

UNIVERSITE DE CLERMONT FERRAND II

Mémoire présenté pour l'obtention du
grade de Docteur d'Etat es Sciences

par

Jean Paul GONZALEZ

né le 28 Aout 1947 à Royan

LES ARENAVIRUS D'AFRIQUE; ESSAI POUR UNE DEFINITION D'UN
COMPLEXE VIRAL ORIGINAL.

soutenu le 21 Décembre 1984

Jury :	J.P. LARPENT	Professeur.....président
	D. BEYTOUT	Professeur
	J. BRUHNES	Professeur
	J.B. MCCORMICK	Docteur

LE VIRUS MOBALA
ET
LES ARENAVIRUS D'AFRIQUE:
CONTRIBUTION A LEUR EPIDEMIOLOGIE, HYPOTHESE SUR
LEURS PARENTES PHYSICO-CHIMIQUES ET GENETIQUES,
ESSAI SUR LE "GROUPE LASSA".

SOMMAIRE

PRÉAMBULE

1. INTRODUCTION: Du virus de la Chorioméningite Lymphocytaire au virus Mobala
La fièvre de Lassa.
2. MATERIEL, METHODES ET TECHNIQUES
 - 2.1. Présentation du milieu
 - 2.2. Récolte et conditionnement des échantillons
 - 2.3. Le laboratoire de haute sécurité; le risque biologique.
 - 2.4. Souches virales
 - 2.5. Cultures cellulaires
 - 2.5.1. Lignées cellulaires
 - 2.5.2. Croissance et maintien des cultures
 - 2.5.3. Préparation des inoculats et inoculation des cellules
 - 2.5.4. Méthode des plages
 - 2.6. Modèle et réservoirs animaux
 - 2.7. Microscopie électronique
 - 2.8. Anticorps monoclonaux
 - 2.9. Immunofluorescence sur cellules infectées
 - 2.10. Essais sérologiques
 - 2.11. Méthodes d'analyse des protéines
 - 2.11.1. Croissance et marquage des virus
 - 2.11.2. Purification et préparation des échantillons pour l'électrophorèse
 - 2.11.3. Electrophorèse des protéines virales
 - 2.11.4. Marquage et extraction des protéines virales intracellulaires
 - 2.11.5. Immunoprécipitation en gel de polyacrylamide
 - 2.11.6. Carte peptidique

2.12. Méthodes d'analyse des Nucléotides

2.12.1. Marquage de l'ARN in vivo

2.12.2. Densité de la nucléocapside en chlorure de césium

2.12.3. Extraction de l'ARN

2.12.4. Analyse de l'ARN sur gradient de sucrose

2.12.5. Electrophorèse en gel d'agarose

2.12.6. Carte des oligonucléotides de digestion

2.13. Milieux et isotopes radioactifs

2.13. Abréviations

3. RESULTATS ET COMMENTAIRES

3.1. Premières approches sérologiques

3.2. Isolement d'un nouvel Arenavirus en RCA, le virus Mobala

3.3. Recherche de zones d'endémie et sérologie comparée

3.4. Caractéristiques physico-chimiques des virus Lassa, Mopeia et Mobala.

3.4.1. Microscopie électronique

3.4.2. Immunofluorescence indirecte

3.4.3. Protéines de structure

3.4.4. Acide Ribonucléique

3.5. Caractéristiques biologiques des virus Lassa, Mopeia et Mobala

3.5.1. Inoculation au souriceau nouveau né

3.5.2. Inoculation aux cultures cellulaires

3.6. Parentés antigéniques des arenavirus d'Afrique

3.7. Distances génétiques des arenavirus d'Afrique

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES: Essai sur un groupe viral nouveau, le complexe Lassa.

6. BIBLIOGRAPHIE CITEE

7. LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

8. Le virus Lassa et les arénavirus d'Afrique: Bibliographie complète

PREAMBULE

Il est aisé de discerner en Biologie deux tendances, l'une évolutionniste, l'autre moléculaire, "deux attitudes qui finissent par s'opposer radicalement". François Jacob nous donne ainsi dans "La logique du Vivant" une des raisons qui ont pu faire paraître à certains la Biologie comme une science divisée et hétérogène. Cet aspect morcelé peut être ressenti par le chercheur lui même; son désir d'exceller dans le domaine qui est le sien, le contraint trop souvent à délaisser certains aspects de la Biologie qui lui semblent lointains ou d'un intérêt limité dans la quête qu'il poursuit. Enfin tous les biologistes reconnaissent aisément l'étendue de la Science de la Vie et trouveraient bien vain de pouvoir l'embrasser en une seule fois

Pour rester dans ce vaste domaine de la Biologie que nous ne quitterons plus tout au long de ce travail, voyons comment se place l'Ecologie dans la Science biologique. Dajoz nous parle de l'écologiste comme celui qui étudie les organismes, les populations, les biocénoses, les écosystèmes et la biosphère, cela par opposition aux biologistes moléculaires qui étudient les macromolécules et aux cytophysiologistes qui étudient les cellules et les organes. L'Ecologie se situerait donc dans la tendance intégriste évoquée plus haut.

De fait, l'Ecologie Virale, qui sera l'objet de notre

propos, se place au milieu de ces tendances par l'essence même du matériel qu'elle étudie: Le virus, être moléculaire, son environnement, le monde végétal et le monde animal. Quand on veut parler d'Ecologie Virale, les définitions classiques deviennent difficilement utilisables et les concepts déplacés. L'Ecologie Virale conduit le Virologue à porter son intérêt au delà et en deçà du germe: la composition du virus au niveau moléculaire est en fait sa carte d'identité ; l'hôte obligatoire sans lequel le germe ne pourrait survivre constitue son écosystème, limité à une biocénose particulière faite de matière organique. Enfin la place de cet hôte dans la nature et l'environnement dans lequel il circule conditionnent le maintien du virus dans ce second écosystème, ce macroenvironnement cette fois ci propre à l'hôte. Vue sous cet aspect, l'étude virologique ne nous met-elle pas alors dans une situation particulière où les deux tendances énoncées plus haut, coexistent et plus encore sont au service l'une de l'autre? C'est le pari que nous avons fait, tenter de comprendre les relations de l'être moléculaire dans son environnement macroscopique en utilisant à la fois l'analyse évolutionniste et l'analyse moléculaire. L'échange permanent entre ces différentes approches nous a permis une approche pour la compréhension globale de la dynamique de ces morceaux d'acides nucléiques que sont les virus perdus dans l'immensité de la biosphère. De là procède notre synthèse, dans le continuum de "la logique du vivant".

A la faveur de l'isolement d'un nouvel arenavirus en

Afrique, notre intérêt s'est porté sur ce groupe des maladies humaines d'apparition soudaine et redoutables que sont les Fièvres Hémorragiques et en particulier la Fièvre de Lassa. La pratique de la Médecine Tropicale dans le Tiers Monde force le praticien non seulement à l'observation du malade mais aussi à celle de l'environnement dans lequel celui-ci évolue. En effet le diagnostic biologique n'intervient que rarement pour confirmer un diagnostic étiologique posé au lit du malade. La thérapeutique s'engage le plus souvent après un simple examen et un diagnostic de présomption. L'observation, tout au long de ces démarches, joue un rôle fondamental dans la recherche étiopathogénique, la thérapeutique, et l'analyse d'un éventuel risque épidémique. L'Homme en milieu tropical est en effet plongé dans une nature riche et grouillante de vie. Au même titre que les autres vertébrés de son règne, il se trouve mis en compétition permanente mais nécessaire dans cet environnement où toute forme de vie tente son émergence et où les pathogènes déploient une ardeur égale dans la quête d'un hôte.

Confronté à cette mosaïque de "bons et de mauvais", le médecin tropicaliste pose le décor d'une pathologie quotidienne dans laquelle il aura à organiser sa démarche. Face aux épidémies soudaines et réitérées les tactiques s'affinent, mais c'est un grand désarroi quand le germe est nouveau et la lutte incertaine. Quand une épidémie d'un type jusque là méconnu éclate, mortelle et ravageuse, le chercheur s'interroge pour retrouver dans des décennies d'observation la trace de celle ci alors non identifiée. C'est ainsi que les Fièvres Hémorragiques

ont trop souvent confronté le médecin et le chercheur à ces phénomènes dont l'apparition reste souvent inexplicée. Ainsi sont apparues dans la seconde moitié de ce siècle, quand nous pensions avoir exploré largement notre Monde, de nouvelles maladies tropicales graves et étendues. K.M.Johnson [1979] l'exprimait-il ainsi dans un bref editorial sur la Maladie d'Ebola destiné aux médecins: "...major epidemics of acute hemorrhagic fever...as a poignant reminder that infectious "plague" have not been, nor are they likely seen to be, eliminated from our World."

Quatre fois en 25 ans, des virus de la famille des Arenaviridae furent impliqués dans de telles épidémies. Ces virus infectent dans la nature les rongeurs de façon chronique, et quand ils se transmettent à l'Homme, la clinique montre un spectre qui s'étale de l'infection inapparente à une symptomatologie gravissime de fièvre hémorragique souvent mortelle. Néanmoins, ces événements douloureux forcent l'opiniâtreté de l'Homme de science à comprendre pour vaincre. Le naturaliste et le chercheur provoqué par ces nouveaux mystères, iront souvent en une longue quête tenter d'expliquer l'oeuvre de la Nature.

Pour situer notre recherche dans cet ensemble encore peu connu des Fièvres Hémorragiques d'Origine Virale, nous avons voulu présenter brièvement ce qu'est ce groupe d'affections qui en quelques années de rares exposés développés en fin de meeting occupe aujourd'hui rang de symposium dans les réunions

internationales. Le terme de Fièvres Hémorragiques regroupe plusieurs maladies virales dont les agents infectieux de biologies variées appartiennent à des groupes taxonomiques divers. L'unité de ces affections s'est faite à l'origine autour du tableau clinique que leur appellation désigne en partie: Un syndrome hémorragique d'intensité variable révélant un pouvoir infectieux élevé et un génie évolutif mal connu en sont les caractères essentiels. Du point de vue géographique on distingue les Fièvres Hémorragiques d'Amérique du Sud (La Fièvre Hémorragique d'Argentine et la Fièvre Hémorragique de Bolivie), les Fièvres Hémorragiques d'Afrique (La fièvre de Lassa, la Maladie d'Ebola, la Maladie de Marburg et la Fièvre de la Vallée du Rift), les Fièvres Hémorragiques d'Eurasie (Fièvre Hémorragique d'Omsk, Maladie de la Forêt de Kyasianur) et enfin la Fièvre Hémorragique avec Syndrome Rénal (FH de Corée, Néphroso-néphrite Hémorragique d'URSS, Néphropathie Epidémique de Scandinavie ou Néphropathie Murine) qui semble avoir une répartition mondiale n'épargnant jusqu'ici que l'Australie et l'Océanie. Les Dengues et la Fièvre Jaune, bien que responsables de syndromes hémorragiques graves, n'ont pas été introduites dans ce groupe en raison de l'ancienneté et l'importance des études entreprises à leur sujet, la qualité de la vaccination amarile, et la faible pathogénicité habituelle du virus de la Dengue qui peut être aisément manipulé au laboratoire.

1. INTRODUCTION

C'est en 1933 qu'un nouveau virus est isolé d'un cas fatal d'encéphalite chez l'Homme par Armstrong et Lillie [1934]. Ce virus ne fait alors qu'une entrée timide dans le monde en pleine expansion de la Virologie et est désigné comme Lymphocytic choriomeningitis Virus (LCMV) ou virus de la Chorio-Méningite Lymphocytaire (Virus CML). Peu après Rivers et Scott [1935], isolent celui ci dans plusieurs cas humains de méningites aseptiques, enfin Traub en 1936 isole le virus de colonies de souris infectées. Progressivement ce nouveau virus provoque l'intérêt des chercheurs, en particulier après les travaux de Traub et permet ainsi de poser les bases de l'immunobiologie du LCMV. En 1939, Armstrong et Sweet démontrent l'apparition de la maladie chez l'homme en relation directe avec des souris infectées in natura. Ces résultats princeps, au delà des voies nouvelles ouvertes à l'étude de la pathogénie, de l'écologie et de l'immunologie virale, favorisent l'établissement des théories sur la tolérance immunitaire [Burnet and Fenner, 1949]. En effet le LCMV a la propriété d'infecter de façon chronique non seulement les cellules en culture mais aussi la souris de laboratoire et de se transmettre verticalement sur plusieurs générations. Ce modèle expérimental exceptionnel sert encore aujourd'hui dans l'étude de l'immunotolérance et l'établissement du concept de maladies liées aux immunocomplexes [Buchmeier et coll., 1980], et dans la compréhension du complexe

majeur d'histocompatibilité entre cellules [Zinkernagel and Doherty, 1979].

En 1968, Dalton et coll. décrivent la morphologie du LCMV en microscopie électronique et apportent une description originale qui deviendra le caractère clé d'une nouvelle famille et servira à nommer le nouveau taxon; En effet la microscopie met en évidence à l'intérieur des particules virales la présence de structures denses aux électrons, ces éléments seront plus tard être identifiés aux ribosomes appartenant à la cellule hôte [Pedersen, 1973]. Ainsi en 1970, Rowe et coll., proposent le nom d'Arenavirus (arenosus lat.= sableux) pour marquer l'originalité de la capture de grains ribosomiaux à l'intérieur des virions et le comité de nomenclature accepte le genre unique des Arenavirus dans la nouvelle famille des Arenaviridae [Wildy, 1971]. En 1958, est isolé l'agent de la Fièvre Hémorragique d'Argentine par Parodi et coll., puis en 1963 le virus Tacaribe par Downs et coll., et enfin Johnson et coll. isole en 1965 le virus de la Fièvre Hémorragique de Bolivie. Les liens de parenté entre ces différents isolats ne seront mis en évidence que progressivement [Mettler et coll., 1963], et c'est Johnson qui en 1965 émet l'hypothèse de l'appartenance à un même groupe de ces virus et du LCMV anticipant ainsi sur l'organisation de cette nouvelle famille presque 10 ans avant son établissement définitif.

Ce n'est qu'en 1974 que Pfau et coll. sur la base des données biologiques, sérologiques et ultrastructurales définissent de façon complète les caractéristiques de cette nouvelle famille. Ce groupe s'est alors enrichi d'autres souches virales isolées

pour la plupart aux Amériques et pour l'une d'entre elles en Afrique; On dénombrait en 1977 onze espèces d'Arénavirus .

ARENNAVIRIDAE

CML	1933	Amérique, Europe
Junin	1958	Argentine
Tacaribe	1963	Trinidad
Machupo	1965	Bolivie
Amapari	1966	Brésil
Tamiami	1970	Floride
Parana	1970	Paraguay
Lassa	1970	Nigeria
Pichinde	1971	Colombie
Latino	1973	Bolivie

L'intérêt suscité par le LCMV au point de vue purement virologique se transforme en une préoccupation permanente des virologues, médecins et biologistes responsables de secteurs de Santé Publique. En effet, les Fièvres Hémorragiques qui avaient éclaté en Argentine et en Bolivie suscitèrent un grand émoi en raison de l'infectiosité des germes mis en cause et du pronostic sévère de la maladie. En 1969 la Fièvre de Lassa est décrite en Afrique, un arénavirus est pour la première fois rendu responsable d'une Fièvre Hémorragique dans l'Ancien Monde. Dès les premières observations on identifie la Fièvre de Lassa comme une maladie grave, de mauvais pronostic et dotée d'un génie épidémique à caractère rapidement évolutif. En fait elle vient directement s'inscrire dans ce groupe des Fièvres Hémorragiques au même titre que la Fièvre Hémorragique d'Argentine et la Fièvre Hémorragique de Bolivie. Ainsi, à partir de cette époque, les Arénavirus prennent une dimension planétaire et suscitent de nombreuses recherches tant en virologie fondamentale qu'en

épidémiologie et en pathologie comparée.

Après la dramatique et brutale apparition de la Fièvre de Lassa, des épidémies sont observées dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest [Monath, 1975] et Fraser et coll. [1974], démontrent l'existence d'une zone d'hyperendémicité de la maladie en Sierra Leone. Dès la preuve de l'origine virale de la maladie par l'isolement de l'agent étiologique, Buckley et Casals [1969], posent la question de la préexistence de la Fièvre de Lassa en Afrique. Casals porte alors à l'attention de la communauté scientifique les éléments de publications anciennes qui mentionnaient des fièvres pseudo-typhiques en Afrique Centrale [LeGac, 1946b] et en Haute Volta [Le Gac, 1946a]. Ces observations rapportaient un syndrome typhique sans étiologie connue, de clinique proche de celle rencontrée dans la Fièvre de Lassa avec une mortalité élevée (environ 50%). Monath [1975] nous donne en fait trois raisons pour lesquelles cette maladie aurait été méconnue jusqu'à une date tardive: La faible couverture géographique des services de Santé Publique, la relativement récente utilisation d'antibiotiques pour traiter le typhus et d'autres affections présentant un tableau clinique proche de celui de la Fièvre de Lassa comme le Paludisme ou certaines arboviroses [McCormick et coll, 1980], et enfin la densité autrefois faible mais aujourd'hui croissante de rongeurs péri-domestiques due au défrichement et à l'agriculturisation. La Fièvre de Lassa est aujourd'hui considérée comme une zoonose enzootique avec un cycle interhumain fréquent mais non obligatoire. Quand les conditions de densité de population humaine et animale sont réunies dans une

même zone, la Fièvre de Lassa, si elle préexiste dans la population de rongeurs peut s'établir de façon hyperendémique et le risque pour les populations humaines augmenter en particulier lors d'un passage à une transmission de type nosocomial. Le rôle du rongeur du genre Mastomys est au centre de la compréhension de l'épidémiologie de ce virus; Ce rongeur péri-domestique est considéré comme le réservoir de virus en Afrique de l'Ouest [Monath et coll., 1974; Wulff et coll., 1975]. Toutefois, des expériences préliminaires de réduction de populations de Mastomys n'ont pas montré une diminution de l'incidence de la maladie dans les populations humaines de zone hyperendémique en Sierra Leone (Keenlyside et coll., 1983).

Les travaux concernant l'épidémiologie, la pathogénicité et la thérapeutique de la Fièvre de Lassa ont été particulièrement développées ces dernières années en Sierra Leone; dans ce pays, de 1977 à 1979, sur 3844 patients hospitalisés 12% se sont avérés être des cas de Fièvre de Lassa et représentaient 30% de la totalité des décès enregistrés dans les deux hôpitaux surveillés [McCormick et coll., 1980; McCormick, King, Webb et Johnson, non publié]. Aujourd'hui la Fièvre de Lassa en Afrique de l'Ouest est considérée comme un problème de santé publique important dont l'étendue reste à déterminer mais doit être certainement considérable (Peters, 1984).

Après l'isolement du virus de Lassa chez le rongeur du genre Mastomys par Monath et coll. en 1974, trois autres isollements d'Arénavirus se succèdent chez des rongeurs dans des

régions différentes d'Afrique: au Mozambique d'abord où Herta Wulff et coll. [1977] isolent de Mastomys natalensis un arenavirus antigéniquement proche du virus Lassa, puis au Zimbabwe, un arénavirus est isolé de Mastomys natalensis par Johnson et coll.[1981]; enfin nous isolons de rongeurs sauvages capturés en Centrafrique un arénavirus antigéniquement proche des précédents mais aisément discernables [Gonzalez et coll.,1983]. A partir de ces isolats variés de par leurs origines géographiques et leurs hôtes, nous allons explorer de la façon la plus étendue possible ce qui apparaît déjà comme un groupe des arenavirus d'Afrique. Au fur et à mesure de nos échecs et de nos modestes progrès nous nous trouvons confrontés non plus à 4 ou 5 biotypes de virus proches les uns des autres, mais plutôt à des groupes de souches virales pouvant être distingués par leurs origines géographiques mais aussi par certains de leurs caractères biologiques et physico-chimiques.

En moins de cinq années, nous assistons à la constitution d'une entité analogue à celle connue comme le complexe Tacaribe au Nouveau Monde.

Nous avons voulu présenter ici le long cheminement qui nous a conduit au cours de cinq années du terrain centrafricain aux laboratoires hautement spécialisés des Etats Unis d'Amérique pour étudier le virus Lassa et les virus qui lui sont proches. Les conditions parfois difficile de la récolte des échantillons en climat équatorial ont été doublées du travail long et délicat imposé par les manipulations dans un laboratoire de haute

sécurité. Néanmoins la richesse du matériel étudié et la diversité des techniques auxquelles nous avons pu accéder ont rendu notre quête passionnante et des questions nouvelles sont apparues et ne font que raviver aujourd'hui notre enthousiasme du début.

Le bilan de ces années consacrées à un même sujet reste toutefois très fragmentaire et nous sommes conscient de sa faiblesse qui nous a obligé à travailler dans des domaines variés sans pouvoir jamais les exploiter intrinsèquement jusqu'à leurs limites. Cette approche qui peut paraître de prime abord trop dispersée nous a paru néanmoins nécessaire pour débrouiller la trame serrée et nouvelle des Arenavirus d'Afrique.

2-1. Présentation du milieu

2-1-1. Phytogéographie

L'essentiel de nos travaux personnels concerne le Centrafrique. Nous y avons prélevé de nombreux échantillons, nous avons exploré largement le pays et c'est encore là que nous travaillons aujourd'hui sur ce sujet difficile des Fièvres Hémorragique d'Origine Virale. Pour cette raison nous nous étendrons plus largement sur la présentation du milieu Centrafricain et nous ne ferons que citer, pour pouvoir les comparer, les autres zones d'Afrique où le virus de Lassa existe ou pourrait circuler.

Pour revenir au Centrafrique et au propos qui nous intéresse, nous avons opté, et cela comme nombre d'épidémiologistes et microbiologistes de terrain, pour la reconnaissance globale d'un écosystème au travers de sa représentation phytogéographique. En effet pour une zone donnée, les composantes pédologiques, géologiques, géomorphologiques et climatologiques ont pour résultante un couvert végétal original; les espèces végétales représentées par leur fréquence et leur distribution restent le témoin de cette somme. Ainsi l'analyse botanique qualitative et quantitative par référence à une partie de territoire donné permet une cartographie des essences compagnes et de leur abondance relative.

La variété des terrains rencontrés en Afrique sous différentes latitudes a donné à la littérature de nombreuses interprétations phytogéographiques. Géographes et botanistes ont souvent apporté

leur propre terminologie ce qui a souvent rendu confus les tentatives de comparaison entre des pays où des auteurs différents avaient travaillé. Pour le Centrafrique, Boulvert [1980] nous donne une "esquisse phytogéographique" qui reste un modèle de clarté et une aide précieuse tant pour les sciences humaines que pour les sciences biologiques. Nous nous sommes largement inspirés de la carte proposée par Boulvert pour rechercher sur le terrain les zones à prospector et retrouver d'éventuelles corrélation avec la prévalence en anticorps humains ou animaux. Nous présentons une carte simplifiée des domaines phytogéographiques de la R.C.A. (Figure 1).

Enfin nous avons voulu présenter à très grande échelle une esquisse des domaines phytogéographiques d'Afrique, recomposée à partir de documents variés (Figure 2).

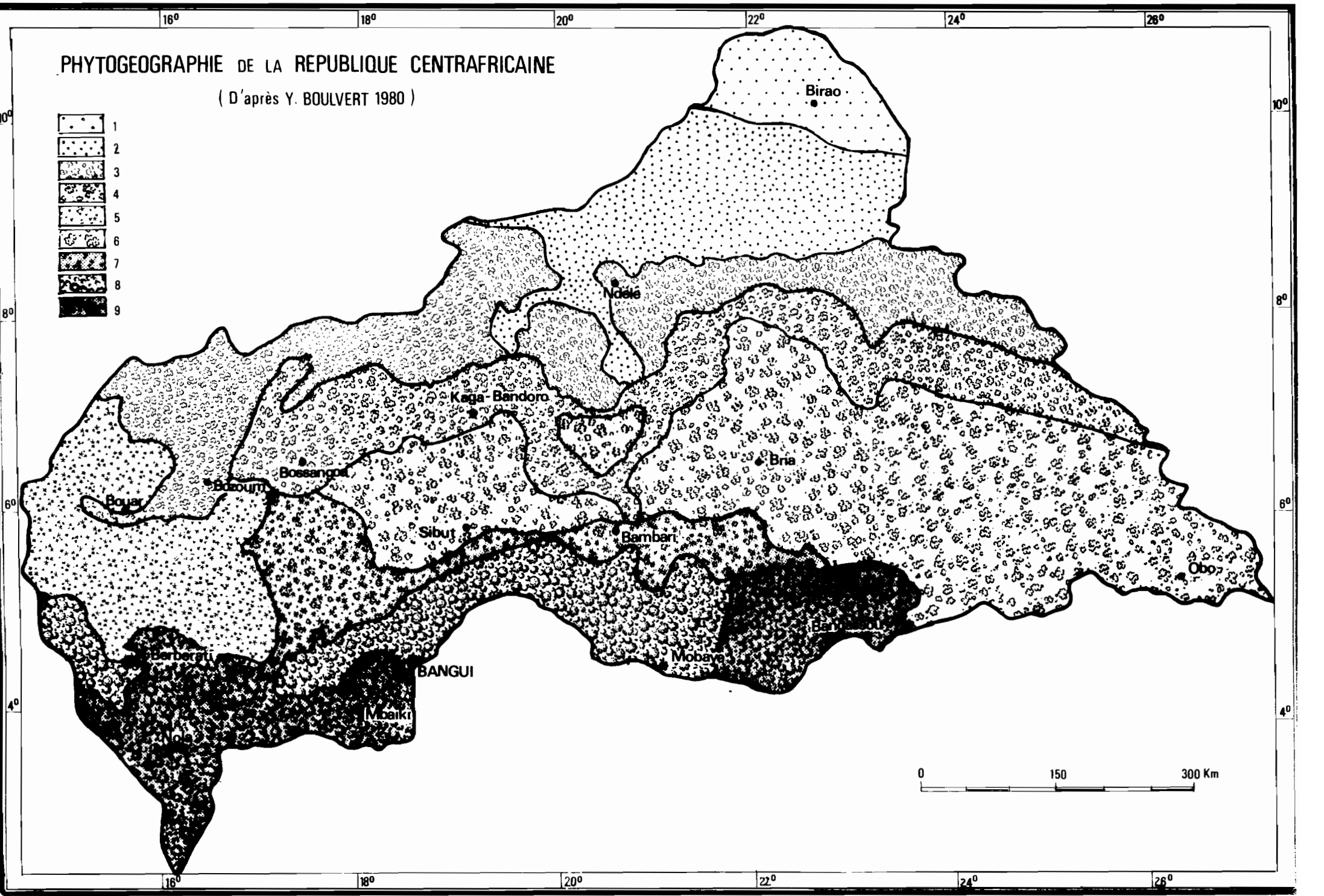
FIGURE 1: CARTE PHYTOGEOGRAPHIQUE DE LA
REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE (D'après I.Boulvert, 1980).

Domaine soudano-sahélien:	
Secteur sahélo-soudanien.....	1
Secteur soudano-sahélien	2
Domaine medio soudanien:	
Secteur medio-soudanien	3
Secteur sub-soudanien	4
Domaine soudano-guinéen:	
Secteur nord-nord ouest.....	5
Secteur centre et est.....	6
Secteur sud	7
Domaine congo-guinéen:	
Secteur guineo-soudanien.....	8
Secteur congo-guinéen.....	9

Légende détaillée dans les pages suivant la carte

PHYTOGEOGRAPHIE DE LA REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

(D'après Y. BOULVERT 1980)



LEGENDE DE LA FIGURE 1

Domaine soudano-sahélien

Secteur sahélo-soudanien (1): steppe herbacée à Sclerocarcya birrea, Acacia seyal et Ziziphus mucromata.

Secteur soudano-sahélien (2): savane arborée claire à Terminalia laxiflora.

Domaine Medio-soudanien

Secteur médio-soudanien type (3): zone de savannes boisées à avec une strate herbacée à Cymbopogon giganteus, et de forêts sèches résiduelles à Anogeissus. Elle se caractérise par l'apparition d'espèces septentrionales comme le Karité (Butyrospermum paradoxum) et la présence déjà de savanes à espèces mélangées.

Secteur sub-soudanien (4): savanes à espèces mélangées à Terminalia laxiflora, Grewia mollis et Combretum hypopilinum.

Domaine soudano-guinéen

Secteur NW-N (5): Savanes anthropiques à Daniella, Lophira avec surpâturage et embuisonnement par Harungana madagascarensis et Samonea leptophylla (Région de Bouar). Des savanes boisées à Lophira lanceolata et Burkea africana dans la région de Carnot.

Secteur central et oriental (6): forêts denses semi-humides à Anogeissus leiocarpus et Albizia zygia.

Secteur sud (7): Dégradation anthropique probable de la végétation ligneuse de la forêt dense semi-humide, dominée aujourd'hui par Daniella olivieri et Terminalia glaucescens.

Domaine congo-guinéen

Secteur guineo-soudanien (8): secteur préforestier à Terminalia glaucescens, Albizia zygia, avec une strate herbacée à Pennisetum purpureum, Aframomum sp. et Hyparrhenia bracteata.

La végétation arborée qui occupe les plaines du bassin oubanguien, est souvent dégradée pour se transformer en savanes anthropiques.

Ce sont alors des savanes herbeuses à Pennisetum purpureum ("Herbe à éléphant"), à Imperata cylindrica et à Aframomum sp.. Les espèces ligneuses sont souvent réduites à des espèces banales dites pyrophiles qui résistent aux feux de brousse: Anona senegalensis, Terminalia glaucescens.

Secteur congo-guinéen (9): Forêt dense humide semi caducifoliée (composée principalement de Sterculiacées, Ulmacées, Sapotacées et Méliacées) à Triplochiton scleroxylon, Terminalia superba et Celtis spp.. A la pointe sud-ouest du pays en Basse Sangha on trouve une forêt mixte semi-caducifoliée et sempervirente (De type homogène à Gilbertiodendron dewevrei ou de type forêt ripicole à Guibourtia demeusei et Uapaca guineensis. En lisière Aubrevillea kerstinii devient l'espèce dominante. Plusieurs observations faites au cours des dernières décennies [Sillans, 1959; Ulvert, 1980] tendent à montrer une expansion de la forêt sur la savane malgré l'action de défrichement due à la mise en culture ou à l'exploitation de la forêt.

A l'intérieur de ces différents secteurs on peut décrire des districts correspondant à un peuplement végétal spécifique dérivé

des caractères généraux propres au secteur. Enfin il existe quelques peuplements particuliers et limités à type de bambousaies, rônèraies ou doumeraies. Certains écosystèmes sont profondément transformés sur des surfaces plus ou moins étendues par des cultures arbustives (Café, palmier à huile, hévéa, coton).

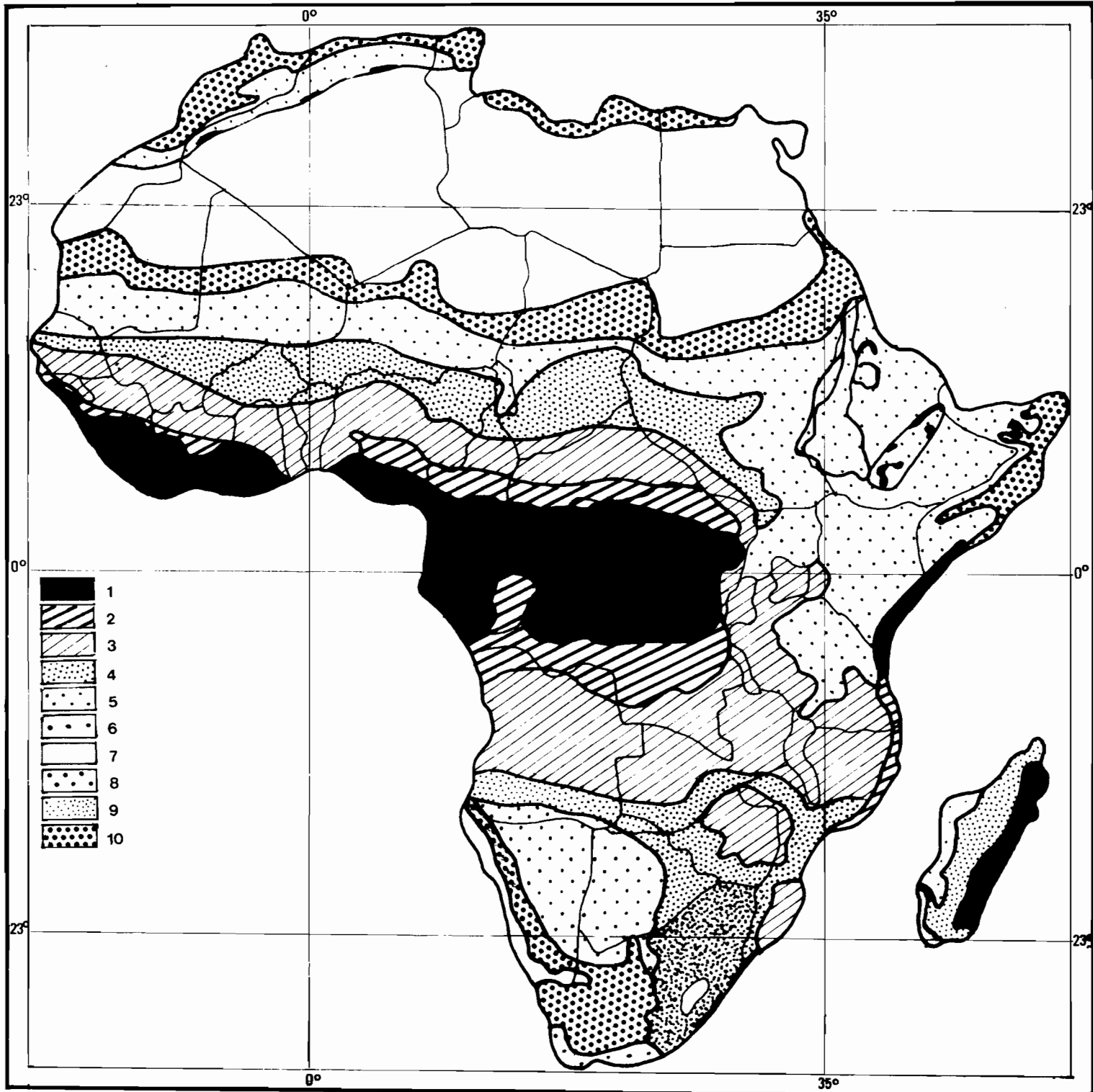
FIGURE 2: PAYSAGES DE REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE:

- A. Village rue en secteur sud-soudano-guinéen
- B. Derrière les habitations commence la savane arborée et forêt galerie, zone privilégiée de piègeage des rongeurs péri-domestiques.
- C. Domaine soudano-guinéen des savanes arborées à végétation ligneuse dégradée anthropique:
- L.l.: Lophira lanceolata
 - D.o.: Daniella olivieri
 - F.p.: Pennisetum purpureum

FIGURE 2: CARTE DES DOMAINES PHYTOGEOGRAPHIQUES D'AFRIQUE.

