoculum de 10^{-2} DL₅₀/0,02 ml i.c.

Le réisolement a été obtenu à partir du broyat conservé à -65°C , le 23 juin 1964. Sur deux portées de souris inoculées, un seul animal a présenté un retard staturo-pondéral suivi de phénomènes paralytiques; son cerveau prélevé le seizième jour a donné lieu à des passages positifs avec stabilisation de la période d'incubation à quatre jours comme cela fut observé lors de l'isolement.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

La suspension virale du troisième passage a servi aux tests de sensibilité à l'éther et au désoxycholate de sodium. En présence de désoxycholate le titre du virus a accusé une chute de près de cinq logarithmes et l'éther a provoqué une baisse de titre de plus de trois logarithmes.

Sur les souris de vingt-quatre heures de l'élevage de l'Institut Pasteur à Yaoundé (souris Swiss, souche M. L. A.), le titre du virus au troisième passage a dépassé $10^{7,0}$ DL₅₀/0,02 ml. La lyophilisation des cerveaux du cinquième passage dans du sérum de lapin dilué au 1/3 en eau physiologique a fourni au sixième passage à l'Institut Pasteur de Dakar une suspension titrant $10^{5,0}$ DL₅₀/0,02 ml i.c. sur des souris de quarante-huit heures avec un temps moyen de survie de quatre jours à 10^{-3} DL₅₀/0,02 ml.

PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES

Les essais pour obtenir un antigène hémagglutinant ont été laborieux. A Yaoundé, les cerveaux du cinquième passage ont fourni une hémagglutinine faible à 1/80 à pH : 6,0 à la température du laboratoire avec un antigène préparé au fluorocarbure (Fréon 113). Ce n'est qu'au onzième passage que cette même méthode a donné des résultats valables avec un antigène présentant son optimum à pH : 6,2 à la dilution de 1/640, permettant ainsi de l'inclure dans le clavier sérologique de nos enquêtes de dépistage. Les préparations antigéniques utilisant le saccharose et l'acétone ont échoué. A Dakar, les mêmes tentatives de préparation par cette dernière méthode n'ont donné également aucun résultat. A Entebbe, l'un d'entre nous (M. C. Williams 1966) a obtenu un antigène hémagglutinant de titre faible qui a cependant permis un criblage de sérums hyperimmuns de référence.

IDENTIFICATIONS

RÉACTIONS D'INHIBITION DE L'HÉMOAGGLUTINATION (IH)

L'antigène hémagglutinant (H. A.) obtenu à l'E. A. V. R. I. d'Entebbe a été inhibé au titre de 1/160 par son sérum homologue.

Les résultats ont été négatifs avec les 49 sérums hyperimmuns suivants :

Groupe A : Chikungunya, O'Nyong-nyong, Middelburg, Ndumu, virus de la forêt de Semliki, Sindbis; *groupe B* : Dakar chauve-souris, Dengue 1, Entebbe bat, Ntaya, Spondweni, Usutu, Wesselsbron, West Nile, Fièvre jaune, souche neurotrope française, Zika; *groupe Bunyamwera* : Bunyamwera, Germiston, Ilesha, Olifantsvlci, Shokwe; *groupe Bwamba* : Bwamba, Pongola; *groupe Simbu* : Simbu, Ingwavuma; *non groupés ou non classés* : BP 111, H 336,

Yaba 1, Nyando, Eretmapodites 147, maladie africaine du cheval, AN 1047-61, AR 1169-64, AR 1225-64, AR 1275-64, AR 1284-64, AR 1846-64, BP 846. Tataguine, Lagos bat, Lumbo, Mossuril, MP 359, maladie du mouton de Nairobi, Nyamanini, Tanga, MP 1329, Thogoto, Witwatersand.

RÉACTIONS DE FIXATION DU COMPLÉMENT (F. C.)

L'antigène obtenu au huitième passage à l'E. A. V. R. I. a présenté un titre homologue de 160/80 (1). Les résultats ont été négatifs vis-à-vis de 39 sérums hyperimmuns testés n'intéressant ni le groupe A ni le groupe B : *groupe Bunyamwera* : Bunyamwera, Germiston, Ilesha, Olifantsvlei, Shokwe; *groupe Simbu* : Simbu, Ingwavuma, Yaba 7; *groupe Bwamba* : Bwamba, Pongola; *non groupés* : Quarantfil, Chenuda, Nyando, maladie africaine du cheval, Tataguine, Lagos bat, Lebombo, Lumbo, Mossuril, maladie du mouton de Nairobi, Nyamanini, Tanga, Thogoto, Witwatersand; *non classés* : Yaba 1, Eretmapodites 147, AMP 5438, AN 1407, AN 5077, AR 1225, AR 1275, AR 1284, AR 1846, BT (PET), BP 846, K 66/65, MP 359, Congo.