Légende:

- 1- Domaine congo-guinéen: Forêt tropicale humide
- 2- Domaine soudano-guinéen: Mosaïque de forêt-savane
- 3- Domaine medio-soudanien: Savane arborée
- 4- Domaine soudanien: Savane sèche
- 5- Domaine soudano sahélien: Steppe herbeuse et boisée
- 6- Domaine sahélien: Steppe sèche, Sahél
- 7- Domaine saharien: Désert
- 8- Domaine méditerranéen: Maquis
- 9- Domaine du Natal: Prairie herbeuse de climats tempéré et sub-tropical
- 10- Domaine montagnard



DOMAINES PHYTOGEOGRAPHIQUES DE L'AFRIQUE

2.1.2. Climatologie

Du point de vue climatique, la carte phytogéographique restant le marqueur le plus sensible qui soit, nous nous sommes donc bornés à ne présenter que des éléments généraux afin d'articuler en particulier les rythmes saisonniers sur le terrain observé.

Pour l'ensemble du pays, la moyenne des températures est de 26°C avec une moyenne des maxima de 31°C et une moyenne des minima de 26°C. L'humidité relative est en moyenne de 77% avec une moyenne maximale de 96% et une moyenne minimale de 55% [Fajot, 1973]. Le climat peut être qualifié de tropical humide au Sud pour devenir plus sec vers le Nord-Est; De la même façon, du Sud au Nord, la pluviométrie diminue et la durée de la saison des pluies diminue [Boulvert, 1980].

Enfin si on se réfère d'une part à la carte phytogéographique de la République Centrafricaine (Figure 1) et d'autre part à la carte des précipitations (Figure 3) on peut décrire trois grands types de climats:

1- Un climat sub-sahélien avec une limite sud à l'isohyète 1200mm. La saison sèche qui s'y étend de Novembre à Juillet est plus longue que la saison des pluies. L'amplitude thermique est élevée en saison sèche; on a pu par exemple enregistrer à Birao un maximum absolu de 44,2°C en Mars 1953, et un minimum absolu de 3,1°C en Janvier 1956. L'hygrométrie varie d'une moyenne de

97% en Juillet, Août, Septembre et Octobre à 41% en Février [Sillans, 1958].

2- Un climat de type intertropical avec une limite sud à l'isohyète 1500mm. Les deux saisons sont bien marquées; Une saison sèche de Novembre à Avril, caractérisée par une période de petites pluies ("pluie des mangues") de Décembre à Février. La saison des pluies de Avril à Novembre est caractérisée par trois périodes égales de pluies dont la fréquence varie de moyenne à fréquente puis moyenne annonçant le début de la saison sèche. Les amplitudes thermiques et hygrométriques sont fortes en saison sèche et faibles en saison des pluies.

On note dans la région de Bouar un climat particulier, lié à une élévation relative du terrain (1000m) où le climat reste de type intertropical mais plus frais et plus orageux.

3- Un climat de type équatorial correspondant au Domaine congo-guinéen: De Décembre à Février se situe la saison sèche avec des températures minimales enregistrées de la mi-Décembre à la fin Janvier et la formation de brumes caractéristiques de cette saison en forêt. La saison des pluies présente le même type de distribution dans la fréquence des précipitations que pour le climat intertropical mais quantitativement augmentées. L'humidité reste élevée et les températures subissent de faibles variations d'amplitude.

Sur la carte des précipitations figurent les principales localités explorées lors de nos études. Ces localités

représentées de façon ponctuelle sur la carte ont en fait été explorées dans un rayon de 5 à 25km pour la collecte des échantillons humains ou animaux.

FIGURE 3: CARTE DES PRECIPITATIONS ANNUELLES* EN
REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE (D'après R.Chabras, 1976)

LEGENDE:

(* Exprimées en millimètres

. Les différents points de prélèvements humains et de capture
de rongeurs figurent par le nom de l'agglomération concernée.

. Préfectures et leur département:

Bangui (Ombella M'Poko)

M'Baiki (Lobaye)

Sibut (Kemo Gribingui)

Bouar (Nana Mambere)

Bozoum (Ouham Fende)

Bossangoa (Ouham)

Berberati (Haute Sangha)

Carnot (Sangha)

Birao (Vakaga)

N'Dele (Bamingui Bangoran)

Bambari (Ouaka)

Bangassou (M'Bomou)

Mobaye (Basse Kotto)

Obo (Haut M'Bomou)

Bria (Haute Kotto)

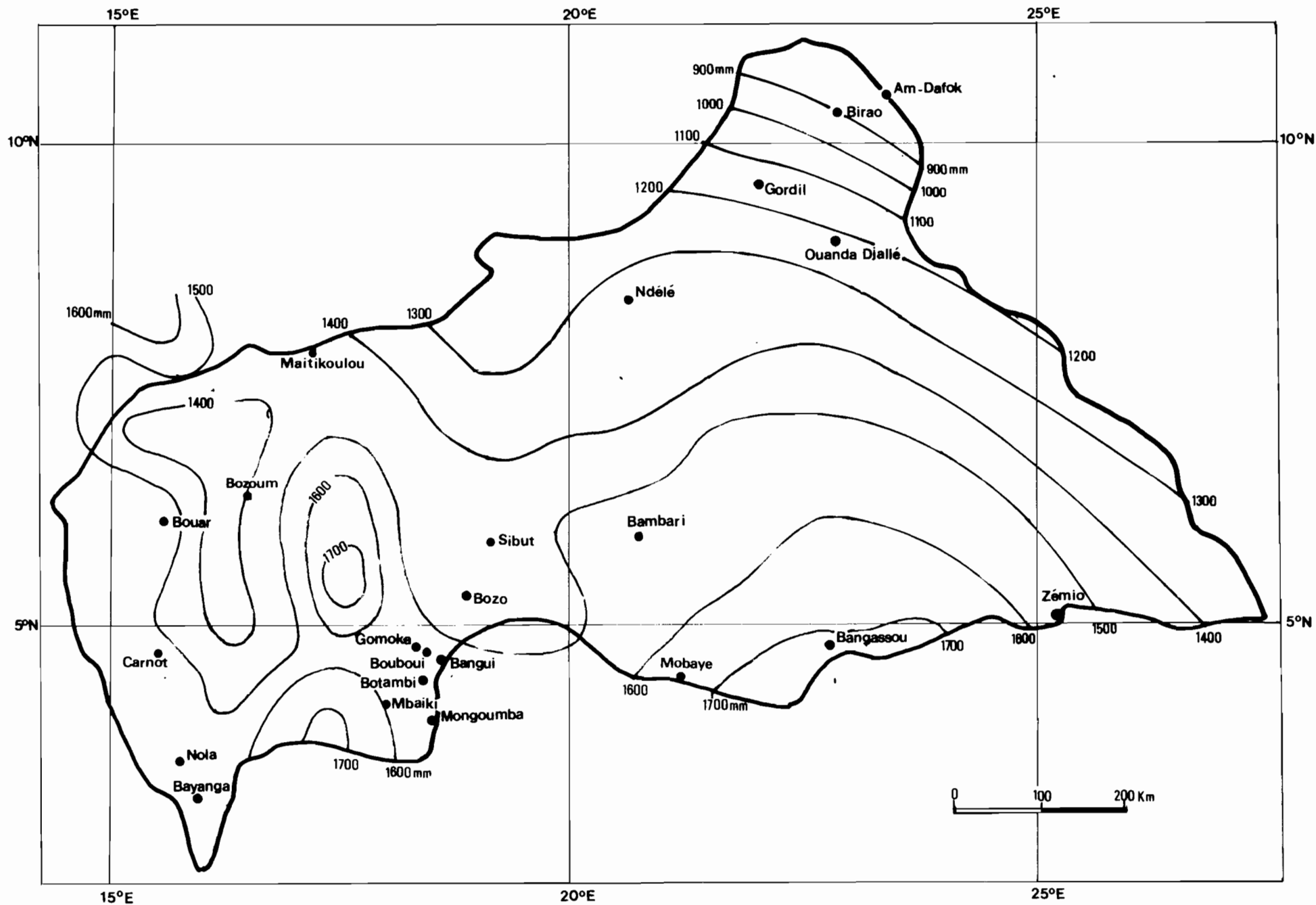


Fig. 4 Pluviométrie annuelle moyenne

2.2. La récolte et le conditionnement des échantillons

Les échantillons de sang humain ont été prélevés au pli du bras sur des tubes secs à vide partiel de type Vacutainers™. Après rétraction du caillot pendant une heure à la température ambiante, le sang été centrifugé surplace (800 tpm pendant 3 minutes. Centrifugeuse de table Prolabo™ et groupe électrogène), le sérum décanté et conditionné dans des tubes de polypropylène à vis (3ml-NUNC™). Ce matériel était ensuite conservé à 4°C pendant la durée de la mission, de 1 à 10 jours (Réfrigérateur à gaz). De retour au laboratoire il était stocké à -20°C (Congelateur Revco™) jusqu'au jour de son utilisation.

Les rongeurs ont été capturés dans, et aux abords, des villages dans lesquels les prélèvements humains étaient pratiqués. Les points de capture ont varié selon l'abondance des rongeurs recherchés; Les pièges étaient posés au sol dans, et alentour des cases, à distance des cases, en savanne et en bordure de forêt galerie sans excéder un kilomètre au delà du village. Nous avons utilisé les pièges de type Chauvency (CNRS) appâtés avec les différentes denrées alimentaires végétales consommées par les populations locales (principalement de la poudre ou des morceaux de manioc, des ignames, des patates douces, des arachides).

Les prélèvements de sang et d'organes de rongeurs ont été faits au laboratoire, sur des spécimens vivants le plus souvent, ou morts dans les 5 heures précédant la dissection. Le sang était prélevé à ciel ouvert par ponction cardiaque chez l'animal

anesthésié au chloroforme . Pour les rongeurs de petite taille une saignée complémentaire était pratiquée par section des gros vaisseaux du coeur, drainage et aspiration dans la partie déclive de la cage thoracique. Après formation du caillot, le sang était centrifugé (Microfuge Bekman), le sérum décanté puis stocké à -20°C ou -80°C . Les organes étaient prélevés (Coeur, poumon, foie, rate, rein, encéphale, vessie), conditionnés dans des tubes de Nunc à vis et stockés à -80°C .

L'identification des spécimens de rongeurs a été pratiquée, sur le terrain, le sexe et les mensurations relevées et notées systématiquement (Longueur de la tête et du corps, de la queue, de l'oreille et du pied postérieur). La clé, utilisée pour l'identification à l'espèce des rongeurs du Centrafrique, a été établie d'après les travaux de Rosevear [1969], et modifiée en fonction de données plus récentes contenues dans les publications de Petter sur les rongeurs de R.C.A. (Petter, 1975; Petter, 1977).

Pour les animaux domestiques le sang prélevé à la veine jugulaire a été conditionné et conservé de la même façon, que les sangs humains, sur le terrain et au laboratoire.

2.2. La récolte et le conditionnement des échantillons

Les échantillons de sang humain ont été prélevés au pli du bras sur des tubes secs à vide partiel de type Vacutainers™. Après rétraction du caillot pendant une heure à la température ambiante, le sang a été centrifugé sur place à 800 t/min pendant 3 minutes (centrifugeuse de table Prolabo™ et groupe électrogène); le sérum a été décanté et conditionné dans des tubes de polypropylène à vis (3ml-NUNC™). Ce matériel a été ensuite conservé à 4°C pendant la durée de la mission, de 1 à 10 jours (Réfrigérateur à gaz). De retour au laboratoire il a été stocké à -20°C (Congelateur Revco™) jusqu'au jour de son utilisation.

Les rongeurs ont été capturés dans, et aux abords, des villages dans lesquels les prélèvements humains étaient pratiqués (Figure 2-A,B). Les points de capture ont varié selon l'abondance des rongeurs recherchés; Les pièges étaient posés au sol dans, et alentour des cases, à distance des cases, en savane et en bordure de forêt galerie sans excéder un kilomètre au delà du village. Nous avons utilisé les pièges de type Chauvency (CNRS) appâtés avec les différentes denrées alimentaires végétales consommées par les populations locales (principalement de la poudre ou des morceaux de manioc, des ignames, des patates douces, des arachides).

Les prélèvements de sang et d'organes de rongeurs ont été faits au laboratoire, sur des spécimens vivants le plus souvent, ou

morts dans un délai de moins de 5 heures précédant la dissection. Le sang était prélevé à ciel ouvert par ponction cardiaque chez l'animal anesthésié au chloroforme. Pour les rongeurs de petite taille une saignée complémentaire était pratiquée par section des gros vaisseaux du cœur, drainage et aspiration dans la partie déclive de la cage thoracique. Après formation du caillot, le sang était centrifugé (Microfuge Bekman), le sérum décanté puis stocké à -20°C ou -80°C . Les organes étaient prélevés (cœur, poumon, foie, rate, rein, encéphale, vessie), conditionnés dans des tubes de Nunc à vis et stockés à -80°C .

L'identification des spécimens de rongeurs a été pratiquée, sur le terrain, le sexe et les mensurations relevées et notées systématiquement (longueur de la tête et du corps, de la queue, de l'oreille et du pied postérieur). La clé, utilisée pour l'identification à l'espèce des rongeurs du Centrafrique, a été établie d'après les travaux de Rosevear [1969], et modifiée en fonction de données plus récentes contenues dans les publications de Petter sur les rongeurs de R.C.A. [Petter, 1975; Petter, 1977].

Pour les animaux domestiques le sang prélevé à la veine jugulaire a été conditionné et conservé de la même façon, que les sangs humains, sur le terrain et au laboratoire.

2-3. Le laboratoire de haute sécurité: Le risque biologique.

Certains germes connus pour leur très grande infectivité chez l'Homme, la gravité de la maladie qu'ils entraînent ou la méconnaissance que l'on a de leur pathogénicité pour l'Homme les ont fait classer selon le risque potentiel intrinsèque apprécié.

Classe 1	Micro-organismes vivants non pathogènes, non infectieux (ex.: <u>Bacillus cereus</u> , <u>Naegleria fowleri</u>)
Classe 2	Microorganismes à risque modéré pouvant donner une maladie humaine (ex.: Hépatites A, B, nA-nB; Toxoplasme)
Classe 3	Agents infectieux indigènes ou exotiques pouvant être responsables d'infections sérieuses ou potentiellement léthaux (ex.: <u>Mycobacterium tuberculosis</u> , <u>Coxiella burnetti</u> , Hantaan virus)
Classe 4	Agents dangereux et exotiques comportant un haut risque pour l'individu et engendrant une maladie de pronostic vital (ex.: Virus Lassa, Virus Ebola, Virus Marburg)

Les agents ainsi classés ont permis de définir les caractéristiques techniques des structures dans lesquelles ils pourraient être manipulés sans danger pour le chercheur et son environnement [USDHHS, 1978]. Ainsi a été définie la notion de risque biologique qui jusqu'ici ne concernait à un niveau de sécurité élevé que les manipulations génétiques; présentement le risque est lié à l'infectiosité et à la pathogénicité du germe.

A la suite des épidémies mortelles à virus Marburg, Ebola et Lassa, et des cas mortels enregistrés en Europe et aux Etats Unis d'Amérique [Martini, 1968; Leifer, 1970; Woodruff, 1973],

trois laboratoires pour manipuler les germes de classe 4 furent construits (Portown Down, UK; Fort Detrick, USA et Atlanta, USA). Ce type de laboratoire dit de Sécurité Maximale ou Maximum Containment Laboratory (MCL) est de conception totalement originale et régi par des lois spéciales. Il permet de travailler avec des agents infectieux ou expérimentaux suspects ou avérés présenter un risque biologique pour le manipulateur et/ou la communauté. On distingue 5 aspects principaux caractérisant les laboratoires autorisés à manipuler des agents de classe 4; On parle alors de protection 4 (P4) pour ce type d'installations:

- L'accès en est contrôlé par des sas (Personnel et Matériel).
- La pression négative est maintenue à l'intérieur pour protéger l'environnement.
- La totalité des effluents sont décontaminés et/ou stérilisés.
- Le matériel infectieux peut être manipulé dans des enceintes étanches par l'intermédiaire de gants soudés à l'enceinte, ou bien le manipulateur est libre de ses mouvements dans l'enceinte contaminée et porte un scaphandre maintenu en pression positive par rapport à son environnement local (Fig. 4-B).

IL faut souligner que la complexité d'un tel laboratoire, en rapport avec l'entretien de routine et les manipulations exigées, demande au chercheur un apprentissage du fonctionnement général des systèmes de sécurité et un entraînement

assez long pour apprendre à y travailler. Ces impératifs restent liés au souci de sécurité tant individuel que collectif.

Les enquêtes sérologiques préliminaires réalisées en 1979 et 1980 en Centrafrique faisaient appel à des techniques de sérologie conventionnelle et furent réalisées à l'Institut Pasteur de Bangui. Toutefois nous avons dû utiliser un matériel antigénique de classe 4 inactivé. Un tel matériel constitué de cellules infectées par des germes hautement infectieux tels que le virus Lassa et d'autres virus responsables de Fièvres Hémorragiques, a été préparé dans le laboratoire de Haute sécurité (MCL) de la Spécial Pathogens Branch (SPB) des Centers for Disease Control (CDC) à Atlanta (Figure 5-A). Les cellules fixées à l'acétone sur des lames destinées à l'observation au microscope, étaient inactivées par irradiation gamma (Charge au Cobalt60 - Model 220, Atomic Energy of Canada Ltd.), pour être ensuite utilisées comme antigène dans la réaction d'immunofluorescence. L'acheminement vers Bangui s'est fait à -20°C en glace carbonique.

Les manipulations faisant intervenir des germes vivants comme la préparation des lames d'antigène, les tentatives d'isolement de virus, la croissance et la concentration de particules infectieuses, ont toutes été réalisées dans les conditions du MCL. Les études physico-chimiques et de biologie moléculaire ont été réalisées dans des laboratoires de la SPB (Department of Viral Division, CDC).

La première année nous avons travaillé principalement

dans la partie constituée d'enceintes hermétiques (Isolement du virus Mobala) (Figure 4-A); Pendant les deux autres années, nous avons travaillé en scaphandre ce qui nous était imposé par le type de manipulations entreprises: d'une part l'utilisation de très gros volumes de cultures cellulaires infectées et la concentration de virions hautement pathogènes (Jusqu'à 10^{10} Unités Formant Plages), d'autre part l'inoculation d'animaux de laboratoires avec des germes virulents.

FIGURE 4: LE LABORATOIRE DE HAUTE SECURITE DES
CENTERS FOR DISEASE CONTROL A ATLANTA

A. PLAN

B. Vue de l'intérieur: Fort du scaphandre de
protection individuelle dans le secteur

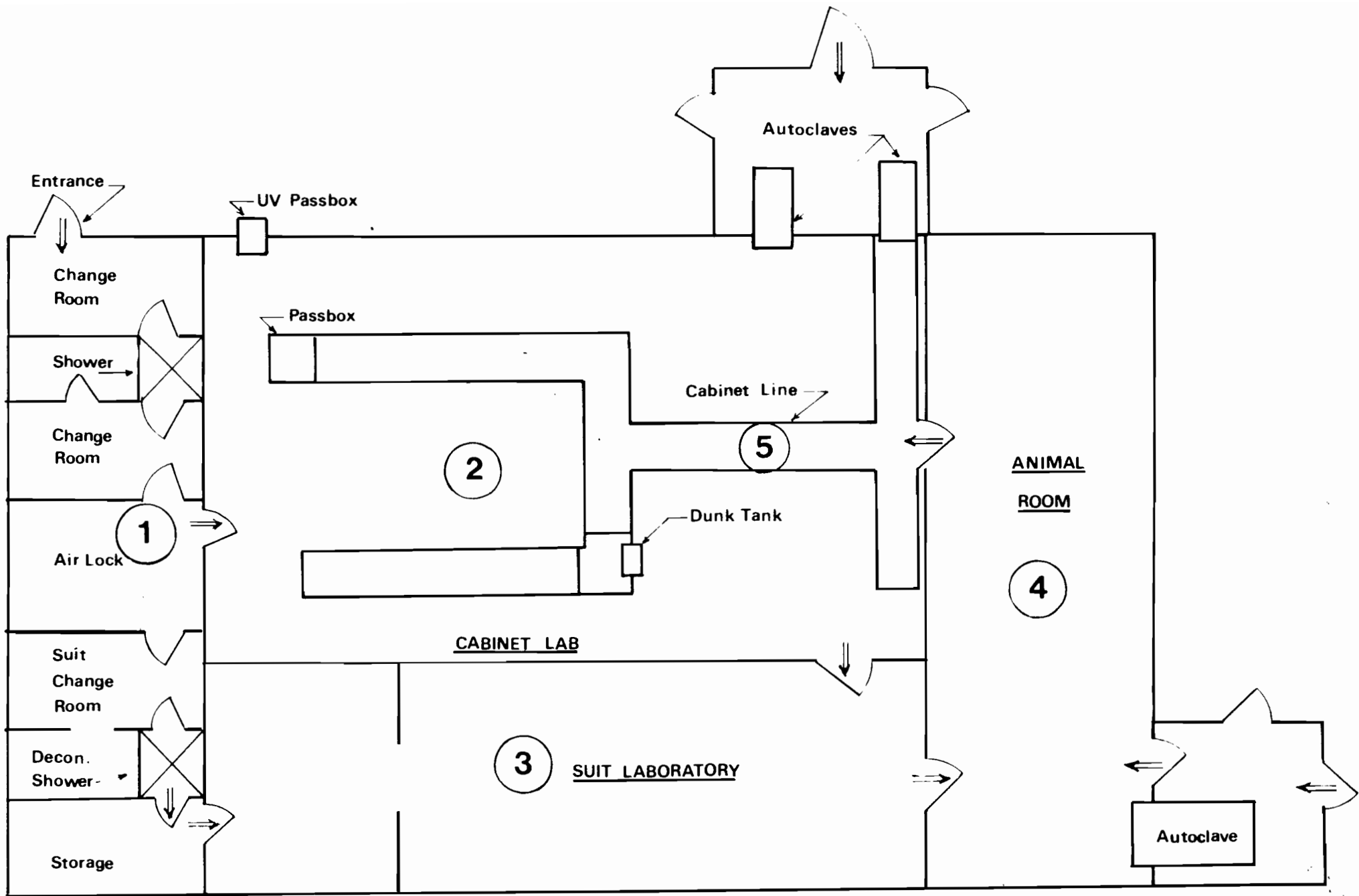




Fig. 4 - B

2.4. Les souches virales

Les souches clonées ont servies dans les études physicochimiques des virus et comme souches de référence pour les études génétiques.

Souches "sauvages":

LAS"J": Lassa "Josiah" (Th.J.057562): Souche humaine du virus Lassa isolée du sang d'un malade en Sierra Léone

LAS MAND: Lassa 803973, souche isolée de sang humain en Sierra Léone

LAS Fofana: Lassa 8044793, souche isolée du sérum d'un malade de Sierra Léone

LAS Zor Zor : Lassa 803793, souche humaine isolée du sang d'un malade du Liberia

LAS "M"= Lassa "Maleo", souche humaine isolée du sérum d'un malade de Sierra Léone.

LAS "Mas": Lassa 1515, souche isolée du sang de Mastomys (3 chromosomes) de Sierra Léone.

LAS NIG: Lassa "Pinneo", souche isolée du premier cas humain reconnu de la Fièvre de Lassa au Nigeria en 1969 [Buckley et Casals, 1969].

LAS LIB: Souche humaine de virus Lassa du Liberia (SPB/DVD/CDC:803794)

LAS GUI: Souche Lassa isolée d'un cas humain en

Guinée Equatoriale (SPB/DVD/CDC:803788)

MOP: Souche d'un arenavirus isolé de Mastomys natalensis à Mopeia au Mozambique (AN 20410) [Wulff et coll., 1977]. Historique des passages: 5 fois par par voie intra-péritonéale sur souriceau nouveau né et 3 fois sur cellules Vero E6.

LAS "Z": Souche d'un arénavirus isolée d'organes de Mastomys natalensis capturé à Qué-Qué (18°55 S; 29°48E) au Zimbabwe et proche du virus Mopeia (Johnson et coll. 1981a)

MOB 3076: Souche du virus Mobala isolée de Praomys de RCA capturé à Bouboui (4°36N; 18°19E) en 1980 [Gonzalez et coll. 1982].

MOB 3200: Souche du virus Mobala isolé de Mastomys capturé à Botambi en RCA en 1981 [Gonzalez et coll., 1982].

Souches clonées:

LAS Lp3: (SPB/DVD/CDC:803620) Souche clonée du virus Lassa à partir de la souche Lassa "Josiah" par repiquage de plage 3 fois sur culture cellulaire de type VeroE6 [Kiley et coll. 1976].

MOP Mp3: Souche clonée à partir de Mopéia AN20410 de la même façon que LAS Lp3.

MOB A11 et MOB B21: Souches clonées du virus Mobala, souche 3076, même technique que pour LAS Lp3.

MOB B23: Souche clonée de Mobala 3076.

LCM-ARM= Souche du virus CML, souche Armstrong E350, plus de 200 passages sur souris adulte et un passage sur cellule Vero.

2.5. Les cultures cellulaires

2-5-1. Cellules Vero E6/4:

Cette lignée cellulaire a été produite par clonage de la lignée VERO (Dr P.Price, CDC) provenant de cellules rénales du singe vert africain (Cercopithecus aethiops); elle s'est révélée très sensible pour le virus Lassa et particulièrement apte à sa réplication [Johnson et coll.,1981b]. Elle est déposée à l'American Type Cells Culture Collection N°CRL1586 [ATCCC,1983].

Les cellules E6 sont cultivées dans le milieu classique Eagle Minimum Essential Media (EMEM) [Eagle,1959] supplémenté par 10% de sérum de veau foetal inactivé 1heure à 56°C, auquel on ajoute 1U.I. de pénicilline G, 0,5µg de streptomycine et 0,02µg d'amphotéricine B par millilitre de milieu.

Elles ont été contrôlées périodiquement pour la présence de plasmides après passage dans un milieu enrichi pour la culture de mycoplasmes en atmosphère anaérobie selon la méthode décrite par Hayflick [1965], puis contrôlées en microscopie électronique.

Elles sont maintenues en survie 5 à 20 jours maximum

après inoculation dans un milieu de survie EMEM supplémenté en antibiotiques, sérum de veau foetal glutamine et bicarbonate pour rendre le pH=7,8

2.5.2. cellules BHK 21:

Cette lignée n'a été utilisée que très secondairement dans une expérience de réplication comparées de souches virales. C'est une lignée classique obtenue après clonage de cellules rénales de cobaye nouveau-né. Elle pousse en EMEM supplémenté par 200 u. de Pénicilline et 200µg de Streptomycine par millilitre, à 10% de sérum de veau foetal et 2,8% de Bicarbonate de Sodium. Le milieu de maintenance diffère du milieu de croissance par la concentration des deux derniers composants qui sont respectivement de 2% et 8,8%.

2.5.3. Préparation et inoculation des échantillons:

Le sang a été dilué dans du EMEM à 2% de sérum de veau Foetal complémenté par des antibiotiques concentrés quatre fois par rapport au EMEM utilisé pour la croissance et inoculés à 4 tubes de cultures cellulaires aux dilutions de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Les organes ont été broyés au mortier en présence de sable de verre dans 1ml de EMEM pour environ 1g d'organes; Après sédimentation des débris par centrifugation (1500 tpm. pendant 30min.; Centrifugeuse Beckman J21C), le surnageant a été inoculé aux mêmes dilutions. Les

cellules choisies pour leur tapis confluent de moins de trois jours ont été, après décantation du milieu de croissance, inoculées avec une suspension virale sous un volume de 0,1ml. Elles ont été ensuite maintenues une heure à 37°C puis l'inoculum rejeté, le tapis cellulaire rincé trois fois et nourri avec 1ml de milieu EMEM à 2% de sérum de veau foetal pour une concentration X4 en antibiotiques.

Les tubes ainsi préparés ont été laissés à incuber entre 5 et 10 jours selon les résultats recherchés. A l'isolement le tapis cellulaire a été testé pour la présence d'antigène de type Lassa aux 5ème et 10ème jour par IFI.

Des passages de virus ont pu être réalisés par inoculation d'un tapis cellulaire neuf comme précédemment; L'inoculum était alors constitué par 0,1ml de surnageant d'une culture cellulaire infectée aux dilutions de $10^0, -1, -2$ dans du EMEM. Le contrôle pour la présence d'antigène viral a été réalisé au 5ème et au 10ème jour post inoculation.

La technique d'inoculation de cultures cellulaires dans le but d'obtenir une répllication optimale du virion sera exposé au niveau des techniques de purification virale.

2.6. Méthode des plages

La méthode des plages a été utilisée pour le titrage des virus, le clonage des virus par repiquage des plages et l'étude de la morphologie des plages.

Des tapis cellulaires confluent ont été utilisés après

obtention sur plaque Libro™ à 6 trous (2cm de diamètre) en plastique ou sur flacons plastiques (Falcon 75cm²) pour l'étude de la morphologie des plaques. Après avoir retiré le milieu de croissance par aspiration, le tapis cellulaire a été infecté sous un volume de 0,1ml de dilutions de raison 10 d'une suspension virale contenue dans du milieu EMEM. Après adsorption du virus 30min. à 35°C, l'inoculum a été rejeté par aspiration, et le tapis cellulaire infecté recouvert avec 2,5ml de EMEM contenant 1% d'Agarose. 5 jours plus tard a été ajouté, 2ml de milieu de Hanks contenant 1% d'Agar Noble à 1:20.000 de Rouge Neutre. La lecture et le dénombrement des plages ont été faits 24 et 48 heures plus tard.

2.7. Modèles et réservoirs animaux

2.7.1. Souris blanches d'élevage

Des portées de 8 souriceaux nouveau-nés (Swiss ICR) âgés de 48 heures ont été utilisées pour l'inoculation de souches virales et la mise en évidence de leur effet pathogène. Les souriceaux ont été inoculés par voie intra-péritonéale par $2 \times 10^{3,5}$ UFP de virus sous un volume de 0,025ml en suspension dans du EMEM. Les portées étaient maintenues dans des cages séparées recouvertes d'un filtre de papier. Ces cages étaient placées dans une enceinte close en pression positive à l'intérieur du MCL. Les portées étaient observées

quotidiennement pour les symptômes cliniques, la mortalité et saignées périodiquement. Les individus morts et non totalement dévorés ont donné lieu à des tentatives systématiques de réisolement de virus. Les femelles gravides de seconde génération ont été séparées et mises dans de nouvelles cages stériles. L'observation s'est prolongée pendant 90 jours. La litière et l'aliment étaient désinfectés avant leur utilisation par rayonnement UV.

2.7.2. Mastomys et Praomys

La classification proposée par Misonne (1969) semble aujourd'hui largement acceptée. En effet depuis des décennies les mammalogistes du monde entier avaient apporté de nouvelles espèces au genre Praomys, Thomas, 1915 mais à l'intérieur de ce genre, nombre de distinctions entre sous genres et même espèces étaient imprécises. Ainsi dans la famille des Muridae, sous famille des Murinae, s'inscrit le genre Praomys avec les deux sous genres qui nous intéressent, le sous genre Praomys et le sous genre Mastomys (Fig. 5). Les 26 espèces du genre Praomys sont toutes africaines. On les désigne souvent en langage vernaculaire comme les rats à mammelles multiples ou à fourrure douce d'Afrique (Paradiso et coll., 1983).

Genre	:	<u>Praomys</u>	
Sous Genre	:	<u>Mastomys</u>	<u>Praomys</u>
Espèces	:	<u>erythroleucus</u> *	<u>jacksoni</u> *
		<u>huberti</u> *	<u>tulbergi</u> *
		<u>natalensis</u>	<u>morio</u>
		<u>catter</u>	<u>hartwigi</u>
		<u>lohwiwiae</u> *	
		<u>...</u>	

Le sous genre Mastomys a depuis longtemps posé un problème systématique qui semble en voie de résolution depuis à peine 3 années. En effet récemment par l'étude du caryotype des 5 espèces connues sur le continent, Hubert et coll., 1982 ont pu dresser une carte de distribution de ces espèces et permettre une dénomination plus précise des spécimens rencontrés sous différentes latitudes en Afrique (Fig. 6).

Le sous genre Fraomys possède 6 espèces décrites dont 5 semblent plus ou moins localisées en Afrique Centrale: P.tulbergi, P.hartwigi, P.jacksoni, P.morio, P.lukolele. Fraomys delectorum n'a été décrit qu'en Afrique de l'Est (Paradiso et coll., 1983).

Mastomys est plus volontiers commensal de l'Homme mais peut-être aisément déplacé de son biotope par Rattus rattus. Fraomys se rencontre plus volontiers en zones humides, forestière et peut être trouvé en situation péri-domestique aux abords des villages ou des cultures.

En R.C.A., les deux sous genres sont bien représentés et leurs aires de répartition se recouvrent.

FIGURE 5: A. Praomys jacksoni
B. Mastomys sp.



FIGURE 6: REPARTITION DU SOUS GENRE MASTOMYS EN AFRIQUE
DE L' OUEST DU CENTRE ET DU SUD.
(D'après B.HUBERT et coll., 1982).



- ▲ 2n=32chr. Mastomys huberti (West)
- ▲ 2n=32chr. Mastomys caffer (South)
- 2n=36chr. Mastomys natalensis
- * 2n=38chr. Mastomys erythroleucus

2.7. Microscopie électronique

Des sections fines de cellules Vero E6 infectées ont été préparées. Après cinq jours, le tapis cellulaire a été lavé avec un tampon phosphate (Millonig, pH 7,3 à 4°C) et détaché par lambeaux avec une spatule de plastique souple. Ce matériel a été ensuite centrifugé en tampon phosphate à 1000 tpm. pendant 20min. Le culot conservé intact a été fixé dans une solution à 2,5% de glutaraldéhyde tamponnée pendant 30min. Puis la préparation fixée a été rincée au tampon phosphate, traitée à l'acide osmique à 1% et déshydratée dans une série de bains à l'éthanol pour être ensuite incluse dans un mélange Araldite-Epon selon la technique décrite par Mollenhauer, 1964. Les sections obtenues ont été colorées à l'acetate d'unanyl et au citrate de plomb [Murphy et coll. 1970]. Pour la coloration négative, le surnageant de culture a été utilisé dilué au 1:2 en eau distillée puis centrifugé à 45000 tpm. pendant une heure. Le culot obtenu, resuspendu dans un petit volume de solution aqueuse de silicotungstate de sodium, a été projeté en aerosol sur des grilles au carbone préparées pour l'observation en microscopie électronique.

2.8. Les anticorps monoclonaux

Ils ont été préparés à la SPB à partir d'antigènes

inactivés par radiation gamma et injectés aux souris (McCormick non publié; Kiley et coll. non publié).

L'Antigène utilisé a été préparé à partir de cultures cellulaires de type Vero E6 infectées par les virus Lassa et Mopéia. Les protéines virales ont été purifiées selon la méthode exposée en 2.12.3. Des souris BALB/c âgées d'une semaine ont été inoculées par voie intra-péritonéale avec 150µg de protéines virales purifiées mélangées à de l'adjuvant de Freund incomplet. Une semaine plus tard une injection de rappel a été pratiquée avec 150µg de protéines virales sans adjuvant. Après trois semaines la même dose de protéines virales a été injectée cette fois ci par voie intra-veineuse. Après 3 jours les spécimens sacrifiés ont donné lieu à l'extraction de lymphocytes B splénique destinés à la fusion avec des cellules myelomateuse.

L'hybridation des lymphocytes de souris avec des cellules transformées (P3x63-Ag8.653/J.Kearney) a été faite selon la technique décrite par G.J.HAMMERLING de l'Institut de Génétique de Cologne, modifiées par J.F.KEARNEYS.

2.9. L'immunofluorescence sur cellules infectées

La méthode utilisée dans la technique d'immunofluorescence indirecte sur cellules infectées a été utilisée à l'origine pour les arénavirus par C.J.Peters et coll.[1973], modifiée et adaptée au virus de Lassa par Herta Wulff et J.Lange [1975]. Enfin des éléments ont été apportés par Johnson et coll.[19781b], pour la rendre utilisable dans des

enquêtes sérologiques étendues. La méthode a été utilisée pour la sérologie de deux façons: L'une qui consiste à trier les sérums pour en reconnaître ceux qui possèdent des anticorps spécifiques de l'antigène testé (cela lors des enquêtes sérologiques); l'autre qui a pour but le titrage des sérums trouvés positifs lors du triage. Le sérum dilué (au 1:8 dans du PBS pour le triage ou plus pour le titrage) est appliqué sous un volume d'environ 15µl sur un spot de cellules infectées inactivées, fixées à l'acétone et séchées. Le contact antigène-anticorps a lieu en chambre humide, à la température du laboratoire (20 à 25°C) pendant une heure. Puis le sérum est rejeté lavé pendant 10 minutes dans du PBS sous agitation lente; ensuite un jet indirect d'eau distillée retire l'excès de sel de la préparation, ce qui a pour but d'éviter l'étalement du conjugué fluorescent lors de la phase de coloration. La lame est alors séchée et 15µl de conjugué fluorescent à 0,02% de solution de Bleu Evansy sont mis en contact pour 30 minutes à la température du laboratoire. De la même façon que précédemment, la préparation est lavée puis montée, sans sécher, entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine tamponnée. Un microscope de type Dialux™ à épi-illumination avec objectifs à immersion à eau (Gross.x40 et x60) a été utilisé. Généralement un grossissement de 400 (obj.x40/Oc.X10) suffit pour reconnaître les éléments fluorescents intracellulaires spécifiques du virion.

Les conjugués fluorescents étaient principalement ceux du commerce: Immunoglobulines de chèvre anti IgG et/ou IgM humaines (Wellcome laboratory), Immunoglobulines de mouton anti

IgG de rat, immunoglobulines de mouton anti IgG de cobaye et immunoglobulines de lapin anti IgG de mouton et de chèvre (Miles laboratory). Enfin des conjugués fluorescents fabriqués aux Centers for Disease Control ont aussi été utilisés: Immunoglobulines de lapin anti Mastomys et Immunoglobulines de mouton anti chien.

2.10. Les essais sérologiques

Nous avons utilisé l'ultracentrifugation dans des cas particuliers pour débarasser certains sérums chargés en protéines et en agrégats d'anticorps. En effet ces sérums masquaient à faible dilution ($\leq 1:64$) des réactions positives par une adsorption non spécifique des agrégats d'immunoglobulines qui en fixant le conjugué donnaient un "bruit de fond" plus ou moins intense sur toute la préparation. En pratique une partie aliquote des sérums à traiter a été déposée dans des tubes de polypropylène contenant 300 μ l et centrifugée dans un rotor angulaire (Beckman LP-42Ti) à 15000 tpm et à 4°C pendant une heure.

Sérologies comparées humaine et animale: Certains sérums ont été comparés pour leur titre en anticorps fluorescents et la spécificité de leur réponse vis à vis de souche homologues ou hétérologues. La réaction d'IFI a été pratiquée sur des cellules Vero E6 infectées par les différentes souches et récoltées après 5 jours, fixées à l'acétone et inactivées au rayons gamma (20x10⁴rad.) selon les doses définies par Elliot et coll.[1982].

2.11. Méthodes d'analyse des protéines

2.11.1. Croissance des virions

Un millilitre de suspension virale en milieu EMEM a servi à infecter un tapis confluent de cellules Vero E6 à la dose finale de 0,01 UFP/cellule. Des flacons cylindriques de plastique (Corning™, 490cm²) maintenus en rotation lente à 35°C ont été utilisés pour la croissance et l'inoculation des cellules. L'inoculum était laissé en contact avec les cellules dans le flacon maintenu en rotation 1/2 heure à 35°. Après infection le tapis cellulaire était nourri avec 75ml de EMEM, le surnageant était ensuite récolté au 5ème jour et le virus purifié comme suit.

2.11.2. Purification et préparation de l'échantillon pour électrophorèse

Purification des virions:

Le surnageant de culture a été clarifié de ses débris cellulaires par centrifugation horizontale (Flacons cylindriques Nalgène™ de 250ml) pendant 15 minutes à 10.000g (Rotor Beckman GS13). La suspension virale ainsi obtenue a été précipitée avec 7,5% de polyéthylène glycol (PEG 6000) à 2,3% de Chlorure de sodium et maintenue en agitation lente pendant 4 heures à 4°C. Après centrifugation à 7.000 tpm, pendant 30

minutes, le culot de précipitation par le PEG a été resuspendu dans un tampon stérile TNE (Tris HCL 10mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, pH7,4) et déposé sur un gradient de densité Glycerol (30-0%) et Tartrate de Potassium (0-40%) puis centrifugé à l'équilibre pendant 18 heures à 45.000 tpm (Rotor Beckman sw40). La bande visible collectée par pipetage et diluée dans du TNE au 1/2 a été ensuite déposée sur un second gradient de 8ml de sucrose (20%-70% dans du TNE) pour subir une centrifugation différentielle de 45.000 tpm pendant 4heures. Après collection de la bande visible dans le gradient contenant le virion purifié, on a procédé, après dilution du matériel dans du TNE, à une ultracentrifugation (35.000 tpm pendant 1heure) pour obtenir les particules virales sous forme de culot concentré. Le culot resuspendu dans un faible volume de TNE (100µl) a été conservé à -80°C.

Préparation des échantillons pour l'électrophorèse:

Le culot de virion infectieux conservé à -80°C remis à la température du laboratoire a été repris dans une solution tampon de TNE à 5% de 2-mercapto-éthanol, 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 50% de glucose et 0,01% de bleu de bromophénol; le volume final de l'échantillon a été ajusté selon la concentration estimée en protéines et la quantité de matériel à utiliser dans les puits de migration électrophorétique (25 à 100µl). Cette solution a été alors maintenue au bain marie à 100°C pendant 3 minutes, les protéines dissociées et le virion ainsi inactivé

ont alors été sortis du MCL pour être traités par la technique d'Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide (PAGE) dans un laboratoire de chimie conventionnel.

2.11.3. Electrophorèse des protéines virales

Nous avons utilisé la méthode décrite par Laemmli [1970], pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en Urée 2,5 M, Tampon Glycine-Tris et SDS à 1% (SDS-PAGE). Le gel de séparation contenait 12,5% d'acrylamide et le gel de départ contenait 3% d'acrylamide. Les gels, de 1,5mm d'épaisseur, étaient maintenus entre deux plaques de verre verticales (Vertical Gel Electrophoresis System 2001 - LKB). L'électrophorèse des protéines virales s'est déroulée pendant 16 heures sous une tension constante de 60V par gel. Puis le gel de séparation a été fixé et coloré dans une solution à 7% d'acide acétique, 5% de méthanol et 0,2% de bleu de Coomassie brillant, pendant 30 minutes, et à la température du laboratoire. La décoloration a été faite dans une solution d'acide acétique à 7% et 5% de méthanol le temps nécessaire pour obtenir un bon contraste des bandes de migration des protéines. Une suspension protéinique de référence contenant diverses protéines marquées au ¹⁴Carbone a été mise en PAGE afin d'évaluer les poids moléculaires des protéines virales de comigration.

2.11.4. Marquage et extraction des protéines

virales intracellulaires.

Des boîtes de Pétri (diamètre 60mm) contenant une culture de cellules E6 confluentes ont été inoculées avec 0,1ml d'une suspension virale à 10^7 UFP/ml. Après incubation 30 min. à 36,5°C le surnageant était rejeté et les cellules nourries avec 1ml de EMEM survie supplémenté à 2% de sérum de veau foetal. Après un temps déterminé par l'expérience choisie (courbe de croissance, délai d'apparition des protéines, obtention de protéines matures en grande quantité) le milieu a été remplacé par un milieu EMEM sans méthionine, le tapis rincé deux fois avec ce milieu. Une heure après le milieu était rejeté et remplacé par 250µl de EMEM sans méthionine contenant 100mCi de [35 S] méthionine. Après une incubation de 1 à 4 heures en étuve à CO₂ (36,5°C), l'extraction des protéines virales à partir des cellules était pratiquée selon la technique décrite par Kessler [1975]. Le milieu rejeté, le tapis cellulaire était lavé deux fois avec un tampon phosphate (PBS, 0,5M Tris, pH6,8) stérile, à 4°C. L'extrait de cellules infectées était pipeté et placé dans des tubes coniques de 1,5ml (Eppendorf), centrifugé 5min. à 2.000 tpm (Betafuge Beckman). Les cellules étaient alors resuspendues dans un tampon de lyse (TNE pH 7,4, 1%NP40, 0,5% DOC, 1%SDS) et agitées au Vortex à froid (4°C) pendant 10min. Les cellules ainsi lysées étaient passées plusieurs fois au travers d'une aiguille fine (26GA) puis culottées à 2.000 tpm pendant une minute. Le surnageant constituait alors le cytosol

extrait des cellules contenant les protéines virales marquées. Il a été conservé à 4°C pendant une période courte 24 à 48 heures avant d'être utilisé dans la réaction d'immunoprécipitation.

2.11.5. Immunoprécipitation en gel de polyacrylamide

Six volumes de cytosol étaient mis en présence d'un volume d'anticorps (poly ou monoclonaux) et laissés 30 min. à la température du laboratoire pour initier la réaction antigène anticorps et maintenu 20 heures à 4°C.

A ce mélange étaient ajoutés 3 volumes de protéine A du staphylocoque (SPA- Staphylococcal Protein A-Bacterial Adsorbant, Miles-Yeda Ltd) à 10% dans du TNE et 1% de NP40, et maintenu à 4°C après agitation au Vortex.

Puis la suspension était centrifugée 30 secondes et le culot resuspendu dans 0,25 ml de tampon de lavage (1%NP40 dans du TNE). Puis de nouveau centrifugé 30 secondes, resuspendu dans 0,5 ml de tampon de lavage et centrifugé 30 secondes. Le dernier culot était alors resuspendu dans 50µl de tampon "C" (Tampon "C"= 1%SDS, 1% 2-mercapto-éthanol, 50mM Tris HCL, pH6,8) et mis dans un bain-marie à 100°C pour 2min puis centrifugé pour une minute.

Le surnageant transféré dans un nouveau tube Eppendorf™ contenant 5µl de 2-mercaptoéthanol était mis une minute au bain-marie bouillant. Cette mixture pouvait alors être sortie du MCL et additionnée de 50% de glucose et 0,01% de bleu de bromophénol pour constituer l'échantillon prêt pour

l'électrophorèse. La SDS-PAGE a été utilisée dans les mêmes conditions que celles décrites au 2.11.3.

Après électrophorèses, le gel était fixé à l'acide acétique à 7% et ensuite trempé pendant une heure dans un cocktail liquide à scintillation (ENHANCE-NEN) puis rincé dans de l'eau pour 30 min. Enfin le gel a été séché sous vide pour obtenir une autoradiographie après exposition sur film (Kodack X-Omatic ou Dupont Cronex 4) à -70°C . Le développement a été fait selon le procédé standard prévu par le vendeur pour ces films radiologiques RX.

2.11.6. Cartes oligopeptidiques

Les protéines non marquées séparées par électrophorèse en SDS-PAGE et révélées au Bleu de Coomassie Brillant (2.11.3.), ont été utilisées pour l'étude de leurs peptides de digestion par la trypsine selon la technique de Buchmeier et coll. [1983]. Les bandes de migration dans des polypeptides contenus dans le gel après SDS-PAGE ont été excisées et marquées directement à l' ^{125}I Iode selon la méthode décrite par Elder et coll. [1971]. Les oligopeptides de digestion obtenus ont subi une migration électrophorétique bidimensionnelle en gel de polyacrylamide. Les gels préparés comme au 2.11.3. ont été autoradiographiés et les résultats directement interprétés.

2.13. Méthodes d'analyse des Nucléotides

2.13.1. Marquage radio actif de l'ARN in vivo

Pour obtenir de grandes quantités de virus nous avons utilisé les cultures cellulaires maintenues en flacons en rotation et infectées par une suspension virale donnant une multiplicité d'infection de 0,01 UFP/cellule (Cf.2.11.1).

L'ARN viral a été marqué par adjonction au milieu de survie de 25 μ Ci de 5,6[³H]uridine (New England Nuclear laboratory) par millilitre de EMEM après infection.

2.13.2. Densité de la nucléocapside en chlorure de Césium

Le virus purifié et marqué au ³H, traité ou non par action de détergents (Nonidet-P40) a été déposé en suspension dans du TNE sur un gradient linéaire de 40% de chlorure de césium/TNE et centrifugé à 45.000 tpm pendant 18 heures. Après centrifugation, les fractions ont été collectées par le fond du tube (Beckman nitrocellulose) et pesées pour en déterminer leur densité. La distribution de la radio-activité dans les fractions a été évaluée dans un compteur à scintillation, sur une partie aliquot de 100 μ l de chaque fraction mélangée à 6ml d'un cocktail à scintillation (Aquasol™, New England Nuclear laboratory).

2.13.3.Extraction de l'ARN

Le virus purifié a été traité à la protéinase K (Beckman Instruments, Atlanta, GA, USA) pour réduire tout éventuel effet enzymatique résiduel et les protéines dissociées par du Sodium Dodécyl Sulfate à 10%. Puis l'extraction de l'ARN a eu lieu à volume égal dans un tube de verre par action du Phénol en présence de Chlorure de Lithium. Alors, le mélange a été placé dans un bain-marie à 56°C agité au Vortex en alternance pendant 5 minutes, puis refroidi dans un bain de glace fondante pour éviter l'évaporation du Phénol. Enfin la séparation des phases du milieu a été obtenue après adjonction d'Isoamyl de chlore (500g/14ml) et 10 min de centrifugation à 30.000 t/min (Beckman, GS13). Le surnageant, phase aqueuse, contenait la première extraction d'ARN. A ce stade seulement le matériel pouvait être sorti du MCL, l'ARN viral alors isolé n'étant pas infectieux.

Après trois extractions du même type à froid, l'ARN a été précipité dans 70% d'éthanol glacial (-20°C) et 300mM d'acétate de sodium puis conservé à -20°C jusqu'au jour de son utilisation. Cette préparation constituait le matériel de base dans toutes les expériences qui se sont portées sur l'ARN viral.

2.13.4. Analyse de l'ARN sur gradient de sucrose

Après extraction au phénol (2.13.3.), l'ARN marqué au tritium (2.13.3) et resuspendu dans 1ml de TNE a été déposé sur

un gradient linéaire de sucrose (15-30% poids/volume) dans du TNE à 5% de SDS. La centrifugation s'est faite dans un rotor SW40 (Beckman) à 25.000tpmin. pendant 6 heures à 18°C. Les fractions ont été collectées par aspiration par le haut du tube de centrifugation. Une partie aliquot de 100µl de chaque fraction, préalablement précipitée au TCA, a été mélangée à 6ml de cocktail de scintillation (Aquasol) pour être comptée au compteur à scintillation gamma.

2.13.5. Electrophorèse de l'ARN en gel d'Agarose

Les échantillons d'ARN précipités dans 70% d'éthanol (Cf.2.13.3.) ont été culottés par centrifugation dans des tubes de verre siliconé (Corex 10ml) à 8000 tpmin pendant 30 min (Beckman GS13). La résolution des différentes espèces d'ARN présentes dans l'extrait a été faite d'une part après dénaturation au Glyoxal selon la méthode de McMaster et Carmichael [1979], suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%; et d'autre part par une simple électrophorèse sur un gel d'agarose à basse température de liquéfaction en pH acide pH 3.5 et tampon Citrate 0,25M. La première méthode avait pour but de caractériser les brins d'ARN par leur poids moléculaire et la deuxième technique nous a servi après électrophorèse et observation en lumière ultra-violette des bandes de migration colorées au bromure d'éthyle. Les bandes ainsi repérées ont pu être excisées et les espèces d'ARN cette fois ci séparées ont pu en être extraites. L'extraction de l'ARN à partir de l'agarose s'est faite après liquéfaction du gel par

la chaleur, puis dilution dans du tampon TNE et deux extractions successives au phénol (1%SDS, Chloroforme-alcool isoamyl et phénol cf. 2.13.3) à température ambiante. La phase aqueuse finale reprise dans 2,5 volumes d'Ethanol glacé et 300mM d'acétate de sodium a été refroidie à -20°C pour 4 heures afin de récupérer l'ARN précipité et de le concentrer dans un faible volume après centrifugation.

Pour l'établissement de la courbe électrophorétique des segments d'ARN dénaturés au glioxal et la détermination de leur poids moléculaire, des tranches de 1mm de gel d'agarose ont été faites de façon sériée pour chaque bande de migration correspondant à un échantillon d'ARN total. Ce matériel liquéfié pendant 5 minutes à 100°C et mélangé à 6ml d'Aquasol a été analysé dans un compteur à scintillation gamma.

2.13.4. Carte des Oligonucléotides de digestion

L'ARN total obtenu après extraction au phénol et les segments d'ARN réextraits au phénol à partir des bandes de migration en gel d'Agarose ont été utilisés dans la méthode suivante: nous avons suivi sur le principe la technique de migration bidimensionnelle en gel de polyacrylamide des oligonucléotides de digestion par la ARNase T1 mise au point par De Watcher et Fiers [1972], utilisant l'ARN marqué in vitro au ^{32}P Phosphore.

Nous avons adapté une méthode dérivée et mise au point

par Cox et coll., pour le virus de la grippe, aux conditions propres aux Arenavirus.

La digestion et le marquage au phosphore radioactif sont pratiqués sur le culot d'ARN précipité dans l'éthanol et centrifugé. La digestion se fait par la l'enzyme de restriction T1 (T1 ribonuclease, Calbiochem_Behring Corp., San Diego) pendant 40 min à 37°C.

Le marquage utilise la polynucleotide kinase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis) qui, pendant 30 min à 37°C permet le transfert du phosphate distal marqué au phosphore radio actif d'une Adenosine 5' triphosphate [³²P] sur l'extrémité 5' d'un oligonucléotide de digestion. Les résidus enzymatiques et les protéines sont éliminés par extraction phénolique, l'ARN reprécipité dans l'éthanol à 70%, culotté et ajouté au mélange de solution de sucrose à 10% pour électrophorèse.

La première dimension électrophorétique a été réalisée à pH 3,5 dans un gel à 10% de polyacrylamide et urée 6M dans une solution d'acide citrique 0,025M. La seconde dimension a été faite à pH 8,3 dans un gel à 21,8% de polyacrylamide et en tampon borate. Des marqueurs colorés contenus dans la solution de sucrose avec l'échantillon (Bleu de bromophénol 0,2%, Xylène de cyanol 0,2%) ont permis de suivre la migration des oligonucléotides. La première électrophorèse avait pour but de séparer les oligonucléotides par leurs poids moléculaires, la seconde dimension sépare les oligonucléotides par leur charge.

Après migration le gel est exposé pour autoradiographie

à 4°C: le film contenu dans une poche scellée est appliqué directement sur le gel où des spots de repérage au phosphore 32 ont été placés. Un écran amplificateur (Kodack) placé par dessus le film en opposition au gel est maintenu plaqué par un verre de 50mm d'épaisseur (Limitation du rayonnement radio actif). Le négatif obtenu et développé dans des bains conventionnels pour les films RX a servi directement à l'analyse des spots de migration des oligonucléotide.

2.14. Milieux et produits radioactifs

- . Acrylamide et Bis-acrylamide purifié (Biorad Laboratories Richmond Cal.)
- . Adenosine 5'-Triphosphate, Tetra (Triethylammonium) Salt, [32 P*], (NEG-002A) >7000 Ci/mmol; New England Nuclear Corp., Boston
- . Adjuvant de Freud (Grand Island Biological Company, NY)
- . Agarose: Low gelling temperature agarose (Miles laboratories, Inc., Elkhart, Ind.)
- . Bleu de Bromophénol et Xylène cyanol, poudre (Bio-Rad)
- . 2-Mercaptoethanol (Sigma)
- . Mixture pour les échantillons d'ARN dans l'électrophorèse sur agarose:
 - Urée 10M
 - Tampon citrate 1M
 - SDS 10%
 - Ficoll 20%
 - Bleu de bromophénol 2%
- . Phénol-liquéfié 88% (Mallinckrodt, Inc., Paris, Ken.)
- . Polynucleotide kinase NEN #NEE 101
- . Proteinase K #340321 (Beckman Instruments Inc.)
- . Ribonuclease T1 "Crystalline" (Sankyo Company, Limited, Japan)
- . Ribonuclease T1 (Calbiochem-Behring Corp., San Diego)
- . Eagle Minimum Essential Media (EMEM)
- . Methionine soufrée (35 Methionine, Bio-Rad)
- . Gel d'agarose : 66.6ml Urée 9M
 - 29.4 H₂O
 - 1.5g Agarose à basse température de fusion

- . Gel de polyacrylamide pour la première dimension du "Finger Print": 10% acrylamide, 0,32% bisacrylamide, 6M urea, 0,025M acide citrique, 0,032% acide ascorbique, 0,0008% sulfate ferrique, 0,009% eau oxygénée; pH final 3,5.
- . Gel de polyacrylamide pour la seconde dimension du "Finger Print": 22% d'acrylamide, 0,7% de Bisacrylamide, 0,1M Tris, pH 8,3 à l'acide borique, 0,037% de persulfate d'ammonium
- . Tampon borate pour "Finger Print" pH 8,3 (x10): Tris 1M (121,1g/l), 0,025M EDTA (7,3g/l), pH ajusté à l'acide borique
- . Tampon citrique pour première dimension "FP": 0,025M d'acide citrique pH 3,5 ajusté avec NaOH
- . Tampon citrate pour électrophorèse en gel d'agarose (1M, pH 3,5):
 Acide citrique H₂O PM 210,15: 149g
 Citrate de sodium 2H₂O PM 294,10 : 67g
 QSP 1l H₂O
 (Préparation stock utilisée à la molarité de 0,025 pour l'électrophorèse)
- . Tampon glycine pour électrophorèse des protéines
- . Tris (VWR Scientific)

2.14.2 Abréviations

ARN: Acide RiboNucléique

CDC: Centers for Disease Control

EMEM: Eagle Minimum Essential Media

FH: Fièvres Hémorragiques

FHA: Fièvre Hémorragique d'Argentine
FHB: Fièvre Hémorragique de Bolivie
FHAOV: Fièvres Hémorragiques Africaines d'origine Virales
FP: Finger Print
GP: GlycoProtéine
IFI: Immunofluorescence indirecte
Ig: Immunoglobulines
LMCV: Lymphocytic Chorio Meningitis Virus
MCL: Maximum Containment Laboratory
CML: (virus de la) Chorio-Méningite Lymphocytaire
NC: Nucleo Capside
NP: Nucleo Protéine
PAGE: Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis
PBS: Phosphate Buffered Saline
P4: Niveau de protection contre le risque biologique=4
p.i.: post inoculation
PM: Poids moléculaire
R.C.A.: République Centrafricaine
SPB: Special Pathogens Branch
SDS: Sodium dodecyl sulfate
UFF: Unité Formant Plage

3. RESULTATS ET COMMENTAIRES

3.1. Premières approches sérologiques en RCA

Juqu'en 1982, les enquêtes sérologiques faites en Centrafrique avaient pour but de mettre en évidence des anticorps humains dirigés spécifiquement contre les virus de la Maladie de Marburg, de la maladie d'Ebola et de la Fièvre de Lassa (Gonzalez et coll., 1980; Saluzzo et coll., 1980). Ce travail fut décidé pour deux raisons principales. D'une part en raison de la situation géographique de ce pays pris entre les épidémies de maladie d'Ebola du Nord Zaire et du Sud Soudan, et l'hypothèse d'un foyer ougandien proche, à virus de Marburg; d'autre part sur les observations de le Gac [1946] sur un "typhus des broussailles" sans étiologie connue et observé dans l'Est du Centrafrique. Ces enquêtes devaient ensuite être élargies à d'autres virus responsables de Fièvres Hémorragiques (Le virus de la Fièvre de Congo-Crimée, le virus de la Fièvre de la vallée du Rift, et le virus Hantaan de la Fièvre Hémorragique de Corée). Nous rapporterons les résultats obtenus alors vis à vis du virus Lassa en utilisant comme antigène une souche isolée en Sierra Leone (LAS"Josiah") dans la réaction d'immunofluorescence indirecte (Tableau 1).

La sérologie humaine pratiquée dans une grande variété de secteurs et la totalité des domaines phytogéographiques de R.C.A., n'a donné qu'une prévalence faible en anticorps

anti-Lassa. De 1979 à 1982, 1909 individus testés sur une période de 30 mois ont donné seulement lieu à la mise en évidence d'anticorps fluorescents anti-Lassa chez 4 sujets provenant exclusivement de la ville de Bouar et de sa proche banlieue (Figures 1,4); Les titres en anticorps observés sont particulièrement peu élevés, de 16 à 32, mais doivent être considérés comme spécifiques du virus Lassa ou d'un virus antigéniquement très proche. En effet l'IFI apparaît comme très spécifique du virus Lassa avec pratiquement pas de réactions croisées avec les virus du complexe Tacaribe ou le LCMV (Wullf et coll., 1978). Ces quelques résultats nous ont toutefois incités à rechercher la présence éventuelle d'anticorps anti-Lassa chez les rongeurs. En effet si un arénavirus circulait dans cette partie du pays il devait, comme on l'observe pour la plupart des virus de ce groupe, posséder un réservoir animal chez les rongeurs. Les résultats obtenus montrèrent de façon surprenante une nette prévalence en anticorps chez des rongeurs sauvages (Tableau 2). On relevait ainsi 30% de positivités à Botambi, 5% à Bouar, 9% à Bouboui, 13% à Bozo et 30% à Gomoka. Cette situation n'était pas sans rappeler les observations faites au Zimbabwe par Johnson et coll. [1981a], où 20% de Mastomys natalensis étaient trouvés positifs vis à vis de l'antigène Lassa dans deux villages explorés alors que la population humaine apparaissait séronégative (K.M. Johnson, comm. pers.). Ainsi dès 1981 nous proposons l'hypothèse de la circulation du virus Mopeia (nommé alors provisoirement "Mozambique") ou d'un virus antigéniquement proche en Centrafrique. Pour appuyer cette thèse et en l'absence

d'isolement du virus causal, les premières études sérologiques comparatives furent entreprises afin de retrouver une réaction préférentielle vis à vis de l'antigène Lassa ou Mozambique, seuls arénavirus connus alors en Afrique, et préciser ainsi la spécificité des anticorps mis en jeu. En raison du faible nombre et des petites quantités de sérum alors disponible nous n'avons titré que quelques sérums de rongeurs trouvés positifs; toutefois la mise au point récente d'un test radio immunologique [Cleveland et coll., 1979], proposé par l'auteur, nous a permis d'obtenir les résultats suivants par comparaison avec l'IFI:

N° du sérum	Spécimen prélevé	IFI		RIA (1)	
		LAS (2)	MOP	LAS	MOP
79208	<u>Praomys jacksoni</u>	16 (3)	nt	20	20
79280	<u>Mastomys sp.</u>	64	nt	320	640
79284	<u>Praomys jacksoni</u>	4	nt	200	200
80435	<u>Praomys jacksoni</u>	8	4	400	800
80303	<u>Praomys jacksoni</u>	64	8	400	800

(1) Radio Immuno Assay en phase solide, Cleveland et coll., San Diego Univ., CA.

(2) Antigènes Lassa et Mopéia

(3) Titre en anticorps

Ces quelques résultats confirmèrent en raison de la spécificité et de la sensibilité du RIA la réalité des cicatrices sérologiques observées, définitivement rapportables à une infection par le virus Lassa ou un virus apparenté. Toutefois, la question demeura de l'agent causal en raison même de la disparité des résultats trouvés vis à vis des deux antigènes testés dans les différentes méthodes: un sérum donnait un titre en anticorps fluorescents nettement plus élevé contre l'antigène

Lassa, tandis que dans le RIA on ne relevait pas de différence notable dans la mesure où un écart d'une dilution n'est pas considéré comme significatif.

Ces premiers résultats nous firent ainsi conclure dans un rapport écrit en Février 1981: "Les rongeurs positifs vis à vis du virus "Mozambique" (Mopéia) étendent d'une part l'aire de répartition de ce virus à l'Afrique Centrale et d'autre part font reconnaître le genre Praomys ~~WAGLIA~~ comme nouveau réservoir de virus.... Dans cette région d'Afrique Centrale, le virus de Lassa cède la place chez les rongeurs du groupe Mastomys-Praomys au virus "Mozambique", ou un virus antigéniquement proche, comme il semble le faire au Zimbabwe et au Mozambique....La présence de ce virus dans le Centrafrique pose l'intéressant problème de la zone de transition avec les aires d'endémie de la Fièvre de Lassa; Toutefois il faut s'attendre à une répartition géographique intriquée considérant que des enquêtes préliminaires chez des rongeurs du Zaïre ont donné des résultats totalement négatifs".

Trois mois plus tard nous avons la chance d'isoler un nouvel arénavirus antigéniquement proche du virus de Lassa et différent du virus "Mozambique", à partir du broyat d'organes de Praomys capturés en RCA [Gonzalez et coll., 1983].

TABLEAU 1: PREVALENCE EN ANTICORPS FLUORESCENTS ANTI-LASSA DANS DIVERSES POPULATIONS HUMAINES DE REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE.

Province ou région	Total testé	Nombre de positifs (1)	Année* (2)
Mongoumba	499	0	1979
Bangassou	497	0	1980
Bozo	100	0	1981
Birao	280	0	1981
Bambari	90	0	1981
Bouar	184	4	1981
Nola	80	0	1982
Gomoka	83	0	1982
Bouboui	44	0	1982
Botambi	52	0	1982
Zemio (3)	166	0	1983
N° Bangui N° Goro (4)	22	0	1983
Lomie/Adjela (4)	65	0	1984
Paoua (5)	96	0	1984

(1) Positifs vis à vis du virus Lassa, Souche LAS"J"

(2) Année de récolte des échantillons

(3) A.J.Georges, D.Y.M.Meunier et J.P.Gonzalez, 1983, non publié

(4) D.Y.M.Meunier, A.J.Georges et J.P.Gonzalez, 1984, non publié.
(Région de Bangassou).

(5) D.Y.M.Meunier, A.J.Georges et J.P.Gonzalez, 1984, non publié.

TABLEAU 2: PREVALENCE EN ANTICORPS ANTI-LASSA DANS DIVERS GROUPES ANIMAUX DE REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE.

Origine	Genre, groupe	total testé	Nombre de positifs (1)
Bangui	<u>Rattus</u>	2	0
	Cobaye	18	0
Bayanga (2)	<u>Rattus</u>	12	0
Birao	<u>Praomys</u>	2	0
Botambi	<u>Praomys</u>	41	13
	<u>Mastomys</u>	2	0
	<u>Mus</u>	18	0
	<u>Rattus</u>	2	0
Bouar	<u>Praomys</u>	6	1
	<u>Mastomys</u>	56	2
	<u>Mus</u>	2	0
	<u>Rattus</u>	2	0
	Chien	133	9
Bouboui	<u>Praomys</u>	55	5
Bozo	<u>Praomys</u>	40	8
	<u>Mastomys</u>	31	1
	<u>Mus</u>	15	0
	<u>Rattus</u>	2	0
	<u>Lemniscomys</u>	3	0
	<u>Aethomys</u>	2	0
Gomoka	<u>Praomys</u>	13	4
	<u>Thamnomys</u>	2	1
Maitikoulou (2)	<u>Arvicanthys</u>	25	0
	<u>Lemniscomys</u>	3	0
	<u>Mastomys</u>	5	0
	<u>Tatera</u>	3	0
	<u>Taterillus</u>	5	0

(1) Vis à vis du virus Lassa, souche LAS"J"

(2) D.Y.M.Meunier, A.J.Georges et J.P.Gonzalez, 1984, non publié

3.2. Isolement d'un nouvel arénavirus en République Centrafricaine

En 1981 et 1982, dans le MCL aux CDC à Atlanta, nous avons traité 483 spécimens biologiques prélevés sur le terrain centrafricain de 1979 à 1982. Ce matériel destiné aux tentatives d'isolement de virus était constitué à 90% par des prélèvements de rongeurs sauvages ou péri-domestiques (organes et sang total). Les autres spécimens (Sang humain, musaraignes, chauves souris, cobayes et puces) de même origine ont été aussi traités et entraient dans un protocole d'étude pour lequel la recherche du virus Ebola, était faite en parallèle.