A l'Institut Pasteur de Dakar, les titres du sérum hyperimmun (souris quatre inoculations) et de l'antigène en réaction homologue ont été respectivement de 1/64 et 1/32.

Le criblage a été effectué avec cet antigène à la dilution de 1/8, 1/32 et a donné des réactions négatives avec les immunsérums suivants (sérums de souris, trousse E de l'Institut Pasteur de Dakar) : *groupe A* : virus de la forêt de Semliki, Chikungunya, O'Nyong-nyong, Sindbis, Middelburg, Ndumu; *groupe B* : Ntaya, Wesselsbron, Usutu, West-Nile, Uganda S, Fièvre jaune souche française neurotrope, Zika, Spondweni, Entebbe bat, Dakar chauve-souris, Bukalasa, BA 209 (Bangui), YM 310 (Yaoundé); *groupe Bunyamwera* : Bunyamwera, Germiston, Ilesha, Shokwe, Olifantsvlei; *groupe Bwamba* : Bwamba, Pongola; *groupe Simbu* : Simbu, Ingwavuma, Yaba 7; *groupe California* : (2); *groupe Phlebotomus* : (2); *groupe Unkumieni* : Grand Arbaud, Ponteves (3); *non groupés* : vecteurs tiques : Quarantfil, Chenuda, Nyamanini, Thogoto, Wad-Medani, Bandia; autres vecteurs : Lebombo, Mossuril, Nyando, Tanga, Tataguine, Witwatersand, Lagos bat; *non classés* : Dakar : IPD/RV 318, IPD/RV 401, IPD/SM 763, IPD/RV 3150; Yaoundé : YM 31-65, YM 176-66, YC 59; Bangui : BA 365.

(1) Inverse dilution sérum/ Inverse dilution antigène.

(2) Sérums provenant du Centre International de Référence : Y. A. R. U. (Yale University School of Medicine, 60 College Street, New Haven, U. S. A.).

(3) Sérums provenant de l'Institut Pasteur de Paris, 25, rue du Docteur-Roux, Paris-15^e.

RÉACTIONS DE NEUTRALISATION

Le criblage a été effectué avec 63 DL₅₀ de virus YM 50, l'index de neutralisation homologue avec un sérum de souris (4 inoculations) a été de 3,1 + (4).

Les résultats ont été négatifs avec les sérums hyperimmuns suivants (voir tableau I) :

Ces différents résultats ont prouvé que le virus YM 50 pouvait être considéré comme non apparenté aux virus africains figurant actuellement dans les collections de référence des centres d'Entebbe et de Dakar et permettaient de le présenter comme nouveau prototype.

TABLEAU I. — Sérum utilisé en séroneutralisation pour l'identification de la souche YM 50.

<i>Groupe A :</i>		<i>Groupe Bunyamwera :</i>	
Semliki	L ₄ (*) 2,5 + (**)	Bunyamwera	S ?
Chikungunya ..	L ₃ 2,2 +	Ilesha	L ₄ 2 +
O'Nyong-nyong ..	L ₃ 2,3 +	Ukauwa	L ₃ 2,5 +
Sindbis	L ₃ = 5,5 +	Germiston	S ₃ entre 3 et 4
Middelburg	L ₂ 1,9 +	<i>Groupe Bwamba :</i>	
Ndumu	L ₂ ?	Bwamba	L ₅ 2,5 +
<i>Groupe B :</i>		Pongola	L ₅ 2,5 +
West-Nile	S ₂ = 3,2	<i>Divers :</i>	
Ntaya	L ₂ = 2,7	Lumbo	L ₂ 3 +
Fièvre jaune	L ₄ 3,2 +	Simbu	L ₂ 2 +
Uganda S	S ₄ 2,8 +	Chenuda	L ₃ 2,1 +
Zika	S 2,4 +	Mossuril	L ₂ 1,5 +
Spondweni	L ₂ 2,3 +	Nyamanini	L ₂ = 2
Wesselsbron	L ₂ 2,3 +	Nyando	L ₃ = 2,5
Usutu	L ₁ ?	Lagos bat	L ₃ ?
Dakar bat	L ₂ = 2,3		

(*) L₁, 2, 3... S₁, 2, 3... signifie lapin ou souris immunisé par 1, 2 ou 3 inoculations.

(**) Titre homologue de chaque sérum DL₅₀/0,03 ml I. C.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Le septième passage à la dilution de 10⁻³ a été pathogène pour les souris adultes par voie intracérébrale avec un temps moyen de survie de 5-6 jours, mais ne l'a pas été par voie intrapéritonéale.

(4) + signifie égal ou supérieur à...

TABLEAU II. — Réactions d'inhibition de l'hémagglutination pour le virus Okola (YM 50).

ORIGINE	SÉRUMS PRÉLEVÉS DANS LES GROUPES D'ÂGE (*)												TOTAL					
	0-4		5-9		10-14		15-19		20-29		30-39		40 +		Inconnu			
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%		
Sud	0/13	—	7/524	1	9/469	2	4/132	3	17/280	6	7/167	4	6/148	4	2/78	3	52/1811	2
Centre	0/1	—	1/67	1	1/75	1	0/18	—	1/51	2	0/73	—	2/126	2	0/61	—	5/472	1
Nord	2/21	—	2 44/416	11	16/379	4	3/57	5	10/61	16	2/15	13	3/28	11	0/10	—	80/987	8
TOTAL	2/35	6	52/1007	5	26/923	3	7/307	3	28/392	7	9/255	4	11/302	4	2/149	1	137/3270	4

(*) Positivité > 1/20

Les lésions histopathologiques observées au niveau de l'encéphale du souriceau ne se sont affirmées qu'assez tardivement. Longtemps, elles se sont limitées à des phénomènes congestifs allant jusqu'à la note hémorragique au niveau des méninges avec capillaires bourrés d'hématies, mais sans lésions des cellules neuro-ganglionnaires. Au septième passage, sont apparues des plages hémorragiques franches avec nécrose d'une partie des cornes d'Ammon accompagnée d'une réaction gliale intense avec chromatolyse et pycnose.

Les suspensions virales du neuvième passage à la dilution de 10^{-2} mises en contacts avec différents types de cultures cellulaires : KB, cellules de rein de hamster, cellules de rein de singe drill (*Mandrillus leucophocus*), fibroblastes de poulet, ont été dénuées de tout pouvoir cytopathogène. Le contrôle de virulence a été positif à la dilution de 10^{-2} sur souriceau nouveau-né en injection intracérébrale.

ENQUÊTE SÉROLOGIQUE

Une étude portant sur 3 600 sérums humains récoltés de fin 1963 à début 1966 dans diverses régions du Cameroun et

testés en réaction d'inhibition de l'hémagglutination vis-à-vis de plusieurs arbovirus africains a été publiée par ailleurs [4].

Les résultats ont permis de reconnaître trois régions principales dans le pays : 1° la région forestière du sud avec peu de virus du groupe A et prépondérance des virus du groupe B ; 2° la région du centre, plateau de savane humide où les anticorps B se raréfient et où apparaît l'influence d'un virus du groupe A, O'Nyong-nyong, probablement ; 3° la région de savane sèche du nord avec une très forte empreinte d'arbovirus des groupes A et B.

L'incidence du virus Okola paraît faible, voire nulle, sauf dans les régions du nord, comme en témoigne le tableau II.

DISCUSSION

Il s'agit d'une souche dont la validité de l'isolement est prouvée par le succès de son réisolement et sa complète indépendance vis-à-vis des autres virus africains connus. Les essais d'identification démontrent qu'il n'existe aucune relation avec les virus de la collection de l'E. A. V. R. I. ni ceux de la collection du Centre de Dakar.

La présence de ce virus paraît exceptionnelle dans la zone où ont été effectuées, de manière suivie, les captures de moustiques depuis 1964. En effet, il n'y eut qu'un seul isolement de ce type alors que de nombreuses autres souches ont été récoltées : 13 en 1964 — 65 à partir de 351 lots de moustiques totalisant 19 320 femelles réparties en 46 espèces ou groupes d'espèces, 11 en 1966 sur 378 lots réunissant 30 065 femelles en 63 espèces ou groupes d'espèces.

Au cours de ces récoltes, *Eretmapodites* groupe *chrysogaster* (5) a permis, outre YM 50-64, l'isolement des virus suivants : Spondweni, Simbu et Nkolbisson (YM 55-66, virus nouveau dont la souche prototype YM 31 a été isolée en 1965). Ce dernier paraît assez largement répandu dans cette région où il a été trouvé à six reprises différentes. Signalons que des *Eretmapodites* du groupe *Chrysogaster* entraînent dans la composition de deux lots hétérogènes ayant fourni respectivement une souche de Middelburg et une souche de Nkolbisson.