Ces études ont permis l'isolement de 12 souches d'un nouvel arénavirus (Tableaux 3 et 4).

Dès les premiers isollements faits chez Fraomys, le virus identifié apparaît comme un arénavirus antigéniquement proche du virus Lassa, mais différent de ce dernier et du virus Mopéia par la mise en évidence de sites antigéniques spécifiques de souche à l'aide d'anticorps monoclonaux [Gonzalez et coll., 1983a] (Tableau 5).

En effet les trois types de virus Lassa, Mopéia et Mobala sont reconnus sans distinction par les anticorps polyclonaux humains ou animaux produits après infection par le virus de Lassa. Quand on utilise une batterie d'anticorps monoclonaux préparés contre les souches LAS"J" ou MOP Mp3, il est possible de distinguer ces trois types de virus par la présence ou non de certains sites antigéniques, ou épitopes, à la surface

des protéines virales. Les anticorps monoclonaux qui reconnaissent de façon univoque LAS"J" (52.183.3) ou MOP Mp3 (53.17.10) ont été testés contre différentes souches du même type viral pour éliminer l'éventuelle reconnaissance d'un épitope spécifique de souche et non plus spécifique de genre ou d'espèce. Nous savons que cette différenciation à l'aide d'anticorps monoclonaux est en fait la traduction de structures quaternaires ou primaires des protéines de structure, en relation directe avec l'antigénicité des souches. En ce qui concerne les réactions croisées de l'antigène Mobala avec les sérums hyperimmuns dirigés contre les virus du complexe Tacaribe, les réactions positives ne sont pas très significatives du degré de parenté avec ces virus du fait du titre homologue élevé (≥ 1024). Par contre, les réactions négatives avec les antigènes Mobala et l'éloignement des souches testées vis à vis des souches homologues Tacaribe, Macnupo et Latino (Tableau 5). Wulff et coll. [1978], montrent dans une étude quantitative de ces réactions croisées que "les arénavirus du Nouveau Monde donnent des réactions croisées importantes entre eux la plupart du temps mais faiblement avec ceux de l'Ancien Monde.". Au total le virus Mobala testé vis à vis d'anticorps polyclonaux montre son appartenance nettement préférentielle au groupe des arénavirus de l'Ancien Monde et grâce aux anticorps monoclonaux, on peut aisément différencier les virus Lassa, Mopeia, Mobala et LCM. Enfin P.Jahrling (Comm.pers.) démontre récemment dans un test de neutralisation utilisant des sérums de cobayes, de singes et humains, qu'il existe entre ces virus de l'Ancien Monde une

parenté certaine cependant que l'on observe des variations géographiques indiscutables d'intensités variables mais parfaitement reproductibles.

Si l'isolement d'une souche de virus apparenté au virus Lassa chez Mastomys ne surprend guère en raison de sa qualité de réservoir avéré pour les virus Lassa et Mopéïa [Monath et coll., 1974; Wulff et coll., 1975b; Johnson et coll., 1981a.], par contre les deux souches isolées chez Arvicanthis niloticus et Hylomiscus sp. paraissent singulières. En ce qui concerne A. niloticus, une enquête sérologique faite dans le Nord-Ouest du pays, au village de Maitikoulou, montre une prévalence nulle en anticorps anti-Lassa et anti-Mobala [Meunier et coll., 1984, non publié]. Il n'en reste pas moins que cette espèce est relativement abondante dans cette région, et qu'il y aurait là un excellent candidat réservoir ou réservoir alterne, de virus en "zone de transition" entre le virus pathogène pour l'Homme et le virus spécifique de rongeurs. Rappelons ici que cette région de Centrafrique se situe à environ 500km du village de Lassa et dans le même domaine phytogéographique médio-soudanien. La souche isolée tardivement d'Arvicanthis devra faire l'objet d'une étude des parentés antigénique et génétique au même titre que les autres isolats d'arénavirus africains. Déjà sur le terrain nous focalisons nos recherches sur cette espèce afin d'en préciser son rôle éventuel dans l'écologie des arénavirus d'Afrique.

En 1983 nous proposons au cours d'un symposium sur les virus à ARN négatif [Gonzalez et coll., 1983] de nommer ce nouvel arénavirus de Centrafrique d'après le nom donné au Fraomys dans

la langue Lissango des natifs oubanguiens: Mobala. Ce terme en fait désigne aussi Mastomys. Au cours de la même session nous mettions l'accent sur l'intérêt de nommer le virus "Mozambique", Mopeia du nom du village où a été capturé le rongeur ayant permis l'isolement de ce virus. Ces propositions présentent à nos yeux le double intérêt de faire ressortir dès à présent l'originalité de ces isolats les uns par rapport aux autres et éviter l'ambiguïté de souches identiques isolées de pays différents.

Pour nous résumer: nous entreprenons les premières enquêtes sérologiques à la recherche du virus Lassa, guidés par l'idée que la Fièvre de Lassa aurait pu se manifester dans les années 40 dans l'Est de l'Oubangui-Chari, et entreprenons avec assurance les premières enquêtes sérologiques à la recherche du virus Lassa. En 1980 nous trouvons quelques rares cicatrices sérologiques dans les populations humaines de Centrafrique qui font alors penser plus à des cas sporadiques et vraisemblablement, par comparaison avec la situation présente en Sierra Leone, à l'absence de zone d'endémie de la fièvre de Lassa en R.C.A.. Enfin en 1982 le virus Mobala est isolé chez des rongeurs sauvages et nous fait conclure au caractère vicariant de cet arénavirus occupant en R.C.A la niche écologique propre au virus Lassa en Afrique de l'Ouest; situation semblable et directement applicable au virus Mopeia en Afrique de l'Est et australe. Nous envisageons alors, par référence à la situation connue des arénavirus en Amérique du Sud, d'entreprendre l'esquisse d'une répartition de ces arénavirus au niveau du continent et de comparer sous différents aspects les isolats variés par leur hôte et leur origine géographique en Afrique.

TABLEAU 3: SPECIMENS INOCULES POUR L'ISOLEMENT DU VIRUS MOBALA

Origine	Nombre	Specimens (1)	Souches isolées
<u>Praomys</u>	127	Organes+sang	10
<u>Mastomys</u>	50	Organes+sang	1
<u>Mus leqqada</u>	41	Organes	0
<u>Arvicanthys</u>	14	Organes	0
<u>Hylomyscus</u>	13	Organes	1
<u>Hylomys</u>	1	Organes	0
<u>Rattus rattus</u>	5	Organes	0
<u>Lophuromys</u>	5	Organes	0
<u>Lemniscomys</u>	5	Organes	0
<u>Dephomys</u>	3	Organes	0
<u>Malacomys</u>	1	Organes	0
<u>Denomys</u>	1	Organes	0
<u>Stochomys</u>	2	Organes	0
<u>Thamnomys</u>	4	Organes	0
<u>Aethomys</u>	4	Organes	0
<u>Soricidae</u>	1	Organes	0
<u>Micropteroopus</u>	2	Organes	0
<u>Xenopsilla</u>	20	Entier	0
Cobayes	20	Organes+sang	0
Homme	7	Sang	0

(1) Au total 483 spécimens de sang total et de broyats d'organes (Coeur, poumon, foie, rate, rein, encéphale) ont été inoculés séparément aux cultures cellulaires.

TABLEAU 4: SOUCHES DE VIRUS MOBALA ISOLEES DE RONGEURS SAUVAGES CAPTURES EN REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

N°	Origine	Specimen inoculé	IFI (1)		Réisolement (4)
			SH (2)	Mab (3)	
3080	<u>Praomys</u>	organes (5)	+	+	+
3076	<u>Praomys</u>	organes	+	+	+
3076	<u>Praomys</u>	sang	+	+	+
3061	<u>Mastomys</u>	organes	+	+	-
3068	<u>Praomys</u>	organes	+	nt	+
3051	<u>Praomys</u>	organes	+	+	+(6)
3059	<u>Praomys</u>	organes	+	+	+(6)
3099	<u>Praomys</u>	organes	+	+	+
3101	<u>Praomys</u>	sang	+	+	+
3163	<u>Praomys</u>	sang	+	+	+
3200	<u>Praomys</u>	organes	+	+	+
3219	<u>Hylomyscus</u>	sang	+	+	-

(1) Immunofluorescence Indirecte

(2) Sérum humain de convalescent de Fièvre de Lassa

(3) Anticorps monoclonal: SPB/52-54-2

(4) Isolement et réisolement sur cellules Vero

(5) Pool d'organes broyés

(6) Titre au réisolement (Dose pour 50% de cellules fluorescentes): 3051: $3,76 \times 10^4$ ID₅₀/ml

3059: $5,75 \times 10^4$ id₅₀/ml

TABLEAU 5: CARACTERISTIQUES ANTIGENIQUES DE DEUX SOUCHES DU VIRUS MOBALA DANS LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Anticorps	Souches virales				
	MOB3080	MOB3076	LAS "Josiah"	MOPMoz	MLC
SH/LAS (1)	+	+	+	+	+
SHa/MOP (2)	+	+	+	+	+
Mab. (3) :					
52-85-6	-	-	+	+	-
53-17-10	-	-	-	+	-
52-183-3	-	-	+	-	-
9-7-9	-	-	+ -	+ -	+
24-A-21	-	-	+	+	+
52-54-2	+	+	+	+	+
SHa / (4) :					
Amapari (196437)	+	-	+	+	-
Pichinde (198078)	+	+	+	+	+
Parana (640156)	+	+	+	+	+
Tamiami (192028)	+	+	-	-	-
Machupo (109521)	nt	-	+	+	-
Junin (196585)	+	+	+	+	+
Tacaribe (196416)	-	-	+	-	-
Pinheiro (700867)	+	+	+	+	+
Latino (197833)	nt	-	nt	nt	nt

(1) SÉRUM humain de convalescent, anti Lassa

(2) SÉRUM de hamster hyperimmun anti Mopéia

(3) Anticorps monoclonaux

(4) SÉRUM de hamster hyper immun anti/

FIGURE 7: PAYSAGES DE REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE:

- A. Village rue en secteur sud-soudano-guinéen
- B. Derrière les habitations commence la savane arborée et forêt galerie, zone privilégiée de piègeage des rongeurs péri-domestiques.
- C. Domaine soudano-guinéen des savanes arborées à végétation ligneuse dégradée anthropique:
- L.l.: Lophira lanceolata
 - D.o.: Daniella olivieri
 - F.p.: Pennisetum purpureum



A

B





C

L.I.

D.o.

P.p.

3.3. Recherche de zones endémiques et/ou enzootiques

La répartition actuelle du virus de la Fièvre de Lassa et des virus qui lui sont antigéniquement proches en Afrique peut être considérée selon trois grandes zones géographiques (Tableau 6): L'Afrique de l'Ouest, avec quatre pays où la fièvre de Lassa semble endémique et peut se manifester de façon épidémique: Nigeria, Sierra Léone, Liberia et Guinée; l'Afrique de l'Est et australe où seuls le virus Mopéia et un virus antigéniquement apparenté ont été mis en évidence chez des rongeurs sauvages du Mozambique et du Zimbabwe, et où les populations humaines ne semblent pas présenter de cicatrices sérologiques vis à vis de ces virus. Et enfin en Afrique centrale où nous avons isolé le virus Mobala en R.C.A. Pour rechercher les réactions croisées hétérologues et préciser la spécificité de souche des marques sérologiques observées, nous avons utilisé la réaction d'IFI. En effet, en raison du faible pouvoir neutralisant des virus étudiés ou de la mise en jeu de techniques lourdes pour obtenir un effet neutralisant, la réaction d'immunofluorescence était la méthode de choix pour des enquêtes étendues.

Lors de la mise en évidence en R.C.A. des premiers sérums humains et animaux positifs contre le virus Lassa, et en l'absence d'isolement de virus, nous avons voulu comparer les marques sérologiques observées avec les antigènes Lassa et Mopéia. Les différents sérums testés n'ont en fait pas montré de réponse nette en faveur de l'un ou de l'autre des antigènes; au moins note-t-on un titre légèrement plus élevé avec le virus de

Lassa ce qui rend alors ces résultats insuffisants pour conclure. De plus 5 sérums humains testés contre ces mêmes sérums dans un test radio-immunologique (Cleveland, Johnson et Gonzalez, non publié) sont demeurés négatifs. L'isolement du virus Mobala levait le doute sur l'appartenance de ces marques sérologiques. La sérologie comparative nous a alors servi à définir l'homogénéité des réponses obtenues lors des enquêtes de prévalence et une éventuelle réponse préférentielle contre la souche virale géographiquement mise en cause. Ainsi une enquête sérologique utilisant l'antigène Mobala met en évidence dans les populations humaines de RCA, une prévalence supérieure en anticorps contre la souche Mobala que contre la souche Lassa (Tableau 7).

En ce qui concerne les sérums humains (Tableau 8): En R.C.A., nous sommes en droit de considérer que 3 des sérums trouvés positifs (1574, 1604 et 1624) peuvent éventuellement être rapportés à des cicatrices sérologiques dues effectivement au virus Lassa compte tenu des échanges privilégiés des populations de la région de Bouar vers le Cameroun. Nous n'avons malheureusement pas pu retrouver les personnes concernées par ces sérologies et ainsi pouvoir confirmer l'hypothèse d'un séjour hors du territoire centrafricain. Le sérum 1544 pourrait aussi être rattaché aux autres dans la mesure où les convalescents de Fièvre de Lassa présentent des anticorps anti Mopeia à un titre égal ou inférieur au titre homologue [Wulff et coll., 1977]. Enfin les deux autres sérums dépistés par triage en utilisant l'antigène Mobala [Georges et coll., 1983], semblent très en

faveur d'une contamination spécifique par ce virus. En effet sur 8 villages explorés sérologiquement on ne trouve de séropositivités que dans deux villages où précisément le virus Mobala a été isolé chez les rongeurs. En ce qui concerne les sérologies humaines de cas confirmés de Fièvre de Lassa de Sierra Leone et de sujets dépistés en zone d'endémie au Nigeria [Tomori, comm. pers.], la réaction est nettement préférentielle vis à vis de l'antigène Lassa par rapport au virus Mopeia, ce qui est devenu classique de l'infection par le virus Lassa en Afrique de l'Ouest; toutefois, la sérologie réalisée avec le virus Mobala demeure surprenante par des titres égaux ou supérieurs au virus Lassa lui même (Tableau 8). Cette dernière observation est encore difficilement interprétable et nous verrons au chapitre des parentés génétiques qu'une explication peut être possible.

Voyons maintenant les résultats obtenus en utilisant des sérums de rongeurs d'origines différentes et testés vis à vis des virus Lassa, Mopéia et Mobala (Tableau 9). Sur 13 groupes animaux, dont 11 genres de rongeurs, capturés dans divers pays d'Afrique, seuls les rongeurs des sous genre Mastomys et Praomys et un seul spécimen pour chacun des genres Mus et Aethomys ont été trouvés porteurs d'anticorps anti Lassa. Le virus Lassa et les arénavirus qui lui sont proches paraissent avoir une certaine spécificité d'hôte naturel chez les Muridae et particulièrement dans le genre Praomys. Enfin on remarque 6 chiens séropositifs à Bouar. On sait que ces animaux ont à se nourrir eux mêmes dans la quasi totalité des cas, ce sont des prédateurs reconnus de rongeurs et une éventuelle infection de

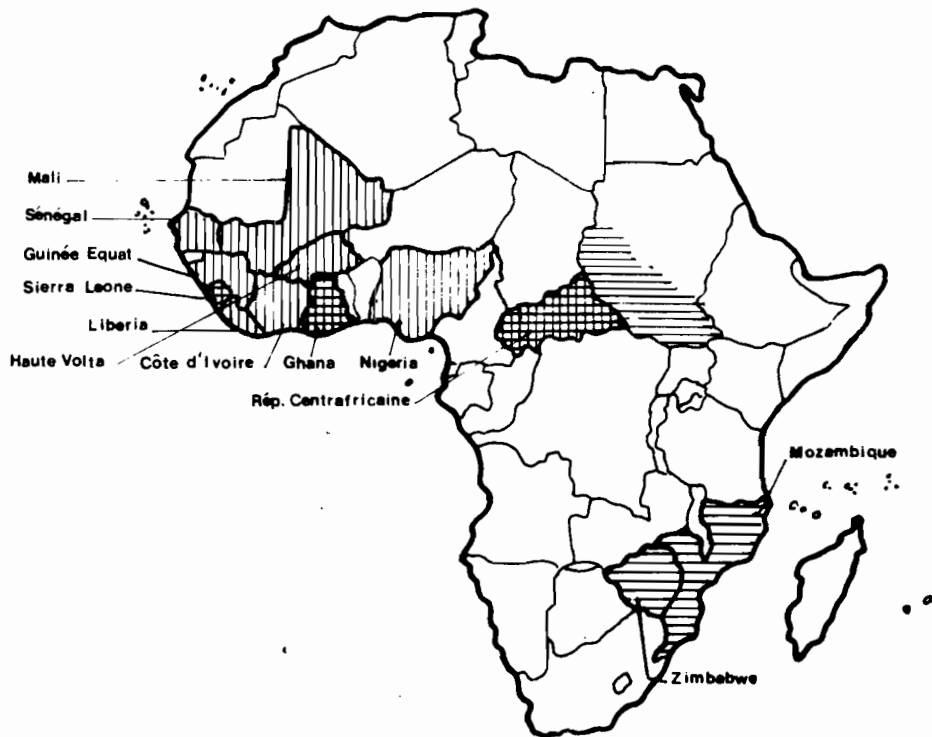
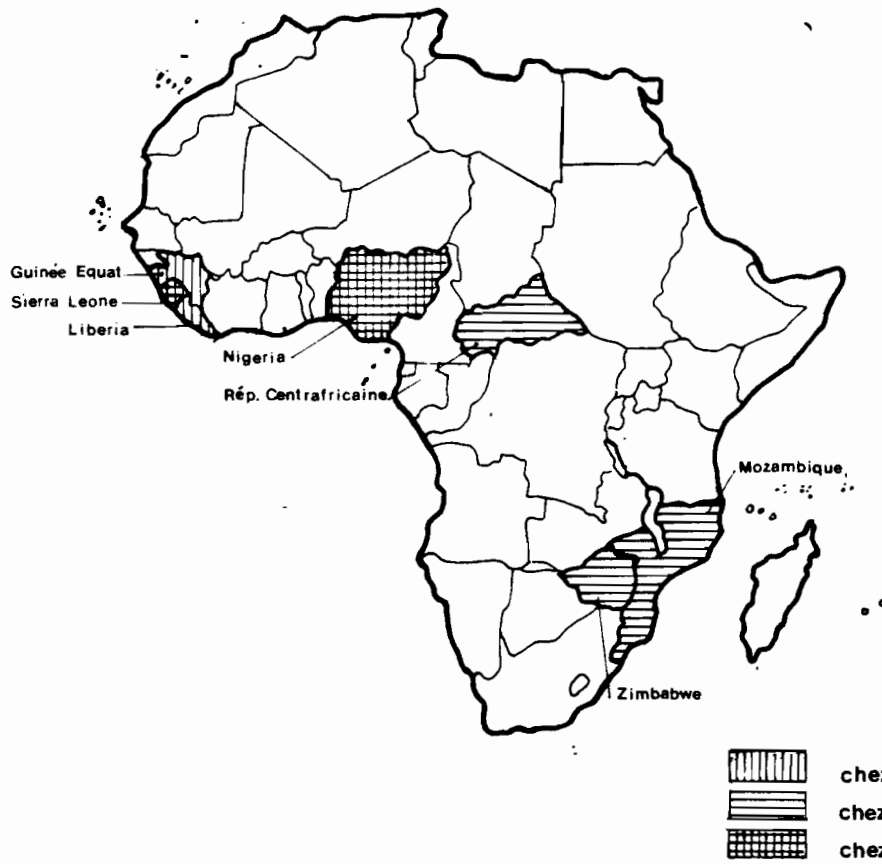
ce fait n'est donc pas à exclure. Si cette observation peut faire penser à un réservoir de virus accidentel il n'en reste pas moins qu'elle revêt une importance particulière dans la mesure où elle concerne un animal domestique et commensal de l'Homme. En effet cet animal n'a jamais été étudié jusqu'ici sous cet angle, et pourrait être un réservoir potentiel redoutable pour l'Homme.

Pour la R.C.A., si les titres en anticorps préférentiels sont naturellement dirigés contre l'antigène Mobala on est frappé d'observer une meilleure réponse vis à vis du virus de Lassa que du virus Mopeia (Tableau 10). Comme précédemment pour les virus humains, cela laisse penser à une parenté antigénique plus étroite entre les virus Lassa et Mobala qu'avec le virus Mopeia. En haute Volta, nous savons qu'à Ouagadougou un cas humain de Fièvre de Lassa a été dépisté en 1980 [OMS, 1981]; les spécimens de rongeurs que nous avons testés proviennent de la région de Ouagadougou et semblent en faveur d'une circulation du virus Lassa à bas bruit. La faible densité de rongeurs joue peut-être un rôle dans l'absence de manifestation à caractère épidémique. Au Sénégal la situation est différente, la réponse en anticorps n'est pas homogène et pourrait faire penser à la présence d'un arénavirus antigéniquement proche mais distinct de ceux testés.

En Sierra Leone, la prévalence en anticorps élevée confirme la circulation du virus de Lassa dans la population de Muridae de ce pays. Au Zaïre l'échantillonnage reste faible mais l'absence d'arénavirus peut trouver un début d'explication si l'on admet la nécessité de biotopes particulier pour le maintien

Figure 8: Carte de répartition des arénavirus isolés en Afrique et des zones de prévalence en anticorps anti-Lassa.

Pays où le virus Lassa et des virus apparentés
ont été isolés en Afrique (1984)



Pays où ont été observés des anticorps anti-Lassa en Afrique

de ces virus, dans la mesure où nous nous trouvons là en plein massif forestier congolais du domaine Congo-guinéen. Enfin pour l'Afrique de l'Est et australe, le faible échantillonnage testé confirme toutefois la circulation active d'au moins un arénavirus, le virus Mopéia.

En fait en ce qui concerne le virus Lassa, les zones épidémiques ou de prévalence en anticorps anti-Lassa élevée ($\geq 10\%$) intéressent des régions géographiques limitées. Il existerait donc un facteur limitant à la circulation du virus. La spécificité d'hôte ne devrait pas intervenir en raison de la large distribution du sous genre Mastomys en Afrique. On pense en fait que l'apparition de bouffées épidémiques serait due à la convergence de facteurs d'accroissement des populations humaines et des populations de rongeurs dans un même écosystème [McCormick et coll., 1980; Keenlyside et coll., 1983]. De la même manière, si l'on considère des régions proches et des écosystèmes comparables à ceux des zones d'endémie, on observe une prévalence en anticorps étonnamment faible ou nulle. En ce qui concerne les populations humaines on est en droit de penser que le phénomène d'épidémisation est heureusement exceptionnelle et nécessite une déviation plus ou moins complexe du cycle naturel du virus. Pour les rongeurs, plusieurs hypothèses à l'absence de prévalence en anticorps peuvent être avancées: en premier lieu l'insuffisance des enquêtes sérologiques sur les populations de rongeurs appartenant à des groupes différents, en second lieu, la surveillance discontinue pratiquée dans le temps, en raison du turn-over important des populations de murinés, a pu nous faire

manquer une montée en anticorps dans la population; en effet on a pu démontrer pour le virus Machupo que l'aptitude à produire des anticorps contre ce virus chez Calomys et à présenter une infection chronique étaient liées au génotype; ainsi pouvait on avoir deux populations en balance dans le temps selon le taux. Pour nous resumer, il semble que les marques sérologiques aient une certaine spécificité de réponse vis à vis des souches de la même origine géographique, mais cela n'est pas absolu et doit faire intervenir plusieurs facteurs antigéniques imbriqués. En conclusion, ce que nous observons en considérant l'ensemble de ces données relatives à la circulation d'arénavirus en Afrique, c'est la délimitation plus ou moins restreinte des zones de prévalence en anticorps et/ou d'incidence des virus. Cela avait très tôt été observé en Amérique du Sud pour les arénavirus du Complexe Tacaribe où Johnson et coll. [1967] mettaient l'accent sur la relative spécificité d'hôtes de ces virus et parlaient alors de foci enzootiques. De vastes zones apparaissent dès aujourd'hui comme indemnes d'arénavirus, au moins dans les populations humaines (Sud Soudan, Ethiopie; G.H.Tignor, comm.pers.) ce qui semble a priori lié à des écosystèmes radicalement différents des forêts-savanes jusqu'ici concernées. Enfin, le niveau de surveillance demeure encore trop faible pour avoir une représentation précise de la distribution des arénavirus et une notion dynamique de leur circulation, mais dès à présent les réservoirs semblent variés, et leur "choix" par le virus déterminé par le macro-environnement en place.

TABLEAU 6: PREVALENCE EN ANTICORPS HUMAINS ANTI-LASSA DANS
DIFFERENTS PAYS D'AFRIQUE.

Pays		total testé	Pourcentage de positifs
Benin	(1)	603	0,0
Gabon (Haut Ogoué)	(2)	253	0,0
Gabon (My Ogoué-Estuaire)	(3)	62	12,9
Haute Volta	(1)	993	0,1
Kenya	(4)	741	0,0
Liberia (Zor Zor)	(5)*	53	13,0
Mozambique	(6)	29	0,0
Nigeria	(7)	749*	6,0
Nigeria	(8)*	190	9,8
Nigeria (Benue)	(9)*	458	2,0
R.C.A.	(10)	2154	0,2
Sierra Leone	(11)*	461	43.
Sierra Leone	(12)		1-15
Sénégal	(13)	283	1/
Sénégal	(14)	100	0,0
Soudan	(15)	291	5,5
		Sud-Ouest	
		Sud-Est	2,1
		Nord	0,0

* Tests de seroneutralisation et de fixation du complément.

(1) Gonzalez et coll., 1984

(2) Ivanoff et coll., 1982

(3) Kern et coll., 1982

(4) Johnson B. et coll., 1982

(5) Monath et coll., 1973

(6) M.P.Kiley comm.pers.

(7) Henderson et coll., 1972

(8) Fraser et coll., 1975

(9) Tignor G.H., Casals J. et Chukwumah b., comm.pers.

(10) Gonzalez et coll., 1983

(11) Fraser et coll., 1974

(12) McCormick et coll.,

(13) Casals j. et Tignor G.H., comm.pers.

(14) Saluzzo J.F., comm.pers.

(15) Meegan J. et Tignor G.H., comm.pers.

TABLEAU 7: PREVALENCE EN ANTICORPS FLUORESCENTS ANTI-MOBALA DANS DIVERSES POPULATIONS HUMAINES DE REPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

Origine	Total testé	Nombre de positifs
Bangassou	22	0
Bouar	229	0
Bouboui	127	4
Gomoka	78	3
Zémio (1)	166	0
Lomie* (1)	32	0
Adjela* (1)	33	0

* Région de Zémio

(1) D.Y.M.Meunier, A.J.Georges et J.P.Gonzalez, 1984, non publié

TABLEAU 8: SEROLOGIE COMPAREE DE SERUMS HUMAINS POSSEDANT DES ANTICORPS FLUORESCENTS CONTRE LES VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA

Origine	Identification	LAS	MOP	MOB
R.C.A. (1)	1544	64	64	-
	1574	64	-	-
	1604	16	-	-
	1624	128	-	-
	2209	-	-	16
	2310	-	-	32
	2315	-	-	16
Sierra Léone (2)	095312	≥ 1024	1024	≥ 1024
	77120	1024	256	1024
	057755	256	128	256
Nigeria (3)	MGH 39	160	320	640
	JAL306	160	80	160

(1) Georges et coll., 1984; Gonzalez et coll., 1983

(2) J.P. Gonzalez et J.B. McCormick, 1983, non publié

(3) O. Tomori, 1983, comm. pers.

TABLEAU 9: PREVALENCE EN ANTICORPS FLUORESCENTS ANTI-LASSA CONTRE DIVERS GROUPES ANIMAUX D'AFRIQUE.

Pays	Origine	Genre ou groupe	Prévalence	positifs /total*
R.C.A.	R.C.A.	<u>Aethomys</u>	0	0/ 2
		<u>Arvicanthys</u>	0	0/ 25
		Chien	6,9	9/133
		cobaye	0	0/ 18
		<u>Lemniscomys</u>	0	0/ 6
		<u>Mastomys</u>	3,2	3/ 94
		<u>Mus</u>	0	0/ 35
		<u>Praomys</u>	19,9	31/156
		<u>Rattus</u>	0	0/ 8
		<u>Tatera</u>	0	0/ 3
		<u>Taterillus</u>	0	0/ 5
		<u>Thamnomys</u>	-	1/ 2
Haute volta	Duagadougou (banlieu)	<u>Mastomys</u>	4,9	5/102
		<u>Rattus</u>	0	0/ 2
Zaïre (1)	Yalosemba,	<u>Mastomys</u>	0	0/ 64
	Tandala et Guéména	<u>Praomys</u>	0	0/ 44
		<u>Mus</u>	0	0/ 16
		<u>Rattus</u>	0	0/ 47
Sierra Léone (2)	Fangouma	<u>Mastomys</u>	28,3	36/127
		<u>Praomys</u>	-	1/ 1
		<u>Mus</u>	1,9	1/ 54
Sénégal (3)	Savoigne	<u>Arvicanthys</u>	0	0/ 20
		<u>Mus</u>	0	0/ 9
	Dakar (région)	<u>Arvicanthys</u>	0	0/ 31
		<u>Cricetomys</u>	0	0/ 16
		<u>Mastomys</u>	0	0/ 64
		<u>Rattus</u>	0	0/ 1
	Kaolack	<u>Arvicanthys</u>	0	0/ 29
		<u>Mastomys</u>	0	0/ 10
		<u>Rattus</u>	0	0/ 1
Mozambique (4)		<u>Mastomys</u>	21	4/ 19
Zimbabwe (5)		<u>Mastomys</u>	20	11/ 55
		<u>Aethomys</u>	-	1/ 1

(1) Gonzalez and Johnson, 1980.non publié

(2) Gonzalez and McCormick,1981.non publié

(3) Saluzzo et coll.,1982,comm.pers.

(4) Wulff et coll.,1977.

(5) Johnson et coll.,1981

* Nombre de sérums positifs (>=16)/nombre total de sérums testés

TABLEAU 10: SEROLOGIE COMPAREE DE SERUMS ANIMAUX POSSEDANT DES ANTICORPS FLUORESCENTS CONTRE LES VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA

Origine	Genre	Numero ID Lab	LAS	MOP	MOB
R.C.A.	<u>Mastomys</u>	3041	256	128	256
	<u>Mastomys</u>	3043	-	-	16
	<u>Praomys</u>	3087	128	64	128
	<u>Praomys</u>	3088	32	-	128
	<u>Rattus</u>	3097	16	16	64
	<u>Thamnomys</u>	3108	64	32	64
	<u>Praomys</u>	3110	-	-	32
	<u>Praomys</u>	3167	16	16	32
	<u>Praomys</u>	3184	64	32	128
	<u>Praomys</u>	3198	64	64	256
	<u>Praomys</u>	3214	64	256	256
	<u>Praomys</u>	3217	64	-	64
	<u>Praomys</u>	3223	256	256	1024
	<u>Praomys</u>	3243	64	64	64
	<u>Praomys</u>	3250	64	16	128
	<u>Praomys</u>	3293	64	32	64
		<u>Canis</u>	391	256	128
Haute-Volta (1)	<u>Mastomys</u>	20200	16	-	-
	<u>Mastomys</u>	20231	16	8	8
	<u>Mastomys</u>	20239	16	-	16
	<u>Mastomys</u>	20265	32	-	-
Sierra Léone (2)	<u>Mastomys</u>	00014	32	16	-
	<u>Mastomys</u>	00021	16	-	-
	<u>Mastomys</u>	00055	16	-	-
	<u>Mastomys</u>	00076	16	16	-
	<u>Mastomys</u>	00872	256	16	8
	<u>Mastomys</u>	00875	64	-	-
	<u>Mastomys</u>	01884	128	16	8
	<u>Mus</u>	04320	64	16	16
Sénégal (3)	<u>Muridae</u>	367	16	-	64
	<u>Muridae</u>	374	16	-	-
	<u>Muridae</u>	379	16	-	32
	<u>Muridae</u>	17	-	16	-

* Titre en anticorps

** Titre inférieur à 4

(1) J.P.Gonzalez et J.C.Gautun, 1983, non publié

(2) J.P.Gonzalez et J.B.McCormick, 1983, non publié

(3) J.F.Saluzzo, 1984, comm.pers.

3.4. Caractéristiques physico-chimiques des souches Lassa, Mopeia et Mobala

3.4.1. Microscopie électronique

Nous avons n'avons étudié en détail que le virus Mobala pour sa morphologie en microscopie électronique, cela en raison du caractère nouveau de son isolement. Ainsi, les observation faites ont pu être utilement comparées à celles pour le virus Lassa, largement étudié sous cet aspect par Murphy et coll. [1970 et 1975]. Enfin, nous avons pu réalisé que très récemment des observations du même type sur le virus Mopéia; ce travail original est encore à l'étude mais les observations faites jusqu'ici ne semblent pas apporter de différences fondamentales d'avec celles faites sur le virus Lassa [J.P.Gonzalez et coll., 1984, non publié].

En ce qui concerne le virus Mobala, la morphologie des particules virales observées est généralement d'aspect sphérique mais peut aussi être pléomorphique. Leur diamètre varie de 67 nm à 250 nm avec un diamètre moyen de 165 nm. On observe en surface de ces particules des projections de l'enveloppe de type membranaire à 3 strates moléculaires. Intérieurement les particules contiennent des granulations d'un diamètre moyen de 20 nm (dimensions variant de 17 à 26 nm). Les virions bourgeonnent de façon caractéristique à partir de la membrane cellulaire et

plus rarement à partir de la membrane ergastoplasmique. On observe en outre des corps d'inclusion intracytoplasmique de taille et de densité variables à l'intérieur des cellules infectées (Figure 9).

Les caractéristiques morphologiques observées sont similaires à celles décrites classiquement pour les arénavirus. On a pu remarquer uniquement la largeur un peu plus élevée des projections membranaires et la forme décrite en club de golf n'apparaît pas [Murphy et Whithfield, 1970; Murphy et coll., 1975]. Signalons ici que les inclusions contenues dans la particule virale et denses aux électrons ont été rapportées à la présence de l'ARN ribosomal d'origine cellulaire dont le rôle reste totalement inconnu.

FIGURE 9: Le virus Mobala en microscopie électronique

Les cellules Vero E6 infectées par le virus Mobala ont été récoltées 6 jours après inoculation, le tapis cellulaire et le milieu de culture ont servi aux préparations:

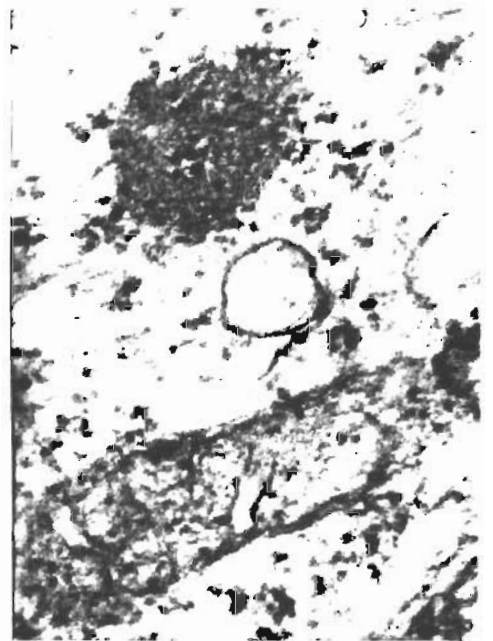
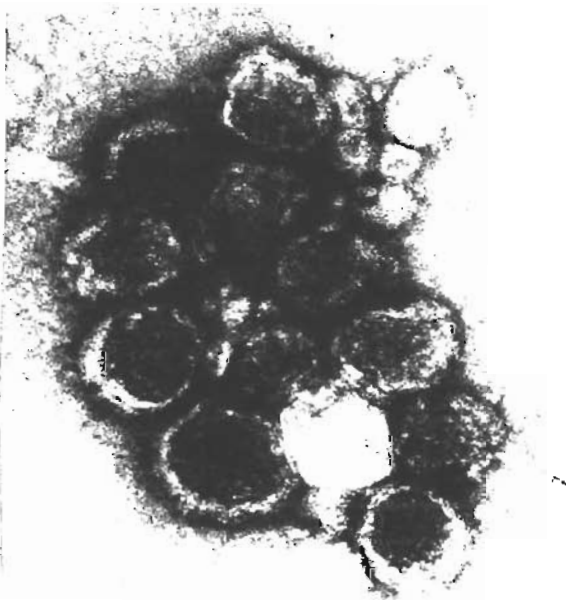
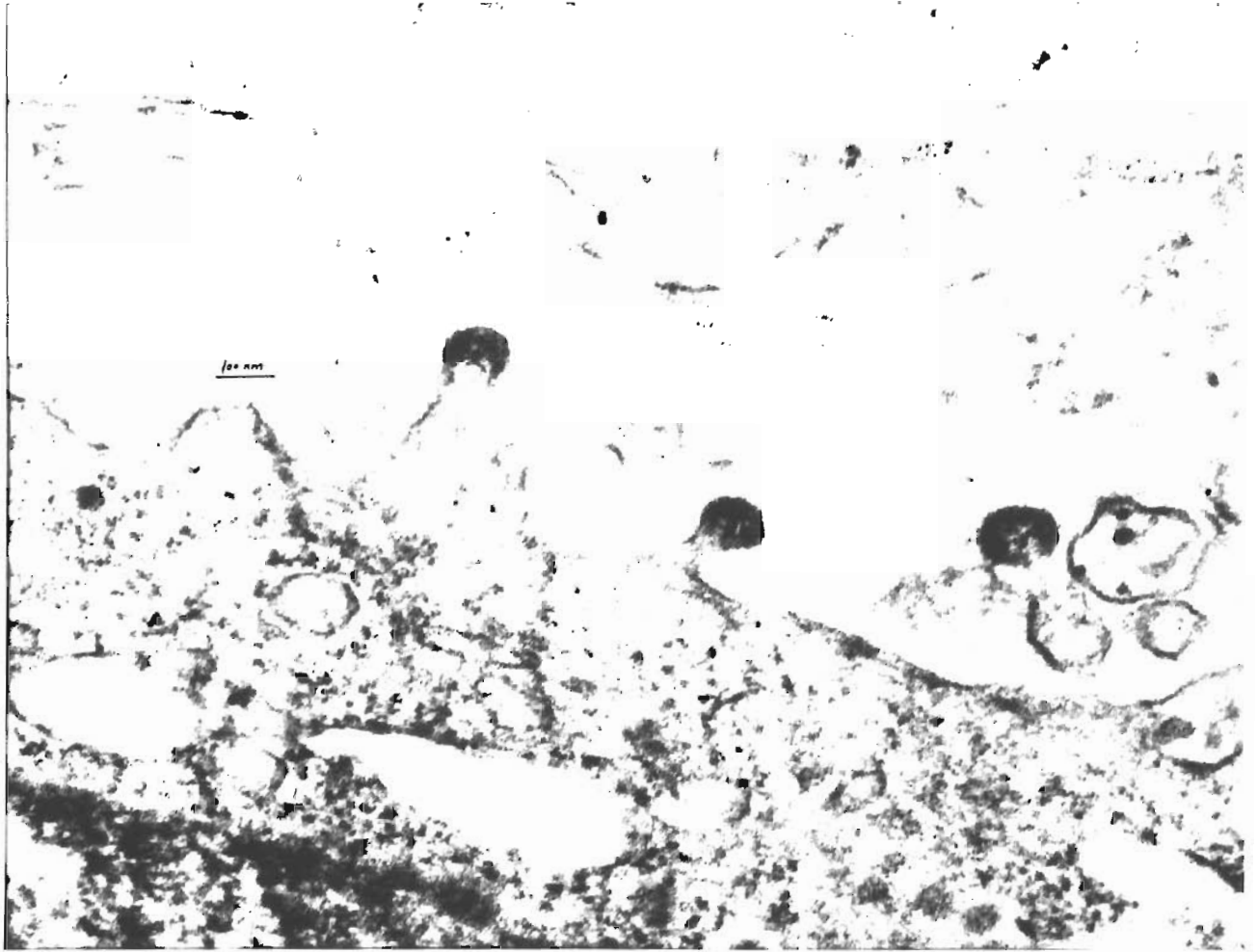
A. Coupes fines de cellules infectées: le virus bourgeonne à partir de la membrane cellulaire (a) puis se retrouve libre dans les espaces ergastoplasmiques (b) ou extracellulaire (c).

B. On observe dans le cytoplasme cellulaire des amas de matériel viral avec une grande concentration ribosomique (d).

C. Les particules virales ont été concentrés sur gradient de Tartrate / Glycerol puis de Sucrose le culot d'ultracentrifugation des particules purifiées a été directement fixé et coloré dans l'acide osmique. Les particules n'ont été que partiellement pénétrées par le milieu de contraste, la nature membraneuse de l'enveloppe se remarque mais les détails internes ne sont pas visibles. x86.000.

A

C I B
I



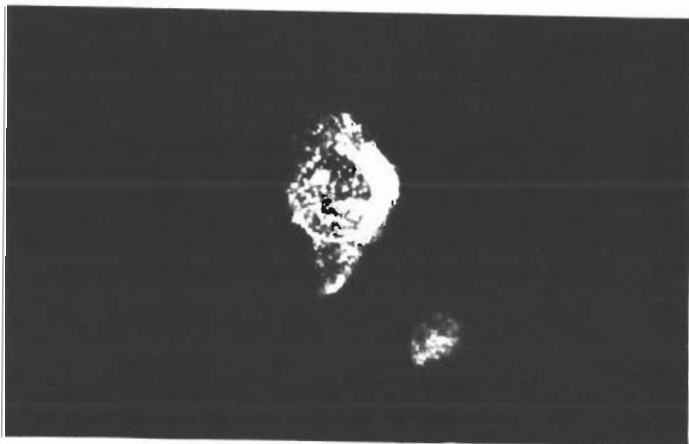
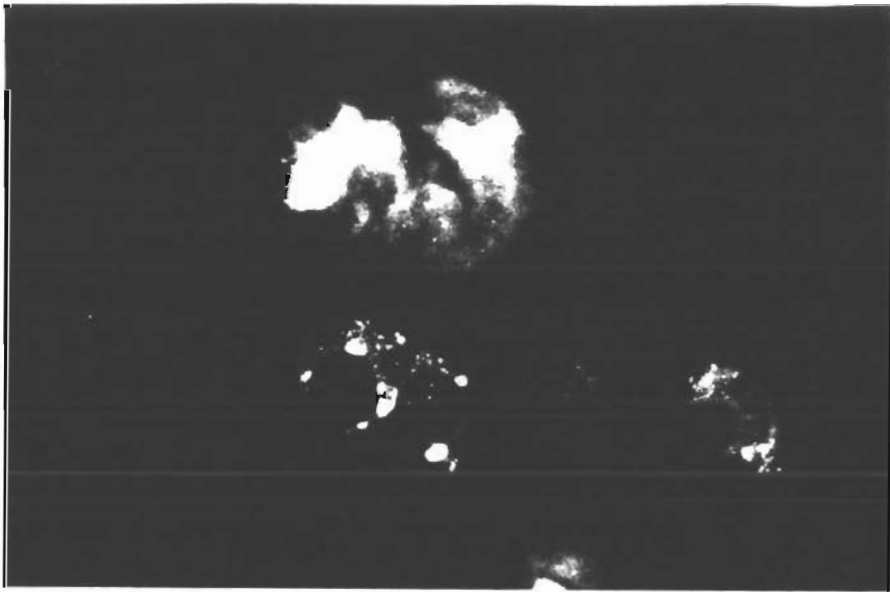
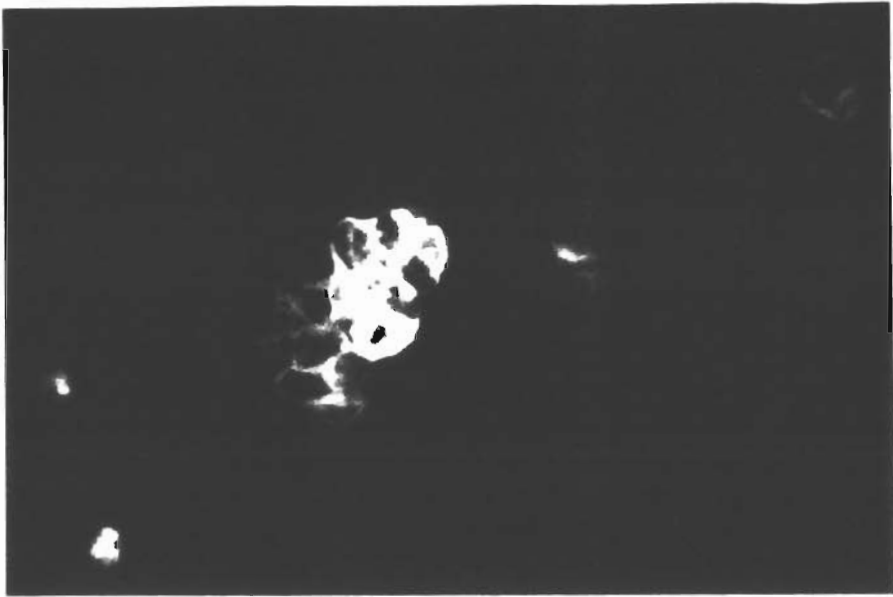
3.4.2. Immunofluorescence indirecte

Dans le cas du virus Mobala, la morphologie des inclusions virales observées dans les cellules infectées peut revêtir plusieurs aspects stéréotypés. L'antigène viral intracellulaire révélé par la réaction d'immunofluorescence indirecte se présente dans la plupart des cas sous forme d'un semis de points finement dispersés dans le cytoplasme. On peut aussi observer des inclusions intracellulaires plus grosses de 1 à 3 µm. Enfin on observe des cellules avec une coloration diffuse du cytoplasme pouvant donner un aspect en anneau. Des expériences préalables ont pu montrer que ce type de fluorescence pouvait être dû à une liaison d'anticorps spécifiques des antigènes viraux glycoprotéiniques de surface [Buchmeier et Oldstone, 1981] (Figure 10)

La morphologie observée à type d'inclusions granulaires et de points finement dispersés dans le cytoplasme, se retrouve chez les trois virus étudiés et ne permet pas de les distinguer entre eux.

FIGURE 10: Inclusions virales intracellulaires dans les cellules Vero infectées par le virus Mobala en immunofluorescence indirecte : Une culture infectée de 5 jours a été utilisée, un sérum humain de convalescent de fièvre de Lassa a fourni le système anticorps spécifique de ces inclusions.

- a. Inclusions en goutte de cire de taille de 1 à 2µm
- b. Inclusion de type "sableuse"
- c. Fluorescence périphérique et diffuse dans la cellule



3.4.3. Protéines de structure

L'étude des protéines virales concerne plus particulièrement les protéines structurales des souches clonées des virus Lassa "J" LpA3, Mopeia MpA3 et Mobala A11. Ce travail avait pour but de mettre en évidence des différences entre les protéines pouvant être éventuellement rapportées aux variations d'antigénicité observées. Deux approches ont pu être faites, l'une par analyse électrophorétique des protéines l'autre par immunoprécipitation suivie d'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide:

Les protéines de structure des 3 virus étudiés dénaturées sous l'action d'un détergent (SDS), sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Un marqueur contenant des protéines standard de poids moléculaires connus a été utilisé afin de pouvoir en

déduire le poids moléculaire des protéines virales (Figure 11). La coloration au bleu de Coomassie met en évidence pour chaque type de virus la présence d'une nucléoprotéine (NP), d'une glycoprotéine (G2) et en faible quantité une glycoprotéine (G1) de poids moléculaire différent de G2. La glycoprotéine G1 est souvent absente des préparations ou bien présente en faible quantité.

Les protéines majeures du virus Mobala sont semblables à celles rapportées pour les autres arénavirus avec la NP et la G2 comme espèces protéiniques les mieux représentées [Pedersen, 1979]; Dans les cellules infectées et après extraction des protéines on met en évidence un précurseur des glycoprotéines (GPC) (Tableau 11). Si les poids moléculaires ne diffèrent guère des valeurs classiques observées pour cette famille de virus, nous avons pu démontrer [Gonzalez et coll., 1983], puis Clegg et Lloyd [1983] après nous, qu'il existait des différences de migration reproductibles dans l'électrophorogramme des différentes souches testées (Figure 11). Cela a pu être mis en évidence de façon particulièrement marquée pour la nucléoprotéine des virus Lassa, Mopeia et Lassa Pinneo. Nous avons réalisé de nombreux électrophorogrammes et obtenu toujours les mêmes résultats, soit la séquence d'organisation en poids moléculaires des nucléoprotéines les plus lourdes aux plus légères: Mopeia, Mobala, Lassa humain de Sierra Leone, Lassa de Mastomys de Sierra Leone, Lassa du Nigeria (Figure 12). Clegg et Lloyd ont pu montrer que ces particularités se retrouvaient au niveau des glycoprotéines de

plusieurs arenavirus d'Afrique. Si ces différences sont réelles, elles ne pourront toutefois pas servir de marqueur pour l'identification de souches ou un suivi épidémiologique en raison de la quasi impossibilité de standardisation de différences aussi minimes dans les techniques utilisées. Toutefois ce type de variations minimes mais constantes entre les souches est le témoin d'un changement d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence des polypeptides et par conséquent de modifications au niveau du code génétique.

Afin de comparer plus avant les protéines de ces virions, des cartes oligopeptidiques ont pu être réalisées dans les laboratoires du Dr Buchmeier (Scripps Clinic, Cal.) par digestion des protéines G2 et NP [Gonzalez et coll., 1984]. Les préparations virales ne contenaient pas assez de G1 pour en faire les cartes. Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences nous avons d'une part fait migrer individuellement les polypeptides puis réalisé des composites du même polypeptide digéré de différentes souches; ainsi il a été possible de voir se superposer les oligo-polypeptides communs et distinguer aisément les uniques. Les cartes analysées montrent un haut degré d'identité entre les souches Mopeia et Mobala et des oligo-polypeptides des trois souches Lassa, Mopeia et Mobala. Ceci est en accord quantitativement avec les observations faites en utilisant les anticorps monoclonaux pour lesquels le rapport du nombre en commun au nombre de monovalents ou bivalents est grand [Gonzalez et coll., 1983; McCormick et coll. non publié]

Figure 11: Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines virales de structure

Les échantillons de protéines purifiées des virions (LAS = Lassa, MOP = Mopeia; MOB = Mobala) sont préparés dans une solution à 2% de sulfate de dodecyl sodium, 5% de 2-mercapto éthanol et chauffés 3 min à 100°C avant électrophorèse. Les gels sont colorés au bleu Brillant de Coomassie à 0,2% en acide acétique et méthanol.

a. Les poids moléculaires des protéines du marqueur de la colonne de droite se distribuent comme suit: 200 000 (myosine), 92 500 (Phosphorylase B), 68 000 (sérum albumine bovine), 43 000 (ovalbumine), 25 700 (alpha-chymotrypsinogène) et 18 400 (beta-lactoglobuline).

b. Dans la colonne de gauche un composite de migration des virus Lassa et Mopéia (protéines pures dans les colonnes 2 et 3) démontrent nettement l'écart séparant les deux NP après 16 heures de migration sous une tension de 60 volts. (avec l'autorisation de M.P. KILEY et coll., 1983, non publié).

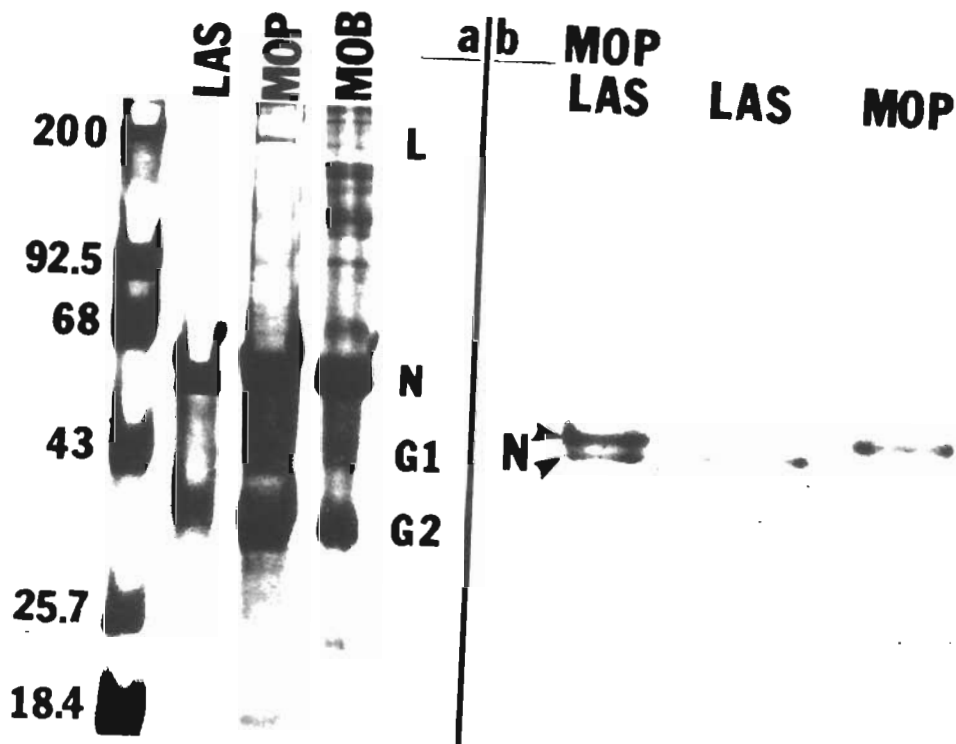


FIGURE12: Electrophorégramme comparatif en gel de polyacrylamide des nucléoprotéines de plusieurs souches d'arénavirus d'Afrique

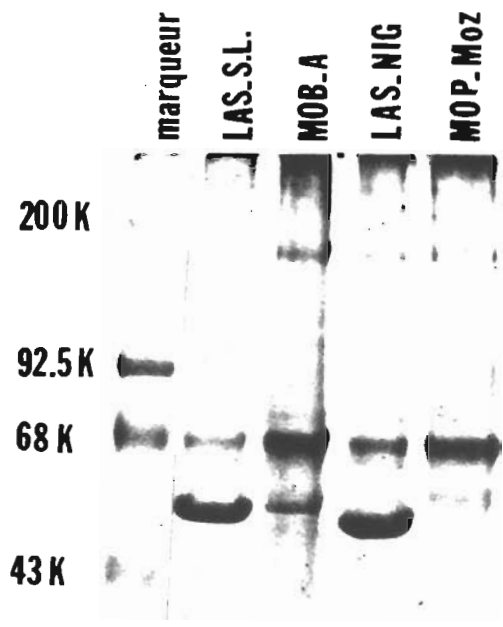
L= Lassa de Sierra Leone souche humaine

Mb= Virus Mobala de R.C.A.

Mp= Virus Mopeia du Mozambique

LN= Lassa "Pinneo", souche humaine du Nigeria

LM= Lassa souche de Mastomys de Sierra Leone



25.7 K

18.4 K

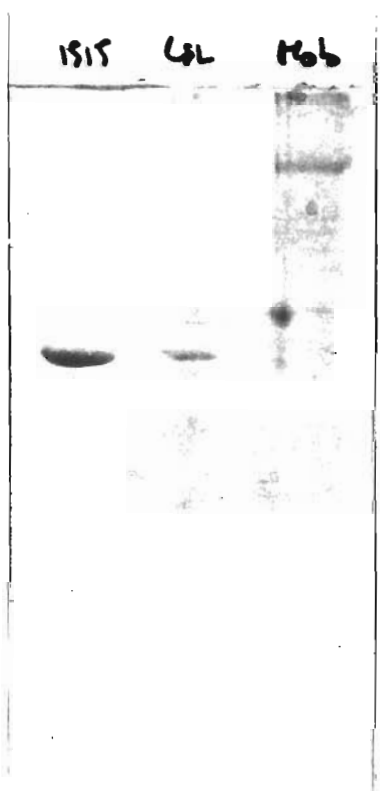


TABLEAU 10: POIDS MOLECULAIRES COMPARES DES PROTEINES STRUCTURALES
DES ARENAVIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA (PMx10³)

Souche virale	PROTEINES									
	virales (1)				intracellulaires (2)					
	L(3)	N	G1	G2	L	GPC	N	G1	G2	X
LAS "Josiah"	180	60	45	38	-	71	60	45	35	17,5
MOP "Moz"	180	61	48	35	-	71	61	48	31	21
MOB A11	180	60	48	37	-	-	69	59	45	19
CML (4)	200	63	44	35						

(1) Protéines obtenues à partir de virion purifié

(2) Protéines obtenues à partir d'extraits du cytosol cellulaire (Culture Vero E6).

(3) L=Large, N=nucléoprotéine, G1=glycoprotéine 1, G2=Glycoprotéine 2, GPC=précurseur de la glycoprotéine, X=protéine de faible poids moléculaire non identifiée probablement produit de dégradation de la nucléocapside.

(4) Bruns et coll., 1983.

L'immunoprécipitation en gel de polyacrylamide:

Cette technique nous a permis de localiser les sites antigéniques mis en jeu par les anticorps monoclonaux et les sérums polyclonaux sur les différentes espèces de protéines structurales des virus Lassa, Mopeia et Mobala (Figure 13). Les anticorps monoclonaux nous ont aussi permis de rapprocher la protéine GPC des glycoprotéines GP1 et GP2 par la présence d'un même épitope chez ces différentes protéines et de cautionner le fait que GPC serait la protéine dimérique précurseur des glycoprotéines (Figure 14). Tout d'abord le marquage à la glucosamine tritiée confirme pour les colonnes de migration 3 à 8 la qualité glycosylée des protéines GPC et G2 des virus Lassa et Mopeia; on distingue clairement sur cet électrophorégramme sur les colonnes 5 à 8 et pour chacun des deux virus, un transfert de la radioactivité de GPC sur G2, ce qui confirme GPC comme précurseur de G2. Enfin la dernière colonne à droite affirme le caractère glycosylé de G1 et sa communauté antigénique avec GPC.

La combinaison de cette technique et l'usage des anticorps monoclonaux a été pour la première fois utilisée de façon aussi large pour ce groupe viral; McCormick et coll., [1984, non publié] travaillent à cartographier les sites de réponse antigénique sur les protéines de structure de ces virus dans le but d'identifier le rôle immunogénique de ces sites d'une part, et d'autre part de définir un anticorps monoclonal pouvant agir sur la réplication du virus et jouer un rôle neutralisant. La découverte d'un tel monocloné pourrait permettre la réalisation de colonnes d'affinité afin de purifier la fraction protéinique

candidate alors, à la préparation d'un vaccin.

La cinétique d'apparition des protéines structurales majeures a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de la NC et de la G2 par la méthode d'IFI (Tableau 12). L'accumulation des produits nucleocapsidiques se fait rapidement de la 11^{ème} à la 86^{ème} heure après inoculation aux cultures cellulaires. La production de G2 semble n'être importante qu'au bout de 38 heures et ne s'accumuler dans le milieu intracellulaire que progressivement. Le relargage de particules virales infectantes se fait progressivement pour subir un accroissement net au moment où les protéines structurales s'accumulent en quantité suffisante dans les cellules (à partir de la 38^{ème} heure). Parallèlement l'immunoprécipitation par un sérum de hamster hyperimmun anti Mopeia, nous a permis de suivre l'apparition des protéines virales des virus Lassa, Mopeia et Mobala après électrophorèse en gel de PA (Figure 15). Cette expérience confirme l'apparition de la NP entre 11 et 19 heures après inoculation ainsi que celle du précurseur GPC. Puis entre 19 et 38 heures p.i. la production s'accroît pour diminuer entre 38 et 62 heures p.i. pour le virus Lassa, 62 à 86 heures pour le virus Mopeia, et se maintenir pour le virus Mobala.

On est en droit de penser que dès l'infection il y a production de particules virales infectantes qui vont coloniser les cellules saines puis progressivement la machinerie enzymatique de la cellule produit en grandes quantités les protéines virales pour atteindre un optimum. On sait que cet

optimum existe en raison des observations antérieures montrant l'apparition de particules défectives interférentes [Kiley et coll., 1983, comm. pers.].

TABLEAU 12: CINETIQUE D'APPARITION DES PROTEINES VIRALES
INTRACELLULAIRES DU VIRUS MOBALA EN
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

Heures après inoculation	IFI		Titre (1) du surnageant
	Mab/NC (2)	Mab/G2 (3)	
11	0,0 (4)	0,0	2,3
19	15,3	0,0	2,7
38	21,6	9,6	4,1
62	59,7	25,7	5,6
86	100,0	52,7	6,0

(1) UFP=Unités Formant Plages

(2) Mab/NC:Anticorps monoclonal anti nucléocapside (52.54.6)

(3) Mab/G2:Anticorps monoclonal anti Glycoprotéine 2 (52.85.6)

(4) Pourcentage de cellules fluorescentes.

FIGURE 13: Immunoprécipitation en gel de polyacrylamide des protéines virales marquées à la méthionine radio-active, vis à vis de différents anticorps monoclonaux

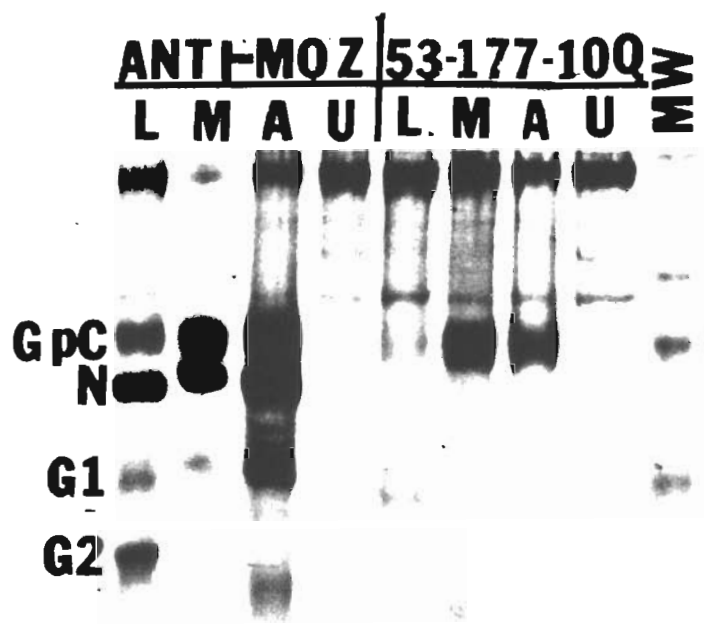
Les cellules Vero infectées avec les virus Lassa (L), Mopeia (M) et Mobala (A) sont marquées 35 heures après infection à la méthionine radioactive (^{35}S) et récoltées 20 heures après le marquage pour en extraire les protéines (U= témoin cellules non infectées). Après incubation, les complexes antigène-anticorps formés sont séparés des immunoglobulines et des antigènes libres par fixation non spécifique par la protéine A du staphylocoque. Les complexes ainsi isolés sont visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une autoradiographie.

Les 4 premières colonnes de migration sont occupées par les protéines virales totales qui servent de marqueurs.

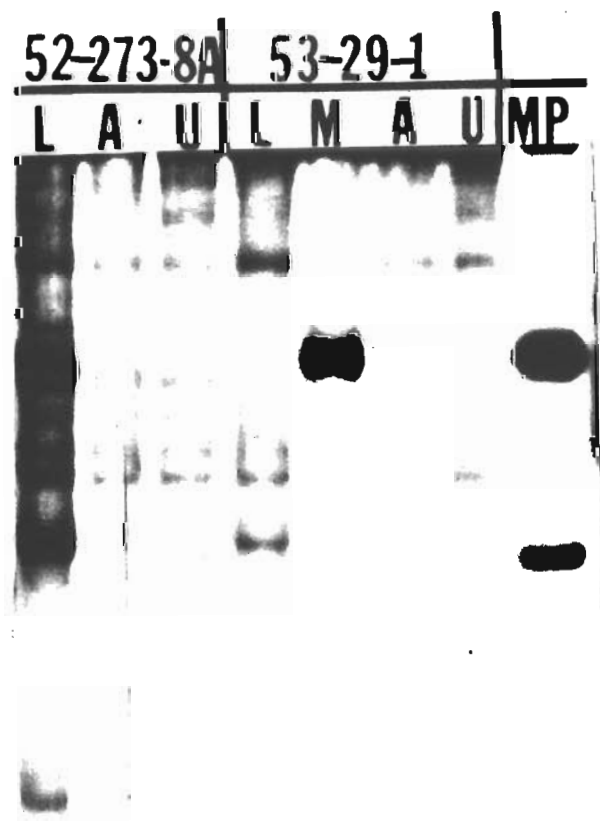
MW = marqueur de protéines standards marquées au ^{14}C (cf.fig.11).

MP = Virus Mopéia utilisé comme marqueur

Anticorps monoclonal	Spécificité virale			Spécificité de protéine
	LAS	MOP	MOB	
53.177.100	-	+	+	G2, GPC
52.93.4	+	+	+	N
52.85.6	+	+	+	G2, GPC
52.273.8A	+	-	-	N
53.29.1	-	+	-	N



X



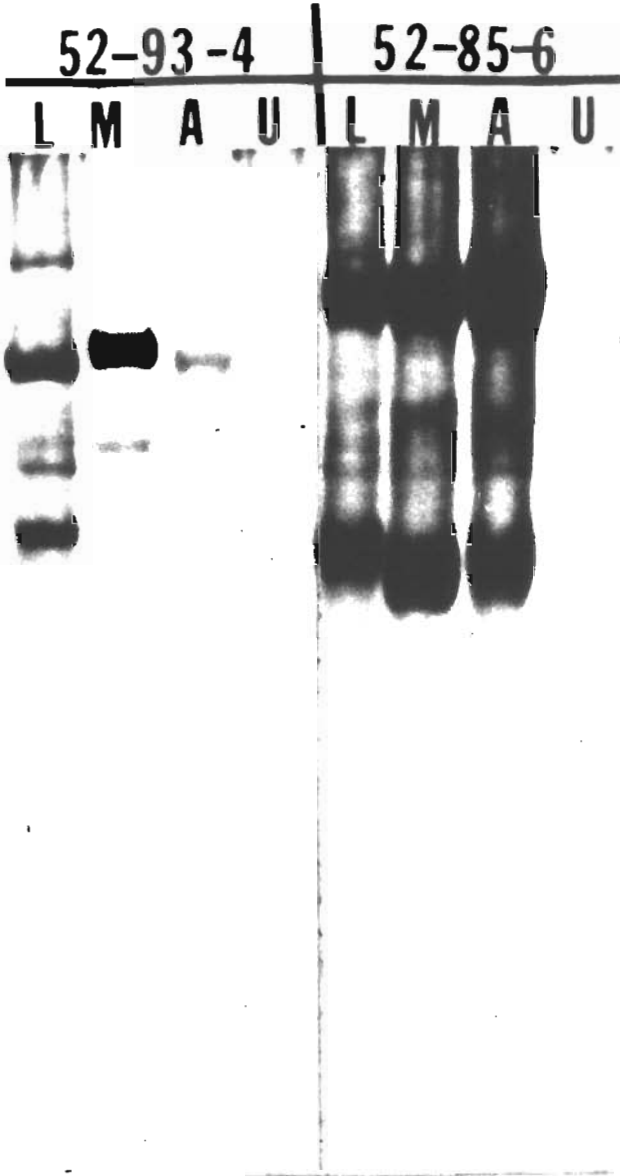


FIGURE 14: Expérience de pulse-chase par immunoprécipitation et emploi d'anticorps monoclonaux

Le principe de cette expérience est de suivre le devenir des protéines préformées GPC.

a. Les cellules infectées par le virus Mopeia sont marquées de la même façon que dans l'expérience précédente (Fig.13). Au temps = 0, c'est à dire deux heures après le marquage, une partie du tapis cellulaire est récoltée. Le reste est laissé à incuber en présence de la méthionine froide concentrée 10 fois par rapport à la concentration lors du marquage. Deux récoltes sont ensuite faites à 6 heures et 18 heures du temps 0. Les extraits protéiniques des cellules infectées sont précipités avec un monoclonal anti G2 (52.85.6) avant électrophorèse sur gel de PA.

b. Sur le même principe, mais en utilisant cette fois-ci la glucosamine tritiée comme acide aminé radio-actif, le devenir du précurseur GPC est suivi parallèlement pour les virus Lassa et Mopeia.