Les résultats sérologiques d'ensemble déjà exposés montrent que l'homme intervient à titre exceptionnel et certainement accidentel dans le cycle de ce virus sauf dans les régions du nord Cameroun où une étude plus précise et des essais d'isolement mériteraient d'être tentés. A proximité immédiate des lieux de capture,

(5) Le groupe *Chrysogaster* comprend, dans la région de Yaoundé, huit espèces séparables seulement par l'examen des terminalla mâles. Les deux plus fréquentes qui constituent à elles seules les 3/4 des récoltes sont *E. chrysogaster* Graham et *E. grahami* Edwards.

193 sérums ont été recueillis parmi la population vivante depuis plusieurs années dans les environs, 5 ont été positifs en I. H. A. soit 2,5 p. 100.

Parmi les hôtes animaux possibles, il paraît intéressant de signaler qu'une petite antilope de forêt de cette région, très vraisemblablement l'antilope royale, *Neotragus pygmaeus* (Linné), a fourni un sérum positif. Or, nous savons d'après les résultats acquis auprès du Lister Institute à Londres que les repas de sang d'*Eretmapodites* sont presque toujours pris sur bovidés autres que bœuf domestique, chèvre ou mouton ; il est donc possible que ces antilopes représentent un réservoir du virus et il est souhaitable de poursuivre les investigations dans ce sens.

RÉSUMÉ

Un nouveau prototype d'arbovirus YM 50-64 pour lequel nous proposons le nom d'Okola a été isolé en 1964 au Cameroun d'un lot de moustiques récoltés dans un village à 25 km de Yaoundé. Ce lot comprenait 15 femelles adultes, non gorgées, d'*Eretmapodites* groupe *Chrysogaster* et fut inoculé à des souris nouveau-nés. L'adaptation de la souche fut complète dès le troisième passage, avec généralisation de la mortalité et stabilisation de la période d'incubation à quatre jours. Les lésions histopathologiques furent nettes et démonstratives au septième passage. Le réisolement fut obtenu après vingt jours de conservation à -65°C . Résistante à la lyophilisation, sensible au désoxycholate et à l'éther, la souche fournit une hémagglutinine difficile à obtenir mais utilisable dans les réactions d'inhibition. Présentant ainsi les caractéristiques d'un arbovirus, elle fut soumise aux épreuves d'identification à l'aide des réactions d'inhibition de l'hémagglutination, de fixation du complément et de séroneutralisation vis-à-vis d'immunsérums de référence. Ces épreuves ont permis d'établir que la souche était différente des 48 arbovirus africains appartenant à la collection de référence de l'*East African Virus Research Institute* d'Entebbe (Dr Williams) et des 48 arbovirus de la collection du centre de référence de l'Institut Pasteur de Dakar (Dr Brès). Elle est provisoirement classée dans la catégorie des virus non groupés.

Un seul isolement de cette souche a été réalisé entre 1964 et 1966 pour 729 lots de moustiques. Vingt-trois autres souches de neuf virus différents ont été isolées à partir de ces moustiques dans le même temps. Il paraît donc s'agir d'un agent peu fréquent dans la région considérée. Les résultats sérologiques montrent que son incidence en immunologie humaine n'est pas significative, sauf dans le nord du Cameroun où aucune tentative d'isolement n'a encore eu lieu.

SUMMARY

YM 50-64, a new arbovirus prototype designed as Okola virus has been isolated from a pool of 15 *Eretmapodites* gr. *chrysogaster* captured in 1964, at 25 km from Yaounde (Federal Republic of Camerouns).

Okola virus showed physical and chemical properties of an arbovirus. It was difficult to obtain its hemagglutinating antigen. This strain proved to be serologically different from all african arbovirus to which it was compared by complement fixation and neutralisation tests both at the East African Virus Research Institute (Entebbe) and the Pasteur Institute (Dakar). It is therefore temporarily classed in the non grouped mosquito born viruses.

A very low percentage of the inhabitants of Camerouns possessed hemagglutination-inhibition antibodies, except in the north of the country.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 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, 41, 585-591.
- [2] 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, 44, 739-747.
- [3] BROTTES (H.), RICKENBACH (A.), BRÈS (P.), SALAÛN (J. J.) et FERRARA (L.). Les arbovirus au Cameroun ; isolement à partir de moustiques. *Bull. Org. mond. Santé*, 1966, 35, 811-825.
- [4] SALAÛN (J. J.) et BROTTES (H.). Les arbovirus au Cameroun ; enquête sérologique. *Bull. Org. mond. Santé*, 1967, 37, 343-361.
- [5] WILLIAMS (M. C.). East African Virus Research Institute. Government printer, Entebbe (Uganda). *Report*, 1966, p. 24.