LPN et LCN = Contrôles Lassa + sérums de hamster anti Mopeia.

H = Glucosamine*

L = Lassa

M = Mopeia

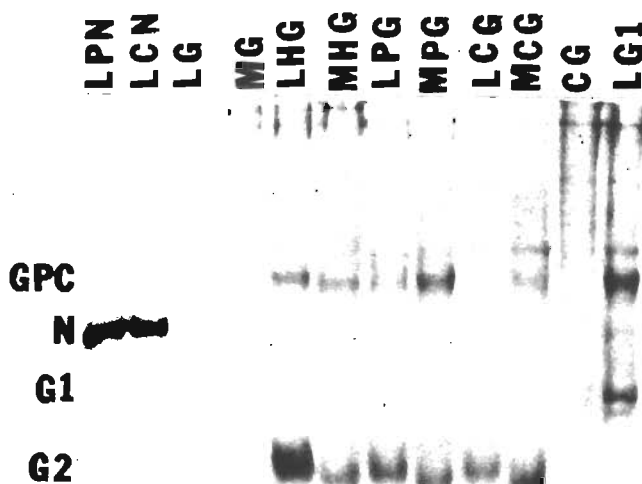
C = Contrôle cellules non infectées

F = Pulse

C = Chase

G = anti G2 (52.58.6)

G1 = anti G1 (52.74.A).



3.4.4. Acide ribonucléique

Analyse de la nucléocapside:

Un gradient de centrifugation en chlorure de césium a permis de déterminer la densité des nucléocapsides des trois virus étudiés. Ces densités sont proches de celles déjà décrites pour les autres membres du groupe des arénavirus (Figure 16).

Il existe chez les arénavirus deux nucléocapsides correspondant, l'une aux segments d'ARN viraux associés à des protéines, l'autre à l'ARN ribosomal associé à des protéines. Dans le type d'expérience que nous avons fait la nucléocapside liée aux ARN viraux a été mise en évidence. Après action d'un détergent en présence de sel (Pedersen et Königshofer, 1976) on peut séparer les deux nucléocapsides virales liées aux deux espèces d'ARN. Les nucléocapsides isolées pour les virus Lassa, Mopeia et Mobala sédimentent respectivement à 1,25, 1,13 et 1,32 gm/cm³, avec 95% de protéines associées.

L'analyse de la nucléocapside des arénavirus d'Afrique montre une grande similitude avec celle des arénavirus du Nouveau Monde et les classe définitivement dans les virus à ARN négatif.

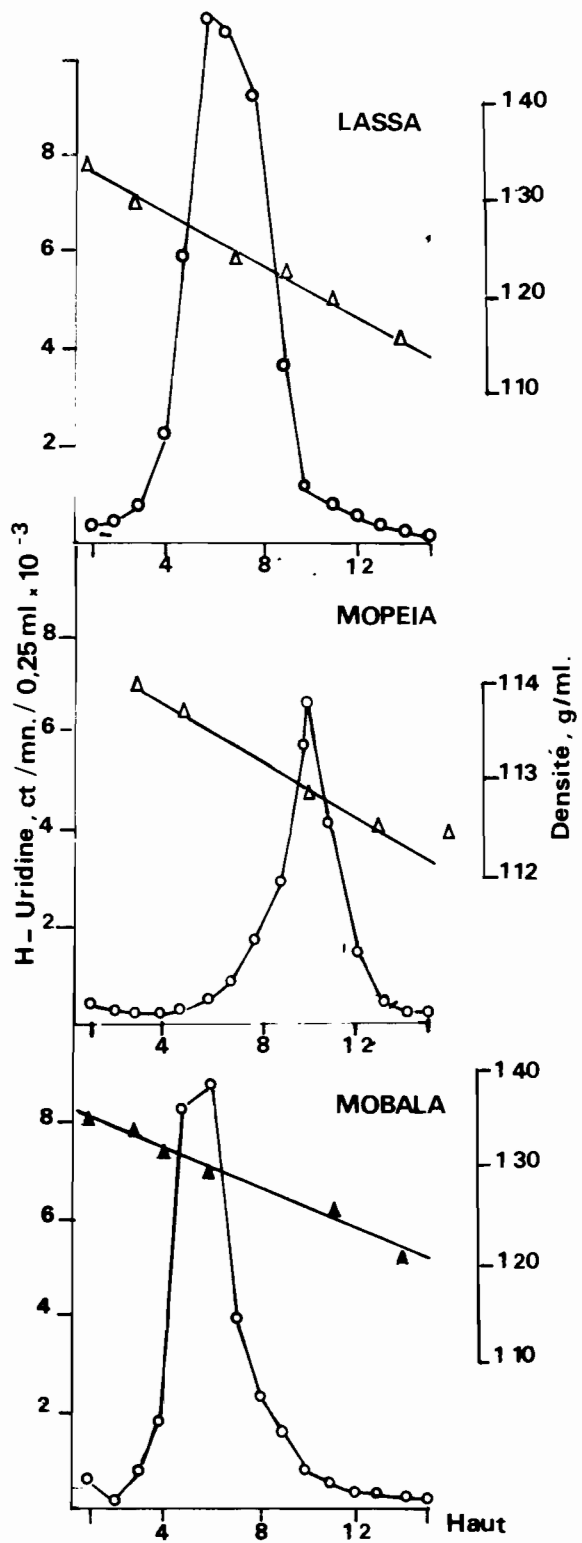
Densité de la nucléocapside de quelques arénavirus

virus	densité en chlorure de césium
MLC (1)	1,32
Lassa	1,25
Mopeia	1,13
Mobala (2)	1,32
Pichinde (3)	1,31-1,37
Tamiami (4)	1,36
Tacaribe (5)	1,31-1,33

- (1) Pedersen and Königshöfer, 1976; Buchmeier et coll., 1978.
- (2) Gonzalez et coll., 1984
- (3) Ramos et coll., 1972; Farber and Rawls, 1975; Vezza et coll., 1977.
- (4) Gard et coll., 1977.
- (5) Palmer et coll., 1976; Gard et coll., 1977.

FIGURE 17: Densité de la nucléocapside sur gradient de chlorure de césium

Le virus purifié traité au Nonidet-P40 (NP-40) est centrifugé à l'équilibre sur un gradient linéaire de Chlorure de Césium. Le virus purifié a été marqué à l'Uridine tritiée et incubé avec du NP-40 (2%v/v 15 min à 4°C). Le mélange a été déposé sur un gradient préformé de ClCs (1,17 à 1,36g/ml) dans du tampon TNE et centrifugé à 40 000 tpm pendant 20 heures à 4°C dans un rotor Beckman SW 50.1. Les fractions sont collectées par le fond du tube et pesées pour déterminer leur densité. La radioactivité de chaque fraction a été mesurée sur 0,025ml additionnés d'un liquide à scintillation (Aquasol) et passée au compteur à scintillation gamma.



Résolution des segments d'ARN:

L'ARN dénaturé des virus Mobala et Mopeia par action du glioxal montre après électrophorèse sur gel d'agarose, le même type de distribution des pics de radio-activité correspondant aux espèces d'ARN connues pour les arénavirus. Par référence à l'ARN ribosomal (18s et 28s) on distingue un grand (L) et un petit (S) ARN viraux. Etant donné la dénaturation des brins d'ARN nous avons pu calculer par la méthode graphique préconisée par McMaster et Carmichael [1977], les poids moléculaires respectifs des ARN viraux. Il sont similaires aux poids moléculaires des ARN extraits des autres arénavirus (Figure 17).

Poids moléculaires des ARN de quelques arénavirus

Virus	ARN	
	Large (L)	Small (S)
LCM (1)	2,1	1,1
Lassa (2)	2,2	1,3
Mopeia	2,1	1,4
Mobala (3)	2,1	1,2
Machupo (2)	2,2	1,3
Pichinde (4)	2,1	1,1
Junin (3)	2,4	1,34

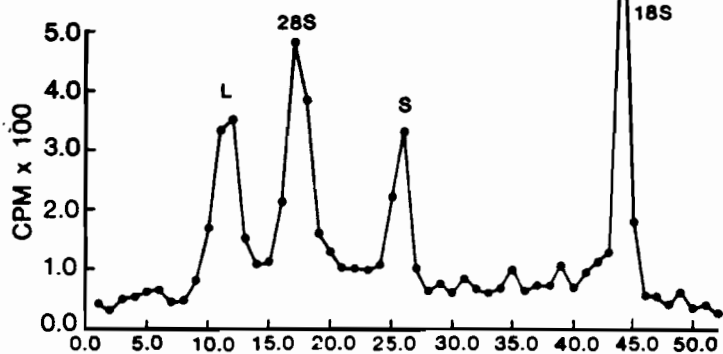
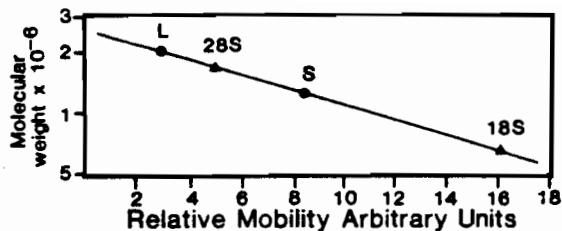
(1) Pedersen, 1971 [in Pedersen, 1973a]

(2) Lukashevitch et coll. [1984]

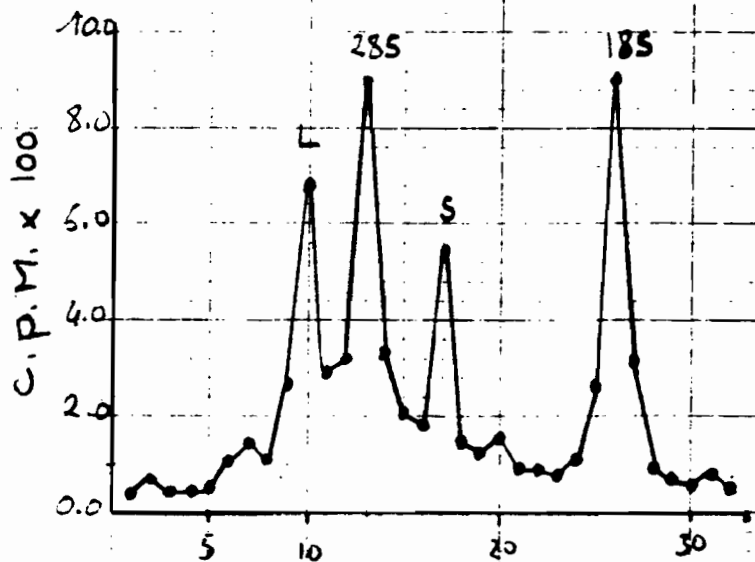
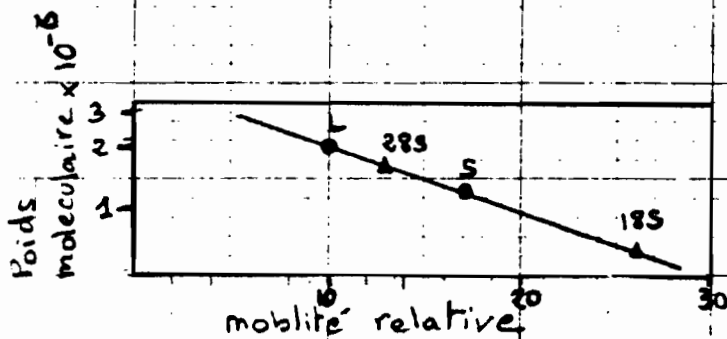
(3) Gonzalez et coll. [1984]

(4) Carter et coll. [1973]

(5) Anon et coll., 1976 [in Pedersen, 1973a]



MOBALA



MOPEIA

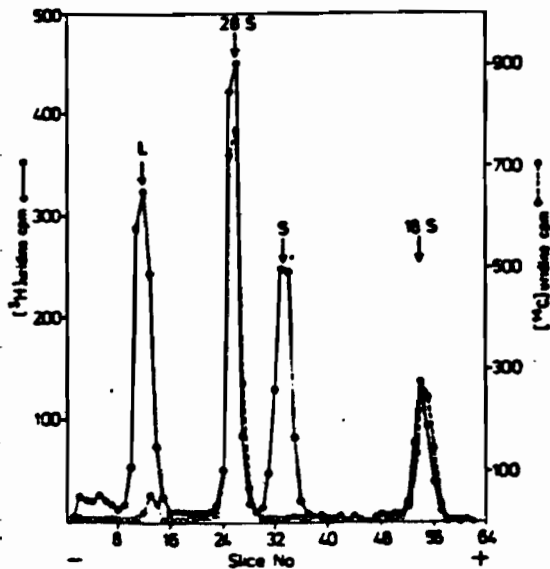


Fig 18

Schéma provisoire

FIGURE 19: Résolution des ARNs des virus Mobala et Mopeia par dénaturation au glioxal puis électrophorèse sur gel d'agarose

Les virus ont été marqués à l'Uridine tritiée lors de la croissance en cultures cellulaires de type Vero. Les ARNs sont extraits par le phénol à partir de préparation de virus purifiés par deux gradient de centrifugation (Glycerol/tartrate; Sucrose). La dénaturation des ARN se fait dans un tampon PO_4 molaire à volume égal avec une solution de Glioxal 6,9M (Glioxal, PO_4 30mM à v/v DMSO) pendant 1 heure à 50°C . Puis l'électrophorèse est faite sur un gel d'agarose à 1,8% pendant 2 heures sous une tension de 100 volts.

3.5. Caractéristiques biologiques des virus Lassa, Mopeia et Mobala

3.5.1. Inoculations aux cultures cellulaires

La lignée cellulaire Vero E6 a été reconnue pour permettre une bonne répllication du virus Lassa [Johnson et coll, 1981b] et les expériences diverses que nous avons faites ont toujours confirmé cette donnée. En revanche la lignée BHK21 reconnue pour son bon rendement avec les virus du groupe Tacaribe ne donne pas les titres en particules infectantes espérés avec les souches africaines (Figure 19). De plus la lignée Vero nous a permis d'obtenir un effet cytopathique pour certaines souches. Cet effet cytopathique a toujours été mis en évidence avec les souches clonées des virus Lassa et Mopeia, et dans certaines conditions avec les souches clonées du virus Mobala (Figure 20A - Tableau 13).

Méthode des plages:

Après deux passages sur cellules Vero de la souche sauvage Mobala 3076 deux types de plages sont apparus et par la technique de repiquage de plage plusieurs clones ont pu être isolés. Deux de ces clones ont été étudiés: les clones dérivés du type "A", donnent un effet cytopathique avec des cellules fusiformes réfringentes puis une lyse du tapis cellulaire; les clones du type "B" ne donnent pas de transformation majeure des

cellules et l'ECP n'est détectable qu'après addition du rouge neutre en phase solide (Figure 20B). Dans le cas des clones de type "B" le tapis cellulaire semble présenter une densité plus importante de syncytia cellulaires. Deux clones A11 et B21 testés avec une batterie d'anticorps monoclonaux ont conservé un profil identique à la souche sauvage; ceci est en accord avec les observations faites sur le virus Pichinde chez lequel Leung [1981] a pu démontrer que la morphologie des plages était liée à l'ARN L alors que les protéines de structures, donc antigéniques sont liées à l'ARN S.

En ce qui concerne la courbe de croissance des trois souches virales en cultures cellulaires Vero, elle présente pour les trois souches une allure assez proche (Figure 21). On note toutefois la présence d'un pic vers le 4ème jour p.i. pour le virus Mobala, tandis que les virus Lassa et Mopeia ont tendance à montrer un plateau respectivement du 2ème au 8ème et du 5ème au 9ème jours p.i.. Ces observations s'accordent avec les résultats donnés par Kiley et coll.[1981] lors des études comparatives princeps sur les virus de Lassa et Mobala.

Il est remarquable de constater que les arénavirus ne donnent généralement pas d'effet cytopathique en culture de cellules et encore moins une lyse du tapis cellulaire; Cela pourrait être lié au pouvoir d'infection chronique que possèdent ces virus. En ce qui concerne le virus Mobala (Souche sauvage MOB3200) nous avons pu maintenir pendant plus de 6 mois, date à laquelle nous avons cessé l'expérience, une infection chronique d'une culture de cellules Vero. Tous les 10 jours le tapis

cellulaire était lavé avec du milieu neuf EMEM, trypsiné et 1/8 du tapis repiqué dans un nouveau flacon de croissance en présence de EMEM à 10% de sérum de veau foetal. Les cellules ont été contrôlées chaque fois pour la présence d'antigènes fluorescents puis au bout de 6 mois en microscopie électronique pour la présence de particules virales intracellulaires. Aucun effet cytopathique n'a pu être observé, l'antigène a toujours été mis en évidence par IFI, la microscopie électronique a montré des particules virales en faible densité et des inclusions intracellulaires de protéines virales en grand nombre(?).

Le virus Mobala semble comme la plupart des arénavirus démontrer peu ou pas d'effet cytopathique en cultures cellulaires et posséder le pouvoir d'infection chronique de lignées. Dans cette optique de passage sur lignées cellulaires nous avons pu à partir d'un broyat d'organe initial infecter des cellules de type parfaitement testé pour leur absence de tout germe pathogène pour l'Homme, cela pourrait permettre éventuellement la préparation d'un vaccin avec le virus Mobala dans les conditions de sécurité requise par la loi (Cette culture est déposée à l'ATCC et à l'USAMRIID de Fort Detrick, USA).

TABLEAU 13: MORPHOLOGIE DES PLAGES OBTENUES APRES CROISSANCE DE PLUSIEURS SOUCHES D'ARENAVIRUS SUR CULTURES CELLULAIRES DE TYPE VERD E6

Souche	Pays d'origine	Diamètre moyen des plages (mm)	Cytolyse
MOB3076A11	R.C.A.	1,5	+
MOB3076B21	R.C.A.	3,0	-
LAS "Josiah" Lp3	Sierra leone	1,2	+
LAS1515 (Mast.)	Sierra leone	1,0	+
LAS "Fofana"	Sierra leone	1,0	-
LAS "Borbor"	GUINEE?	1,2	-
LAS "Zorzor"	Liberia	1,4	-
LAS "Pinneo"	Nigeria	1,4	+
LAS 803794	Liberia	0,5	-

TABEAU 14: ANALYSE COMPARATIVE DE LA REPLICATION DES VIRUS
LASSA, MOPEIA ET MOBALA SUR CULTURES CELLULAIRES DE TYPE VERO PAR
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI) ET METHODE DES PLAGES

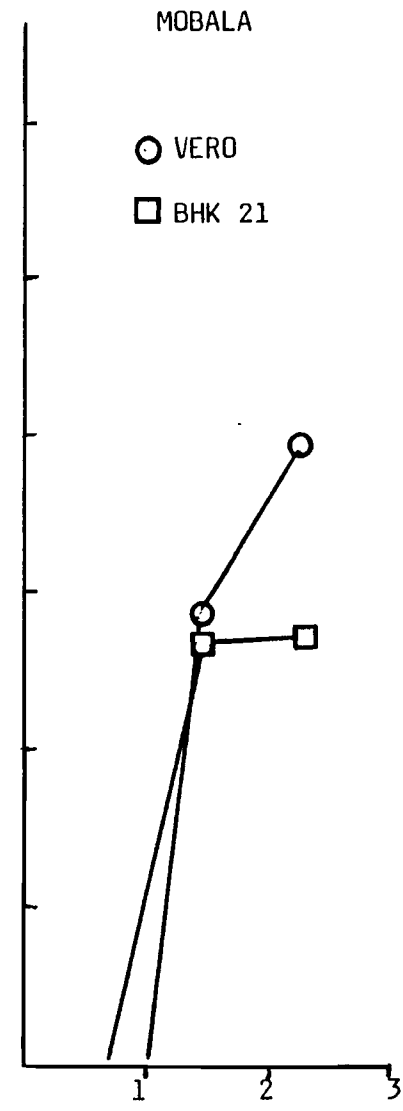
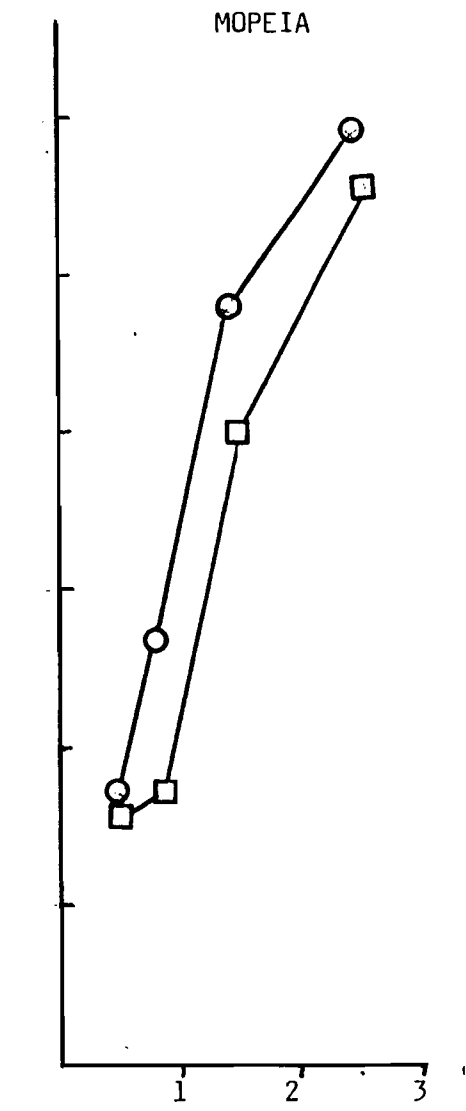
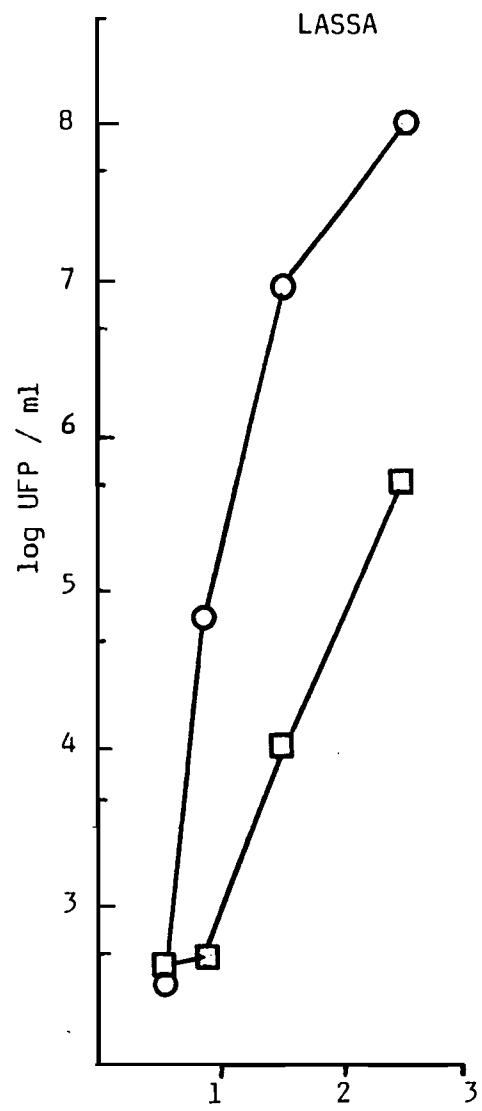
Heures après infection	LAS		MOP		MOB	
	UFP*	IFI**	UFP	IFI	UFP	IFI
11	3,5	0,0	2,3	0,0	3,6	0,0
19	3,9	4,5	2,7	19,3	3,8	15,3
38	5,2	7,2	4,1	33,3	5,3	21,6
62	6,9	45,3	5,6	67,9	6,5	59,7
86	7,3	51,8	6,0	70,0	6,9	100,0

* log des Unités Formant Plage par ml

** Pourcentages de cellules fluorescentes (anticorps polyclonaux).

19
**Figure 20: COURBES DE CROISSANCE DES VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA
EN CULTURES CELLULAIRES DE TYPES VERO ET BHK21**

Un tapis confluent de cellules Vero E6 et BHK21 est inoculé en boîtes plastiques à vis (Falcon 75cm²) à faible taux d'infectivité (1UFP/10 cellules) Après un contact de 1 heure à 36,5°C le tapis cellulaire est nourri avec 5 ml de milieu de survie EMEM. Un prélèvement du surnageant de culture est fait 9,16,32 et 60 heures p.i.. Le titrage de ce surnageant est réalisé sur des plaques à 6 trous (Limbro) par la méthode des plages en double couche de gélose.



Nombre de jours post inoculation

Figure 20: MORPHOLOGIE DES PLAGES DES VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA

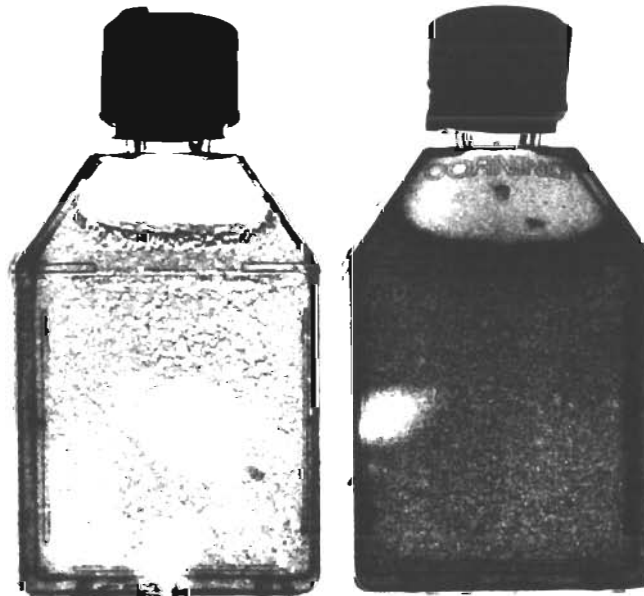
Le tapis cellulaire confluent est infecté par 0,1ml d'une suspension virale ajustée selon le titre de la suspension de virus originale pour obtenir une bonne séparation des clones viraux à observer. Après incubation 1 heure à 36,5°C, l'inoculum est rejeté et la première couche d'agar Noble en milieu EMEM coulée. 3 jours après, la seconde couche d'agar additionné de rouge neutre est coulée et la lecture se fait à 24 et 48 heures après.



MOB

LAS

MOP

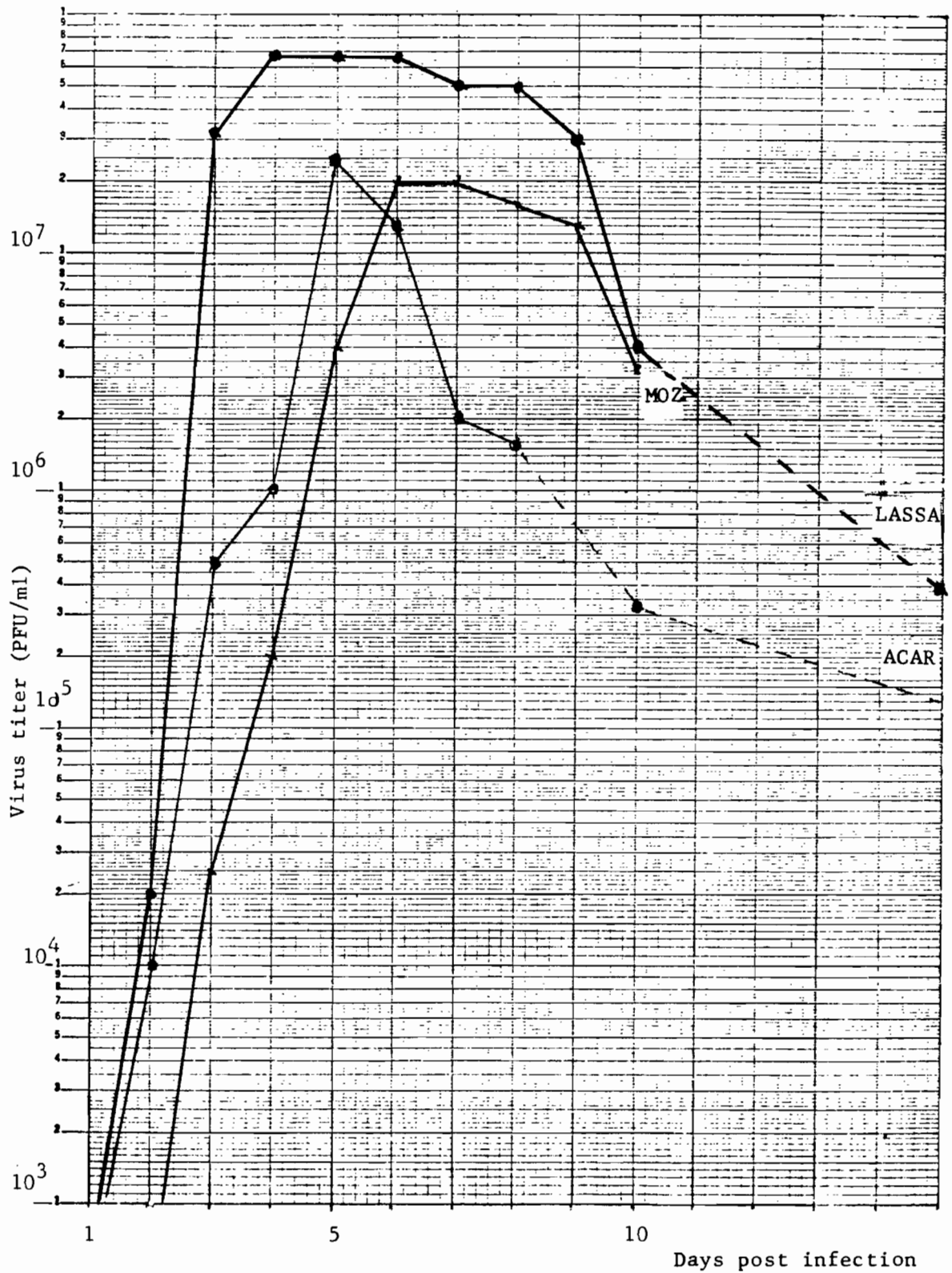


MOB A11

MOB B21

Figure 21: Courbes de croissance en cultures cellulaires de type Vero E6 des virus Lassa, Mopeia et Mobala:

La technique utilisée est la même que précédemment (Fig.19) mais le surnageant de culture a été testé jusqu'à 10 jours p.i., quand le tapis cellulaire trop âgé commençait à perdre son pouvoir d'adhérence sur la surface de la boîte.



Growth curves of Lassa fever, ACAR and Mozambique viruses. Monolayers of Vero E6 cells in 490cm² roller bottles were infected with either virus at a low multiplicity of infection (1PFU/10⁵cell.).

3.5.2. Inoculation aux souriceau nouveau-né

Les expériences d'inoculation au souriceau nouveau né fournissent deux types d'observations: D'une part sur la pathogénicité comparée des virus Lassa, Mopeia et Mobala et d'autres souches d'arénavirus d'Afrique; d'autre part sur le passage éventuel à l'infection chronique chez la souris de laboratoire.

Contrairement au virus Lassa qui ne démontre que peu ou pas d'effet pathogène sur le souriceau nouveau né inoculé par voie intracérébrale, les virus Mopeia et Mobala tuent en 5 à 7 jours l'animal inoculé par voie intra cérébrale (i.c.). Toutefois on peut observer des survivants qui vont manifester la maladie par un ralentissement de l'activité, une perte de poids et un hypotrophisme marqué. En général les premiers signes de ralentissement de l'activité apparaissent au troisième jour post inoculation (p.i). Après l'épisode aigu les souriceaux reprennent un taux de croissance sub-normal mais restent de taille réduite dans le cas des virus Mopeia et Mobala, mais aussi dans le cas du virus Lassa de façon plus ou moins marquée (Tableau 15). Ce tableau clinique dominé par une hypotrophie a été

observé in natura en Sierra Leone chez Mastomys infecté par le virus Lassa [Demartini et coll., 1975]. Dans la majorité des cas et pour les virus Lassa et Mobala, il a été possible de réisoler aisément le virus à partir des individus morts et surtout à partir de l'urine des survivants. Jusqu'à 12 semaines p.i., date de la fin de l'expérience, nous avons pu réisoler le virus dans les urines de certains spécimens.

Nous avons laissé se reproduire des spécimens infectés entre eux. Cela nous a permis d'observer en F2 une baisse du nombre de souriceaux nouveau-nés viables mais un portage chronique du virus sans hypotrophie notable. Les portées de F1 et F2 des souris infectées par le virus Lassa étaient réduites à 4 et 5 individus qui ont survécu tandis que les autres étaient morts ou malades 24 heures après la mise bas. Le même type d'expériences est prolongé sur 3 générations et le virus a toujours pu être réisolé pour les trois souches de virus choisies. On est en droit de penser que la contamination a dû se faire avant ou très rapidement après la naissance dans la mesure où nous avons pu réisoler le virus chez des individus morts quelques heures après la naissance. Cette contamination périnatale doit intervenir par voie transplacentaire ou lors de l'allaitement, la présence d'anticorps maternels pourrait permettre une protection relative du souriceau et l'installation d'un portage chronique moins meurtrier que dans le cas de l'inoculation parentérale. Ceci peut être vrai dans notre expérience mais il a été démontré que chez certaines souches de souris le lait maternel riche en IgE pouvait avoir un effet protecteur absolu et

rendre réfractaires les souriceaux à l'infection [Peters, 1984, comm. pers.]. Les mères de la génération parentale ne semblent pas avoir été contaminées par les virus Mopeia et Mobala (pas d'isolement de souche à partir des urines ni de sérologie positive au 38ème jour p.i.), par contre nous avons pu réisoler le virus Lassa des mères des portées de souriceaux nouveau-nés inoculés avec ce virus. La mère n'a pas manifesté de symptômes cliniques décelables à la simple inspection quotidienne; le titre en anticorps anti-Lassa était de 2048 au 38ème jour p.i.. Il semble donc que la contamination par les excréments et/ou par aérosols soit aisée avec le virus de Lassa mais problématique avec les autres virus; nous verrons plus bas le même type d'observation faite dans la seconde expérience.

Au total, on peut considérer que l'effet pathogène est dans ce cas génétiquement lié aux virus dont les souches étudiées avaient la même historique de passages au laboratoire et les souris testées provenaient d'un élevage monoclonal. En effet Jahrling et Peters [1983, non publié] ont pu mettre en évidence des souches de souris sensibles et d'autres plus ou moins résistantes à une même souche du virus Lassa, d'où l'emploi choisi du matériel d'expérience dans ce type de manipulations.

Chez les singes d'expérience, les virus Lassa et Mopéia révèlent une pathogénicité inverse de celle démontrée pour le souriceau nouveau-né. Le virus Mopeia n'induit pas chez le singe Rhésus de maladie et l'infection reste inapparente. Enfin P. Jarhling (non publié) a pu observer que les arénavirus de rongeurs (Mopeia, Mobala et celui du Zimbabwe) étaient sans effet

pathogène pour le singe Rhésus et le cobaye. Ces différences en complète opposition de comportement de ces virus dans ces groupes animaux (Primates/Rongeurs) reste difficilement explicable. Sans doute la souris de laboratoire ne représente pas le modèle naturel de rongeur pour démontrer l'effet de portage sain du virus Lassa; mais le fait que déjà au sein d'une même espèce il existe des lignées réfractaires et d'autres non, complique singulièrement le problème.

Dans un second type d'expérience une gamme étendue de souches de virus Lassa et Lassa like d'origines variées met en évidence ce caractère de léthalité pour le souriceau nouveau né et nous permet une première appréciation de ce qui peut paraître comme étant des différences biologiques stables (Tableau 16). Les souches humaines de Sierra Léone et de Guinée ne sont pas léthales pour le souriceau nouveau né. Au contraire on observe une gradation dans la mortalité entre les souches humaines du Liberia, du Nigeria puis les isolats viraux de rongeurs (figure 22). On relève donc une certaine homogénéité dans leur pathogénicité chez les souches humaines de Sierra Léone et des pays limitrophes, une pathogénicité marquée du virus humain du Nigeria; ces différences de comportement biologique ont déjà été observées lors des épidémies du Nigeria et du Sierra Léone où le virus du Nigeria montre une mortalité chez l'homme plus élevée, apparait sous forme de bouffées épidémiques hautement contagieuses et léthales à l'inverse de ce que l'on observe en Sierra Léone (McCormick et coll. 1983, non publié). Enfin les

souches de rongeurs sont généralement léthales pour le souriceau nouveau né et le virus n'a pas pu être réisolé chez les spécimens infectés par le virus Mopéia. La perte de poids signe toujours l'infection par les arénavirus africains même si la clinique reste très discrète. Comme nous l'avons observé précédemment la mère des portées inoculées a été contaminée par le virus Lassa mais épargnée par les virus Mobala et Mopeia. Si la totalité des souches humaines testées pour cet aspect ont pu contaminer la mère, la souche "rongeur" de Sierra Léone (Mastomys 1515) a elle aussi pu contaminer la mère de la portée inoculée. En conclusion on observe des différences de pathogénicité importantes entre les souches, une certaine homogénéité de comportement des souches "Rongeurs" et pour les souches humaines peut-être déjà deux biotypes "Lassa" et "Nigeria".

Si les souches "rongeurs" semblent passer de façon verticale, la transmission horizontale ne semble pas être la règle et cela pourrait expliquer sur le terrain des variations du taux d'infection des populations de rongeurs en fonction des variations de populations. En ce qui concerne les souches "humaines" les deux mécanismes chez les rongeurs semblent autant privilégiés et pourraient expliquer les bouffées enzootiques lors de l'expansion des populations de rongeurs.

Enfin un dernier aspect concerne la connaissance de la physiopathogénie du virus de Lassa pour l'Homme et pour cela le développement du modèle animal chez le singe reste d'un intérêt premier. Il semble que le virus ne démontre pas d'effet cytopathique direct dans les organes infectés mais que la

qualité de la réponse immunitaire serait le facteur déclenchant de la maladie (McCormick, 1983, non publié). Le rôle attribué il y a plus de 40 ans aux arénavirus dans leur intervention sur le système immunitaire reste sans doute d'actualité dans la connaissance de la pathogénie du virus de Lassa chez l'Homme.

TABLEAU 15: RECHERCHE D'UN EFFET PATHOGENE CHEZ LE SOURICEAU NOUVEAU-NE PAR INOCULATION INTRACEREBRALE DES VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA.

Observations	Souche inoculée			
	Lassa	Mopeia	Mobala	Témoin
Mortalité	3/8 (1)	5/8	0/8	0/8
Poids (2)	9.2	9.3	9.1	11.9
Anticorps (3)	6/6	5/5	4/4	0/2
Isolement (4)	5/7	4/6	8/8	0/8

(1) Positifs/total testés ou observés

(2) Poids moyen en gramme des survivants à 12 jours p.i.

(3) Anticorps fluorescents (IFI)

(4) Réisolement de virus sur cellules Vero à partir du sang.

TABLEAU 16: INOCULATION DE DIVERSES SOUCHES D'ARENAVIRUS
D'AFRIQUE AU SOURICEAU NOUVEAU NE.

Souche	% mortalité	Poids moyen (gr)	réisolement de virus(3)		sérologie positive(4)	
			Urine	Organes	SNN	M
	(1)	(2)				
LAS Lp3	0	8,9	+	+	+	+
MOP Mp3	63	9,1	+	+	+	-
MOB A11	38	9,0	+	+	+	-
LAS NIG	50	9,1	nt	+	+	+
LAS "Mano"	0	8,8	+	nt	nt	nt
LAS "Fofana"	0	11,8	+	nt	+	nt
LAS "1515"	50	9,5	nt	+	nt	+
LAS GUI	0	11,5	+	nt	nt	nt
LAS LIB	14	12,5	+	+	nt	nt
LAS "ZorZor"	13	9,0	nt	+	nt	+
Témoin	0	11,5	-	-	-	-

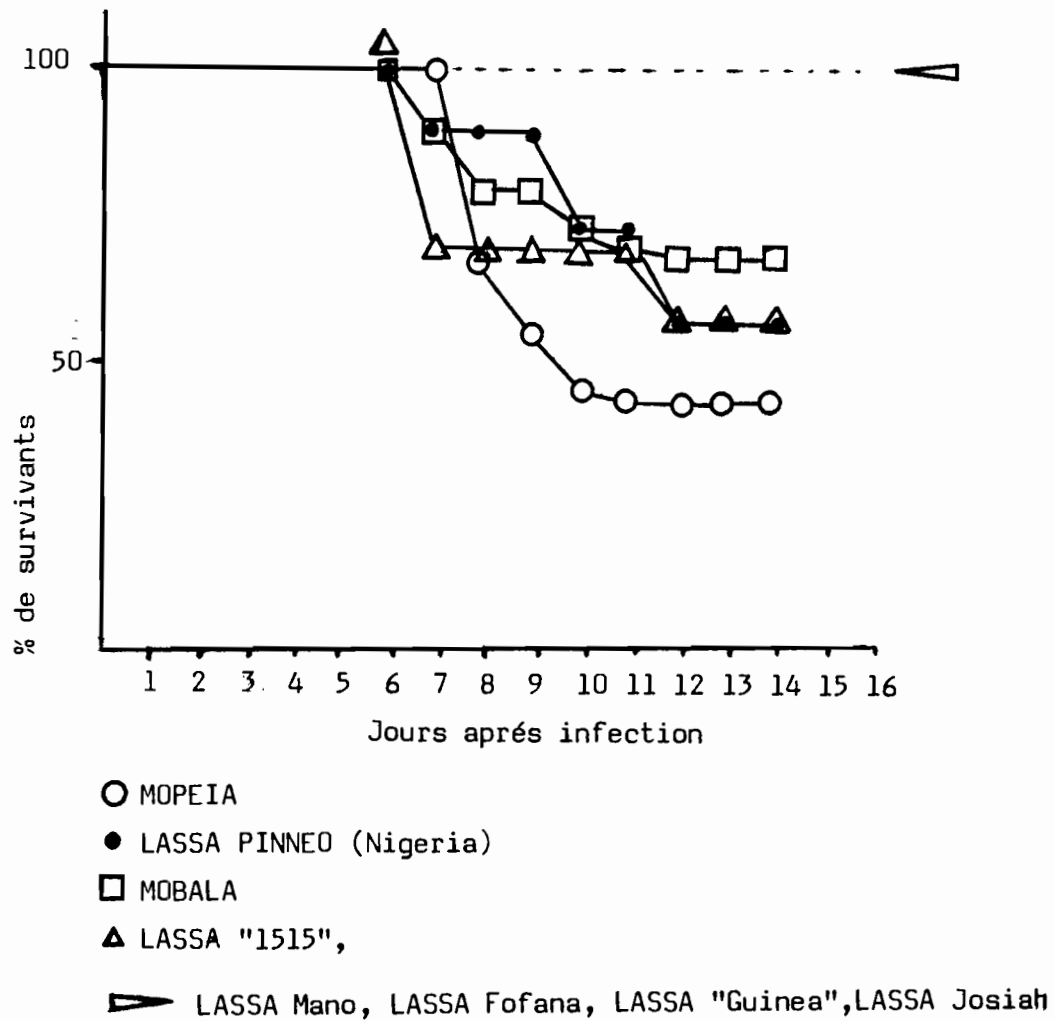
(1) Mortalité en pourcentage sur 8 individus

(2) Pesée faite au 20ème jour p.i.

(3) Réisolements tentés au 8ème jour p.i.

(4) Sérologie faite au 50ème jour p.i.

FIGURE 22: TAUX DE SURVIE DES SOURICEAUX NOUVEAU-NES INOCULES PAR DIFFERENTS ARENAVIRUS D'AFRIQUE



3.5. Parentés antigéniques des arenavirus d'Afrique

3.5.1. Evidences

D'une part nous avons vu dans un précédent chapitre (3.2.) qu'il existait des différences d'antigénicité entre les virus Lassa, Mopeia et Mobala décelables dans la nature lors de l'analyse sérologique de sérums de convalescents ou de sérums de rongeurs infectés par ces virus; d'autre part, une batterie d'anticorps monoclonaux nous a permis de distinguer ces 3 types de virus entre eux. Afin de donner plus de poids à ces observations et de faire apparaître nettement ces différences antigéniques nous avons utilisé largement le pouvoir d'analyse fourni par l'utilisation d'une batterie élargie d'anticorps monoclonaux (Tableaux 17, 18).

Nous observons dans le premier tableau que les différentes souches du virus Mobala sont identiques entr'elles si l'on en juge par l'absence de discordance dans la réponse vis à vis des anticorps monoclonaux utilisés. Dans le tableau suivant par contre, on met en évidence des différences nettes entre les souches d'arenavirus testées. Il est admis que les protéines de la nucléocapside (NC) représentent des protéines caractéristiques du groupe auquel appartient le virus, tandis que les protéines de surface sur la particule ou glycoprotéines (GP), sont caractéristiques de l'espèce virale et donc sujettes à des variations intraspécifiques. Si on considère les anticorps monoclonaux anti nucléocapside préparés contre le virus Lassa,

ils distinguent les virus de l'Ancien Monde du virus Tacaribe d'une part et d'autre part un épitope paraît unique [52-158-3] pour le virus Lassa, souche de Sierra Leone. On remarque donc dès à présent une différence notable portant sur la NC, entre les deux souches humaines du virus Lassa provenant de Sierra léone et du Nigeria. Inversement, les anticorps monoclonaux dirigés contre la NC du virus Mopeia, semblent donner une certaine identité entre les virus Mopeia et Mobala et les différencier radicalement des autres souches. Enfin le virus Tacaribe emprunte quelques épitopes aux souches de l'Ancien Monde sans que l'on puisse jusqu'ici l'expliquer.

Buchmeier et coll. [1981], montrent que sur 46 anticorps monoclonaux préparés contre le virus CML, 6 présentent une réaction croisée avec les virus Lassa et/ou Mopeia. Sur 6 anticorps monoclonaux préparés contre le virus Pichinde, un seul présente une réaction croisée contre les virus Lassa et CML et est dirigé contre la NC. Ces observations apportent d'une part des éléments en faveur de l'existence de deux groupes séparés d'arénavirus, ceux du Nouveau Monde et ceux de l'Ancien Monde; et d'autre part, elles témoignent de différences marquées à l'intérieur du groupe des arénavirus de l'Ancien Monde.

On peut donc considérer que chacun des virus de l'Ancien Monde donne une image particulière qui les font se distinguer nettement pour les souches testées en trois groupes d'inégale importance: les souches Lassa humaines, les arénavirus africains isolés de rongeurs et le virus CML. On sait que le virus CML présente des variations intraspécifiques importantes et

stables [Chastel]. Enfin, il est encore difficile de détecter une filiation entre ces différents arénavirus, mais comme Howard et Young [1984] en formulent l'espoir, il ne fait aucun doute que la préparation d'anticorps monoclonaux sera de plus en plus utilisée dans la recherche de l'évolution des arénavirus.

3.6.2. Applications

Des souriceaux nouveau-nés inoculés avec les 3 souches Lassa, Mopeia et Mobala, produisent à des titres différents des anticorps fluorescents vis à vis des 3 souches en fonction du virus causal (Tableau 19). Compte tenu que les inoculats ont été administrés à des titres en UFP semblables on est en droit de penser que la sollicitation du système immunitaire a été la même. Si on considère les titres en anticorps produits vis à vis des 3 antigènes, le virus Mopeia paraît le moins réactif dans la production d'anticorps contre les souches hétérologues. Cette observation est en accord avec ce que nous observons dans la nature (cf.3.3), c'est à dire une meilleure production d'anticorps anti Lassa par le virus Mobala que le virus Mopeia. Si ces différences restent toutefois de faible intensité elles peuvent se révéler d'importance dans le choix ou la recherche de protéines immunogènes contre le virus Lassa et non pathogènes pour l'Homme.

De sévères épidémies de Fièvre de Lassa en Afrique de l'Ouest et la démonstration par la sérologie d'une maladie

relativement étendue sur le territoire ont rapidement démontré après sa découverte l'importance clinique que pouvait avoir cette maladie [Frame, 1970; Monath, 1975; Carey et coll., 1972; Mertens et coll., 1973; Smith 1974). Sensibilisée par l'émergence de ce véritable problème de Santé Publique en Afrique de l'Ouest, la recherche d'un vaccin a débuté précocément. Malheureusement les expériences difficiles d'obtention de vaccins contre les Fièvres Hémorragiques d'Amérique du Sud ne laissent entrevoir que des solutions à moyen ou long terme pour le virus de Lassa. La réalisation d'un vaccin vivant atténué a pu se faire pour le virus Junin [Maiztegui et coll., 1979] toutefois l'établissement d'un vaccin de ce type est apparu difficile avec les arénavirus en général, surtout en raison de la faible production d'anticorps neutralisants (ce qui est encore plus évident dans le groupe Lassa) et de l'instabilité génétique des souches. Quelques espoirs sont nés de la découverte de virus apparentés au virus Lassa et apparemment non pathogènes pour l'Homme. Déjà des essais de protection du singe Rhesus vis à vis du virus Lassa par une infection préalable par le virus Mopeia, ont donné des résultats satisfaisants [Kiley et coll., 1979; Jahrling et coll., 1980). L'emploi de ces virus sauvages nécessitent en fait une expérimentation longue et des contrôles d'innocuité sévères pour pouvoir penser à les utiliser en médecine humaine; deux souches du virus Mobala ont ainsi été réisolées par nous directement sur des cultures certifiées pour leur absence de mycoplasme ou de virus contaminant et déposés à l'ATCC pour éventuellement servir dans un tel protocole de préparation d'un

vaccin.

Une autre voie pour la préparation d'un vaccin est celle de l'identification de la séquence, puis de la synthèse de protéine virale immunogène. Les travaux de Clegg et coll. [1983] et de Gonzalez et coll. [1984] par l'analyse comparée des caractéristiques antigéniques de souches variées du groupe Lassa constituent un préliminaire dans l'identification de protéines immunogènes. De plus la recherche d'anticorps monoclonaux neutralisants déjà engagée par P. Jarhling et coll. (comm. pers.) devrait être une étape décisive dans la sélection d'oligopeptides immunogènes efficaces.

Enfin l'étude de la séquence du sARN est aujourd'hui un objectif que nous nous sommes fixés, étape indispensable à la synthèse protéinique ultérieure; la mise au point des techniques de résolution des différentes espèces d'ARN viraux constitue une avance notable dans cette recherche.

TABLEAU 17: IDENTITE DES SOUCHES MOBALA ENTRE ELLES EN UTILISANT DES ANTICORPS MONOCLONAUX DANS LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Monoclonale	Spé. F.V.	Souches Mobala										
		(1)	3051	3059	3061	3068	3076	3080	3099	3200	A11	B21
9-7-9 (2)	G2	-	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-
24-A-21 (2)	NP	nt	nt	nt	nt	-	-	nt	nt	nt	nt	
52-54-6 (3)	NP	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt	nt	nt	
52-54-2	NC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
52-54-11	?	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt	+	nt	
52-84-16	GP	nt	nt	-	nt	-	-	nt	nt	nt	nt	
52-85-6	GP	-	-	nt	nt	-	-	-	-	-	-	
52-135-17	G2	-	-	nt	nt	nt	nt	-	-	nt	nt	
53-17-2 (4)	NC	nt	nt	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	
53-29-1	NC	nt	-	nt	nt	-	-	-	nt	-	nt	

- (1) Spécificité de protéine virale de structure: nucleocapsidique (NC); glucoprotéinique (GP) ou spécifiquement G2.
 (2) Anticorps monoclonaux préparés à partir d'une souche de LCMV (Buchmeier et coll., 1982)
 (3) [52-...-...]= Anticorps monoclonaux préparés à partir d'antigène Lassa (McCormick et coll., 1980, non publié)
 (4) [53-...-...]= Anticorps monoclonaux préparés à partir d'une souche Mopéia (McCormick et coll., 1980, non publié)

TABLEAU 18: PARENTES ANTIGENIQUES DETECTEES PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE ENTRE DIVERSES SOUCHES D'ARENAVIRUS

Anticorps monoclonaux	Spé. P.V. (1)	souches virales (5)					
		LAS	MOP	MOB	NIG	CML	TAC
24-A-21 (2)	NC	+	+	-	+	+	-
9-7-9 (2)	GP	-	+	-	+	+	-
52-54-6 (3)	NC	+	+	+	+	+	-
52-158-3	NC	+	-	-	-	-	-
52-135-176	G2	+	-	-	+	+	-
52-158-3	NC	+	-	-	-	-	-
52-134-23	GP	+	-	-	-	-	-
52-134-23	GP	+	-	-	-	-	-
52-85-15	GP	+	-	-	+	-	-
52-85-6	GP	+	+	-	+	+	+
52-135-17	GP	+	+	-	+	-	-
53-29-1 (4)	NC	-	+	-	-	-	-
53-73-B	NC	-	+	+	-	-	-
53-12-16A	GP	-	+	+	-	+	+
53-16-11	GP	-	+	-	-	-	-

- (1) Spécificité de protéine virale de structure: nucleocapsidique (NC); glucoprotéinique (GP) ou spécifiquement G2. (J.B. McCormick, non publié)
- (2) Anticorps monoclonaux préparés à partir d'une souche de LCMV (Buchmeier et coll., 1982)
- (3) [52-...]= Anticorps monoclonaux préparés à partir d'antigène Lassa (McCormick et coll., 1980, non publié)
- (4) [53-...]= Anticorps monoclonaux préparés à partir d'une souche Mopeia (McCormick et coll., 1980, non publié)
- (5) LAS= virus Lassa "J" de Sierra Leone
MOP= virus Mopeia de rongeur du Mozambique
MOB= virus Mobala de rongeur de R.C.A.
NIG= virus Lassa humain du Nigeria
TAC= virus Tacaribe de chauve souris de Trinidad-Tobago

TABLEAU 19: CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS FLUORESCENTS
CHEZ LE SOURICEAU NOUVEAU-NÉ INOCULÉ PAR LES VIRUS
LASSA, MOPEIA ET MOBALA

Souche inoculée	Prélèvement: jour p.i.	IFI (1)		
		LASSA	MOPEIA	MOBALA
LASSA Lp3	21	2048	512	512
	40	2048	512	1024
MOPEIA	8	-	16	-
	21	-	2048	512
	40	256	4096	1024
MOBALA	8	-	-	16
	21	512	512	4096
	40	512	2048	4096

(1) Les titres exprimés représentent la moyenne géométrique
calculée sur 2 à 5 spécimens.

3.7. Distance génétique des arénavirus d'Afrique

L'épidémiologie moléculaire existe depuis peu et a joué un rôle de plus en plus important dans l'étude des maladies infectieuses. Elle se manifeste déjà de façons variées suivant les marqueurs recherchés et le type d'analyse attendu. Ainsi a-t-on pu assister à la création d'un nouveau paradigme des pandémies grippales imposé par l'étude des recombinants moléculaires des mixovirus. Les virus à ARN sont aussi un modèle intéressant particulièrement dans une telle approche épidémiologique; en effet ces virus ont la propriété d'évoluer rapidement et les méthodes classiques utilisant les réactions antigène-anticorps ont du mal à détecter de faibles variations à l'intérieur d'un même sérotype dont les conséquences peuvent être d'importance. Enfin l'épidémiologie possède ainsi un outil de recherche sur l'évolution des germes pathogènes en particulier par l'analyse directe de leur génotype. Au même titre que d'autres techniques de biologie moléculaire, l'établissement des cartes des oligonucléotides de digestion par des enzymes de restriction est une méthode d'analyse puissante des virus à ARN [Clewley et Bishop, 1982].

Les cartes des oligonucléotides de digestion par la ribonucléase du bactériophage T1 que nous avons réalisées, représentent deux types différents d'analyse : d'une part ce sont les oligonucléotides obtenus après digestion de l'ARN viral

total de différentes souches d'Arénavirus; d'autre part, ce sont les cartes obtenues après digestion du segment S des ARN des souches clonées des virus Lassa, Mopeia et Mobala.

L'analyse de l'ARN total a fait craindre au début la contamination excessive des échantillons d'ARN purifiés par l'ARN ribosomal emprunté aux cellules par les virions. En fait des expériences préliminaires nous ont montré que, après mise au point, dans le système utilisé, la contamination par les ARN 18s et 28s était négligeable ou absente. Il semble d'une part que la concentration en ARN ribosomal soit faible dans les échantillons en regard des ARN viraux, et les oligonucléotides sont généralement de petite taille et n'interfèrent pas dans la région analysée des cartes oligonucléotidiques. Le même type d'observation est rapporté par Vezza et coll. [1978] qui observent des variations importantes dans l'obtention d'ARN ribosomal après extraction de l'ARN du virus Pichinde selon les conditions de croissance du virus et les souches utilisées. Enfin, nous avons pu extraire directement des cellules Vero, l'ARN ribosomal que nous avons traité de la même façon que l'ARN viral afin de pouvoir en dresser la carte et distinguer éventuellement des oligonucléotides contaminants dans les cartes des ARN viraux totaux. Nous présentons à cet effet 3 souches différentes de virus Lassa, obtenues lors d'expériences préliminaires, dont l'ARN a été largement contaminé par l'ARN ribosomal et une carte de l'ARN ribosomal de cellules Vero (Figure 23, G, H, I, J, K); il est aisé de faire la différence avec les cartes non contaminées (Figure 23, A, B, C, D, E, F). Ainsi avons nous pu inclure dans notre

analyse sans souci d'erreur ces 3 cartes supplémentaires, dont une de la souche de référence Lassa "Josiah" qui a servi de contrôle interne à l'expérience. Si nous tenons à inclure cette analyse malgré son imperfection, cela tient au fait que l'obtention des ARN d'arénavirus en quantité suffisante a été un travail laborieux qui a rendu ce matériel précieux, dont l'analyse reste possible grâce au contrôle apporté par les autres cartes non contaminées.

Différentes souches sont donc analysées et la souche Lassa "Josiah" de Sierra Leone a servi arbitrairement de souche de référence. Les souches qui en sont les plus proches sont les souches Mobala ce qui reste en accord avec les observations faites lors de l'utilisation de la sérologie croisée avec des sérums humains et animaux récoltés in natura (); en accord aussi avec les études des souches par antigènes monoclonaux (. .), et enfin cette observation se retrouve dans l'expérience de cinétique d'apparition des anticorps fluorescents vis-à-vis des 3 souches Lassa, Mopeia et Mobala (Tableau 19). La souche humaine de Guinée se démarque de façon singulière et laisse à penser à une séparation récente vis à vis de la souche de référence. Elle ne possède que 6 oligonucléotides uniques dont un seul se retrouve dans une autre souche que celle de référence (Souche Mopeia). Dans le tableau 21 figure une synthèse des résultats obtenus dans l'analyse des ARN totaux. Pour replacer les différences observées dans le contexte de la séquence totale des nucléotides, il faut garder présent à l'esprit que par ce type d'analyse seul 10% du

génomique est exploré. En contrepartie ce sont les oligonucléotides possédant les séquences les plus longues donc les plus rares statistiquement qui sont analysés. Aaronson et coll.[19] ont pu ainsi estimer la sensibilité de la méthode par simulation sur ordinateur. Il leur a été possible d'établir une fonction entre le pourcentage d'homologie des oligonucléotides générés et le degré d'identité des séquences des nucléotides de l'ARN total (Figure 21). Ainsi nous pouvons considérer pour l'ensemble des souches étudiées que les changements intéressent de 0,5 à 2,2% de leur génome.

Afin d'obtenir une bonne séparation des ARN viraux nous avons utilisé deux méthodes différentes. D'abord nous avons obtenu la résolution des espèces d'ARN sur gradient de sucrose (Figure 25) et les fractions contenant les différents ARN nous ont alors servi de marqueur dans la séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 26). Pour des raisons pratiques nous avons préféré la séparation sur gel d'agarose et les cartes de ARNS présentées sont obtenues par ré-extraction de l'ARN à partir des bandes de migration visualisées en lumière U.V. après coloration au bromure d'éthyle. Les ARNS et ARNL sont aisément repérables grâce au marqueur ribosomal présent dans la colonne de gauche fig.26.

Nous avons choisi de commencer l'étude des espèces d'ARN par le ARNS en raison de son implication dans la synthèse des protéines de structure, c'est à dire des molécules antigéniques chez l'hôte vertébré. Bishop et coll.[] ont en

effet démontré que le génôme de l'ARNL codait pour les protéines enzymatiques nécessaires à la réplication du virion, tandis que le ARNS code pour les glycoprotéines et la nucléoprotéine. De l'analyse des ARNS on observe une moindre homologie que lors de l'analyse des ARN totaux; cela est compréhensible dans la mesure où les virus étudiés appartiennent au même groupe et possèdent une "politique" de réplication identique dont les enzymes sont codés par l'ARNL qui doit par conséquent présenter une homologie de séquence importante à l'intérieur du groupe. Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises le virus Mobala et la souche Lassa "Josiah" présentent entr'elles plus d'affinités que cette dernière avec la souche Mopeia. Toutefois parmi les oligonucléotides uniques des souches Mobala et Mopeia vis à vis de la souche de référence, 11 d'entr'eux sont communs à ces deux souches ce qui est un lien important entr'elles.

En conclusion, cette étude préliminaire de l'ARN d'arénavirus d'Afrique, apporte l'élément génétique de la différence; en effet les observations initiales, d'avant même l'isolement du virus Mobala, nous avaient déjà montré les prémices de la diversité des arénavirus d'Afrique. Si les caractères originaux des différents types viraux qui se dessinent intéressent aussi bien les sites antigéniques présents sur les Protéines de structures que le comportement biologique, cela semble bien s'inscrire dans le génôme et être le produit d'une évolution 241 complexe. Dans l'avenir nous pensons compléter ces cartes par celles de souches provenant d'hôtes et/ou d'origines géographiques différentes. Mais c'est surtout la séquence même des

génomés, incluant les arénavirus d'Afrique du Sud qui devaient nous apporter d'une part les éléments de réponse sur une éventuelle filiation entre ces virus et la possibilité de synthèse de protéines candidates pour la préparation d'un vaccin.

TABLEAU 20: ANALYSE DES CARTES OLIGONUCLEOTIDIQUES DES ARN
TOTAUX DE DIVERSES SOUCHES D'ARENAVIRUS DE L'ANCIEN MONDE

=====			
Souches Analysées		Lassa "Josiah" : Souche humaine de Sierra Léone Souche de référence	
(1)	Oligonucléotides (2)	Pourcentage d'homologie	Oligonucléotides uniques (3)

LAS "J"	63/63	100	0
LAS GUI	18/63	76	5
MOP Mp3	18/63	76	30
MOB A11	55/63	87	15
MOB 3200	52/63	83	36
LCMV "A"	21/63	33	33
=====			
(1) Vis à vis de la souche de référence Lassa "J"			
(2) Nombre commun/nombre total analysé			
(3) Non communs avec la souche de référence			

TABLEAU 21: POURCENTAGE D'HOMOLOGIE DANS L'ANALYSE DES OLIGONUCLEOTIDES DE DIGESTION DE L'ARN TOTAL DE SOUCHES DE VIRUS LASSA OU DE VIRUS APPARENTES D'ORIGINES GEOGRAPHIQUES DIVERSES EN AFRIQUE

Souches Analysées	Origine	Pourcentage d'Homologie
<u>Souches humaines</u>		
Lassa "Josiah"	Sierra Leone	100
Lassa "Pinned"	Nigeria	87
Lassa GUI	Guinée	76
<u>Souches de rongeurs</u>		
Lassa 1515	Sierra Leone	70
Mopeia Mp3	Mozambique	76
Mobala A11	R.C.A.	88
Mobala 3200	R.C.A.	83

TABLEAU 22- ANALYSE DU DEGRE D'HOMOLOGIE ENTRE DIVERS ARNS DE
SOUCHE D'ARENAVIRUS D'AFRIQUE

Souches (1)	Oligonucléotides (2)	Oligonucléotides uniques	pourcentage d'homologie
LAS "Josiah" Lp3	54/54	18 (3)	100
LAS "Fofana"	37/54	29	69
MOP Mp3	34/54	21	63
MOB A11	42/54	33	72

(1) ARNS de souches de virus clonés- Lassa "Josiah" Lp3, souche humaine de Sierra Leone (LAS); Mopéia Mp3, souche de rongeur du Mozambique (MOP); Mobala A11, souche de rongeur de R.C.A. (MOB).

(2) Oligonucléotides communs avec ARNS de LAS/Nombre d'oligonucléotides considérés pour l'analyse dans la carte du sARN de LAS.

(3) Oligonucléotides uniques de la souche LAS vis à vis des autres souches et de chacune des souches vis à vis de la souche LAS.

FIGURE 23: CARTES DES OLIGONUCLEOTIDES T1 DE L'ARN TOTAL
DES VIRUS LASSA ET APPARENTES

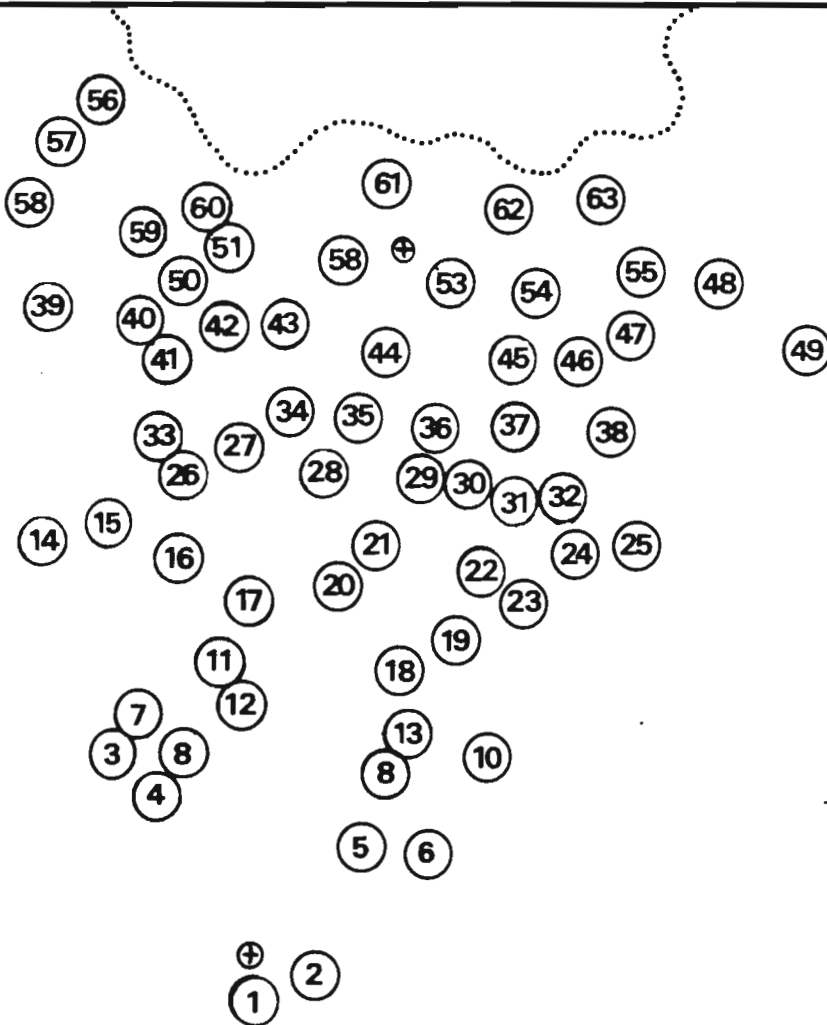
L'ARN après extraction au phénol a été digéré dans un mélange de 5µl de ribonucléase T1 et marqué à son extrémité 5' par du phosphore radioactif par transfert d'un ion P*; ce transfert s'est fait dans un mélange réactionnel de polynucléotide kinase et d'adénosine tri phosphatée*. Les oligonucléotides marqués en 5' ont été isolés par électrophorèse en deux dimensions sur gel de polyacrylamide et révélés par autoradiographie. La première dimension sur les cartes s'est faite de gauche à droite, et la seconde de bas en haut). Les marqueurs colorés sont indiqués par un cercle plein. Un schéma des oligonucléotides est présenté pour chaque autoradiographie.

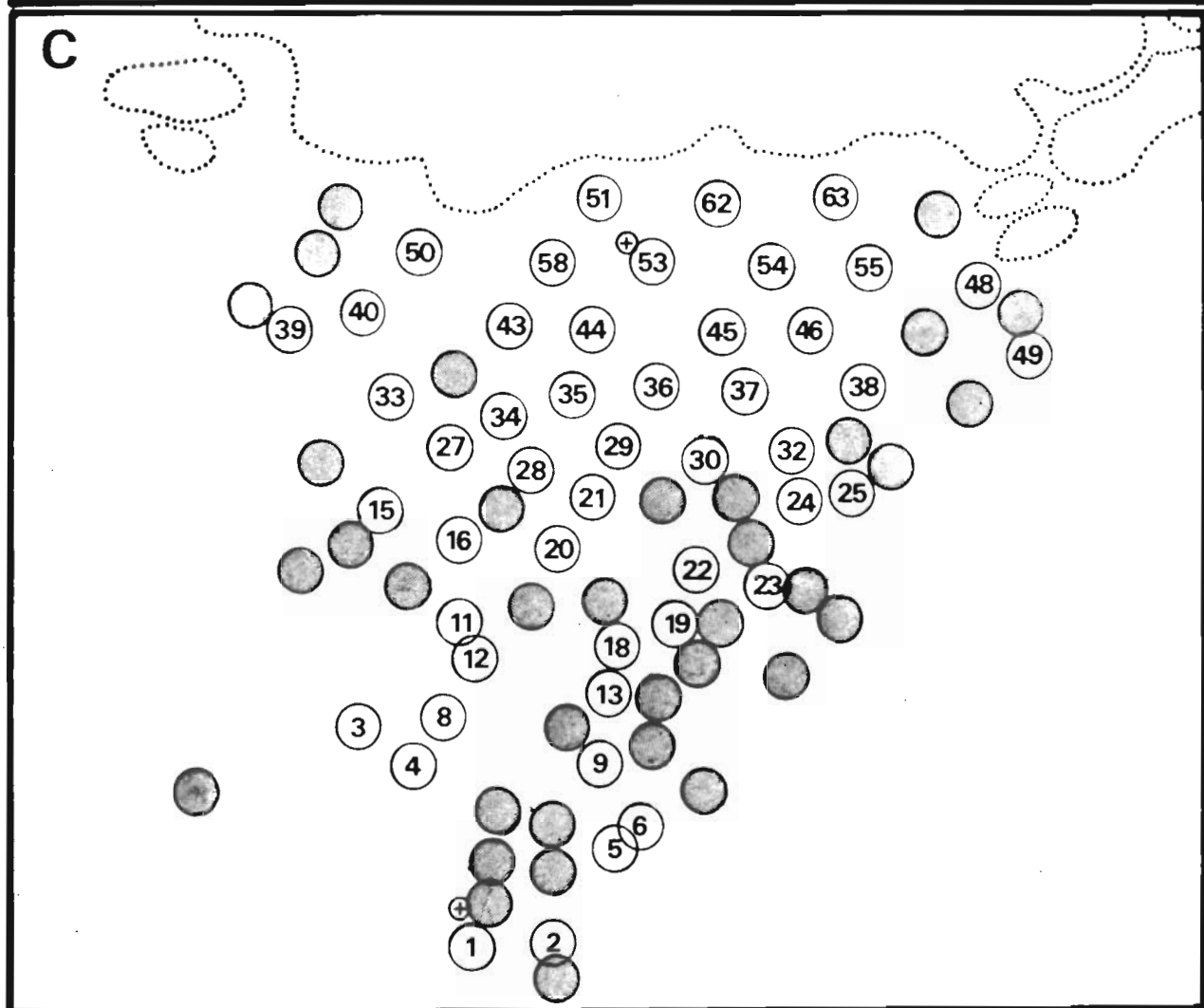
- A: Lassa "Josiah", souche humaine de Sierra Leone
- B: Lassa "Guinée", souche humaine de Guinée
- C: Mopeia Mp3, souche de rongeur du Mozambique
- D: Mobala A11, souche de rongeur de R.C.A.
- E: Mobala 3200, souche de rongeur de R.C.A.
- F: LCMV, souche "Armstrong"
- G: Lassa "Pinneo", souche humaine du Nigeria

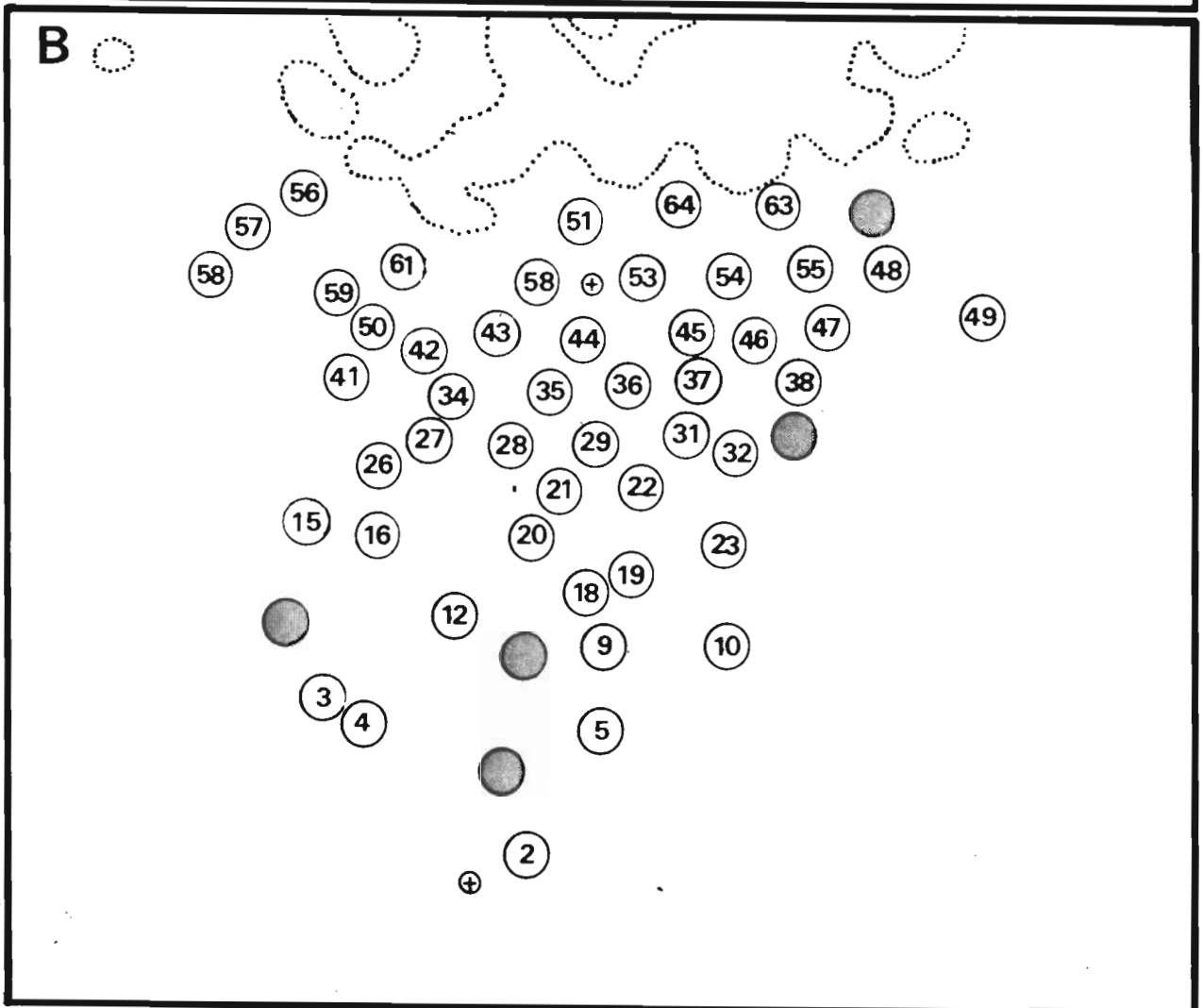
LAS SL

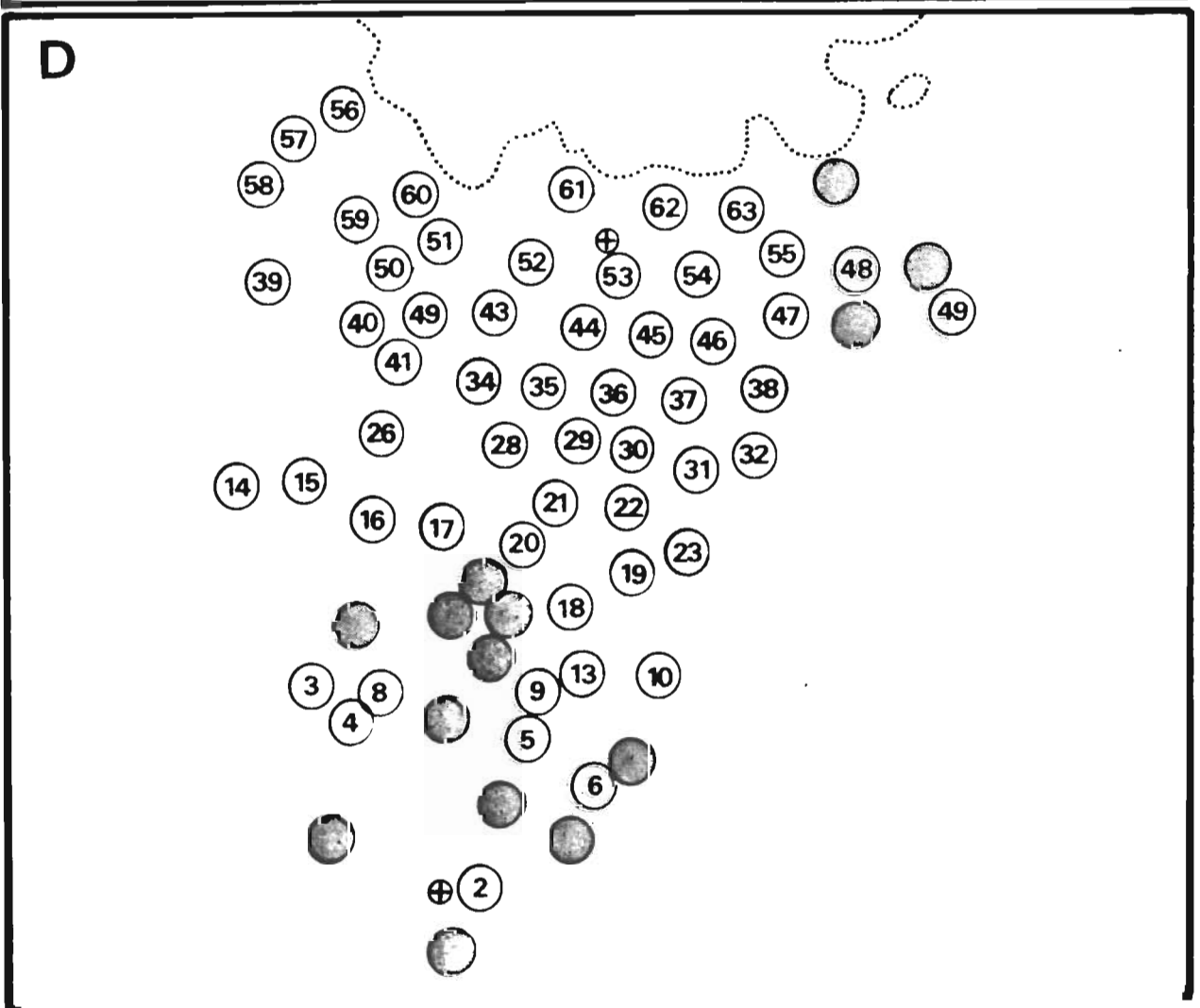


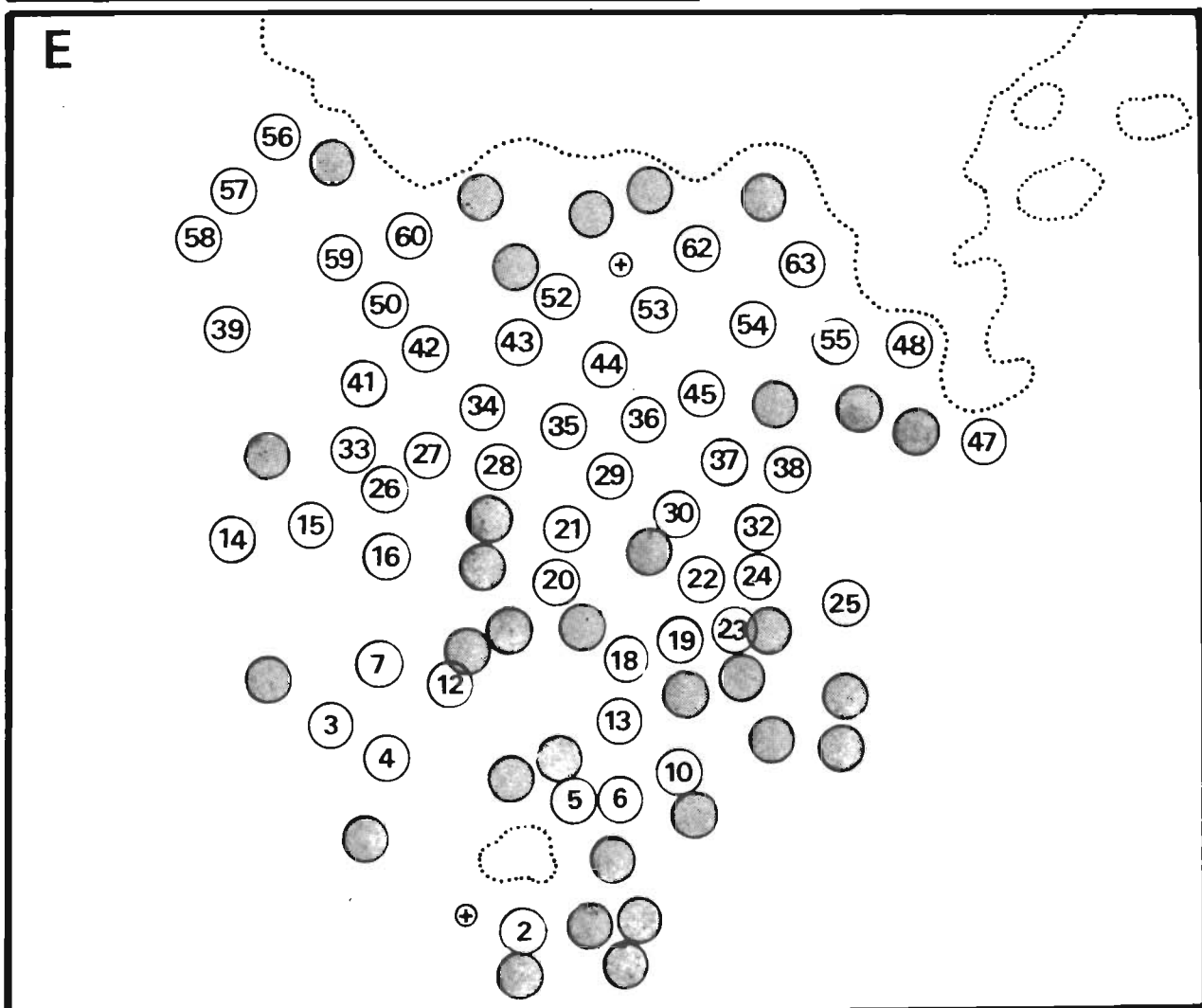
○ A

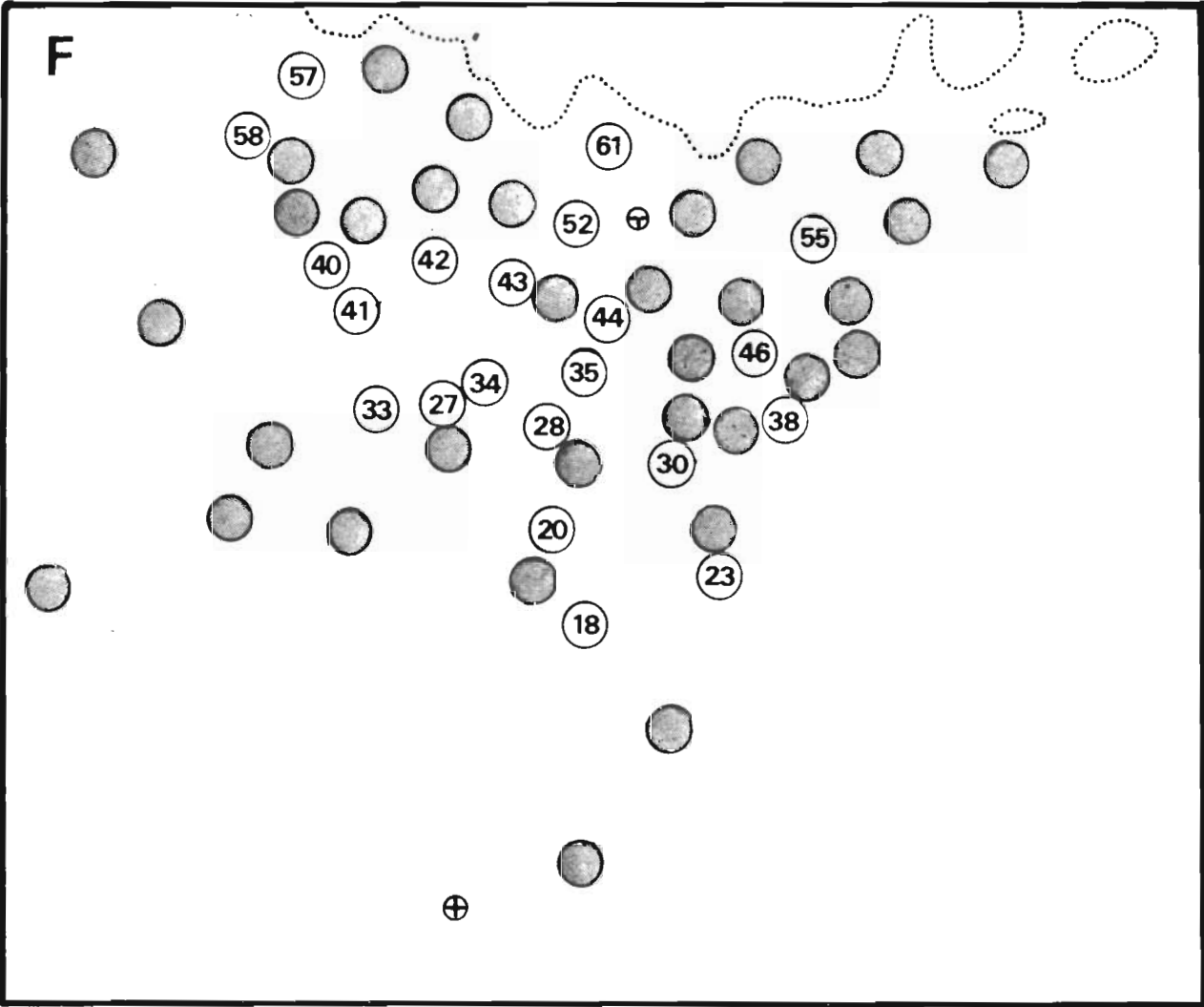
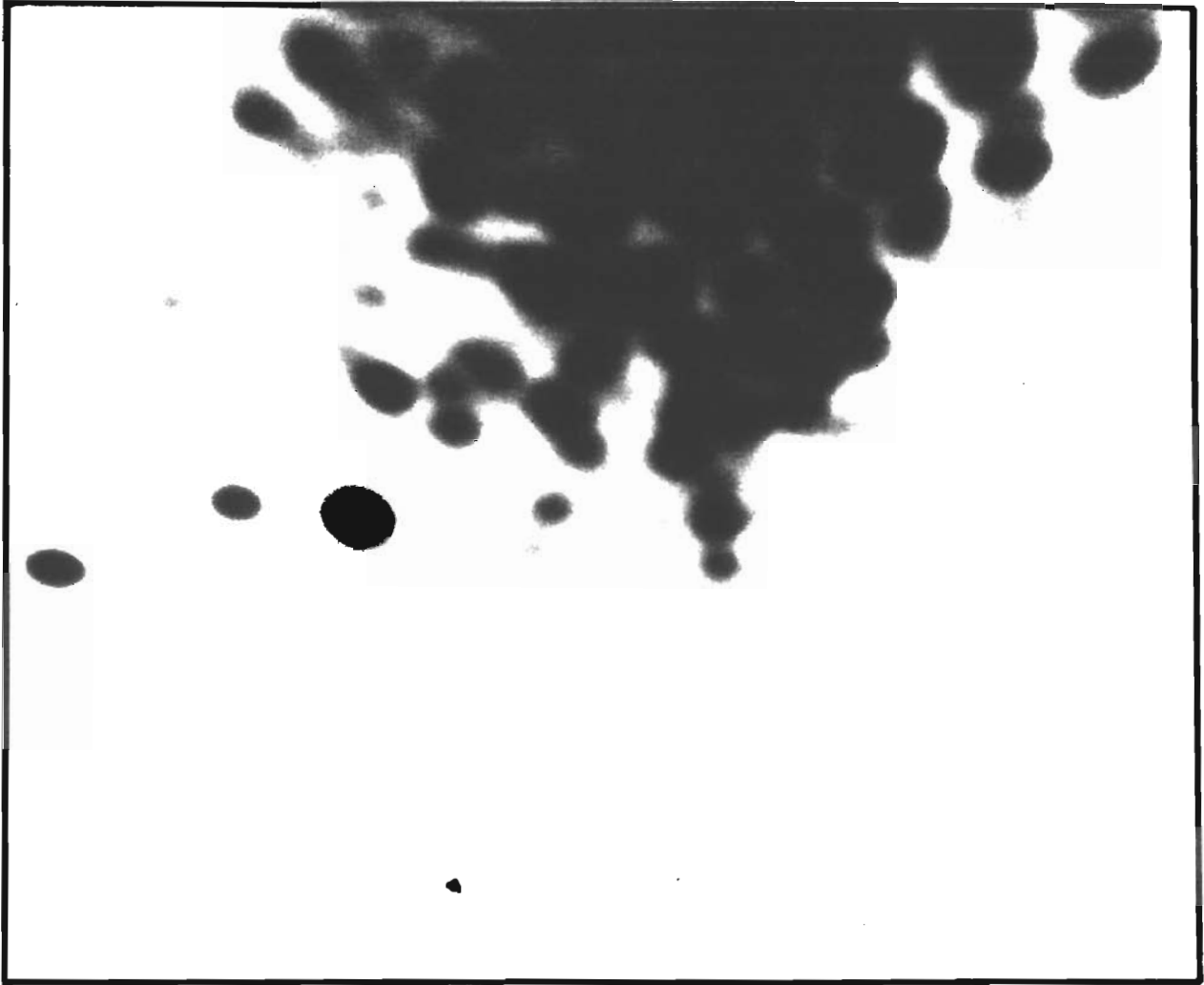






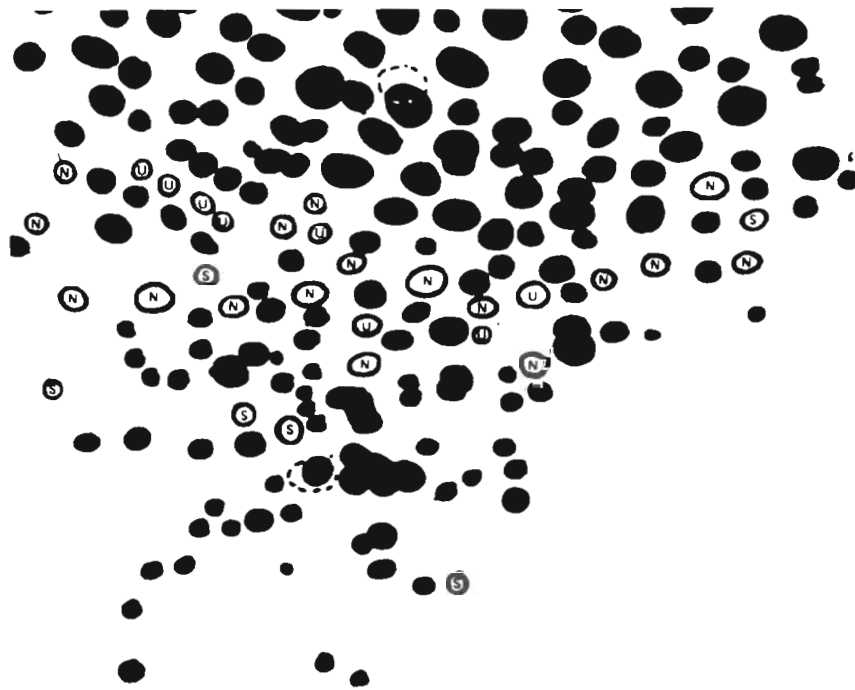








SL



NIG

- Oligonucleotides common to SL and NIG strains
- Ⓢ Oligonucleotides unique to SL strain
- Ⓝ Oligonucleotides unique to NIG strain
- Ⓤ Oligonucleotides probably unique to NIG strain



FIGURE 24: FONCTION DE RELATION ENTRE LES OLIGONUCLEOTIDES COMMUNS A DEUX ARN PROCHES ET LES VARIATIONS DANS LEUR SEQUENCE

Le tracé de la courbe a été généré par simulation sur ordinateur et représente les valeurs moyennes d'homologie entre les oligonucléotides les plus longs de deux ARN de taille et de composition connue qui auraient un certain degré de parenté (D'après Aaronson et coll., 1982).

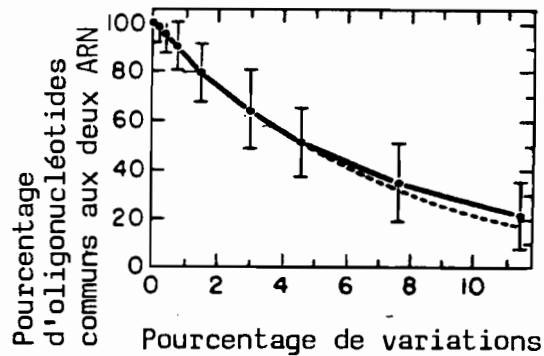


FIGURE 25: RÉSOLUTION DES SEGMENTS D'ARN SUR ~~UN~~
~~DEGRADÉ~~ GRADIENT DE SUCROSE

Le virus a été marqué à l'Uridine tritiée et purifié sur gradient de Tartrate-glycerol et un second gradient de sucrose 20%-70%. L'ARN a été extrait selon la technique habituelle (SDS à 1%, Protéinase K, Phénol et Chloroforme iso amylique). L'ARN resuspendu dans du tampon TNE (0,5% de SDS) a été centrifugé dans un gradient de sucrose (15%-30%; poids/volume) à 25000 tpm pendant 16 heures à 18°C dans un rotor SW10. Les fractions ont été collectées et une partie aliquot précipitée à l'acide trichloracétique. Ce précipité fixé sur un filte de cellulose a été traité par cocktail à scintillation avant d'être compté au compteur gamma.

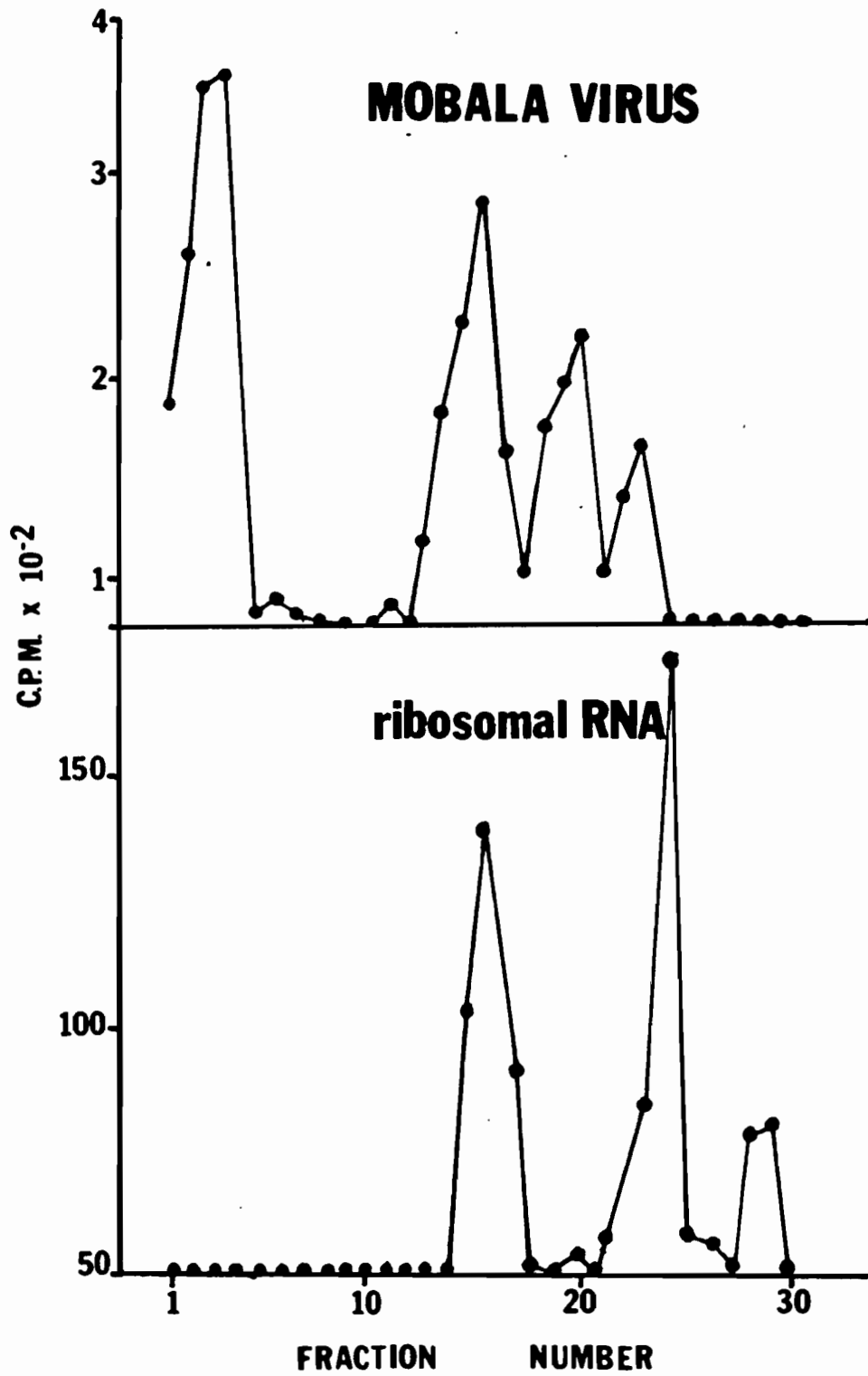


FIGURE 26 - RESOLUTION DES SEGMENTS D'ARN SUR GEL D'AGAROSE

L'ARN non marqué a été extrait comme dans la méthode de séparation sur gradient de sucrose (Fig.25). L'électrophorèse a été pratiquée sur un gel d'agarose (1,5%) à bas point de fusion (6 heures sous 100 volts). Les bandes de migration des ARN ont été visualisées par coloration au bromure d'éthyle et la lecture faite en lumière ultra-violette.

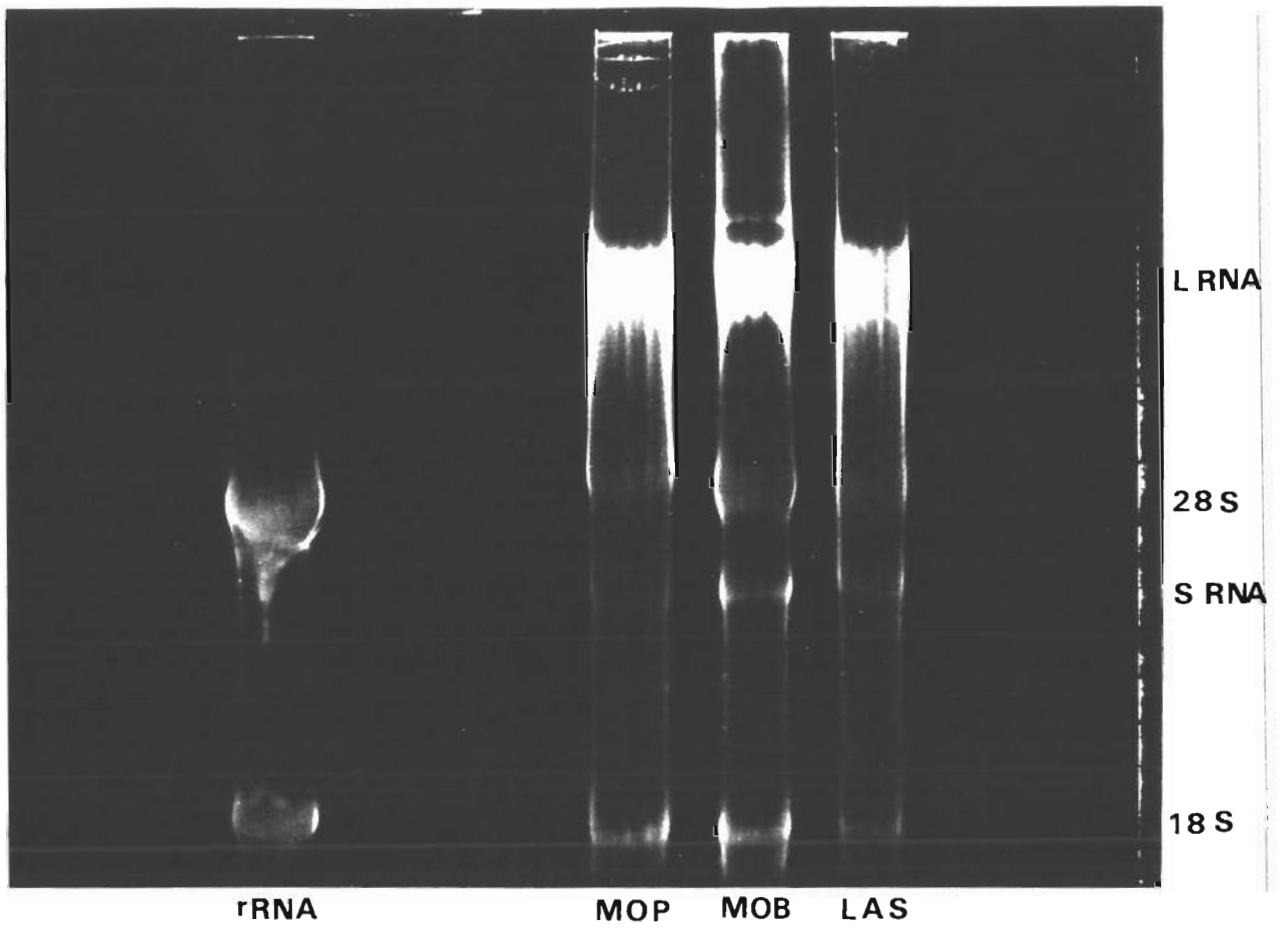
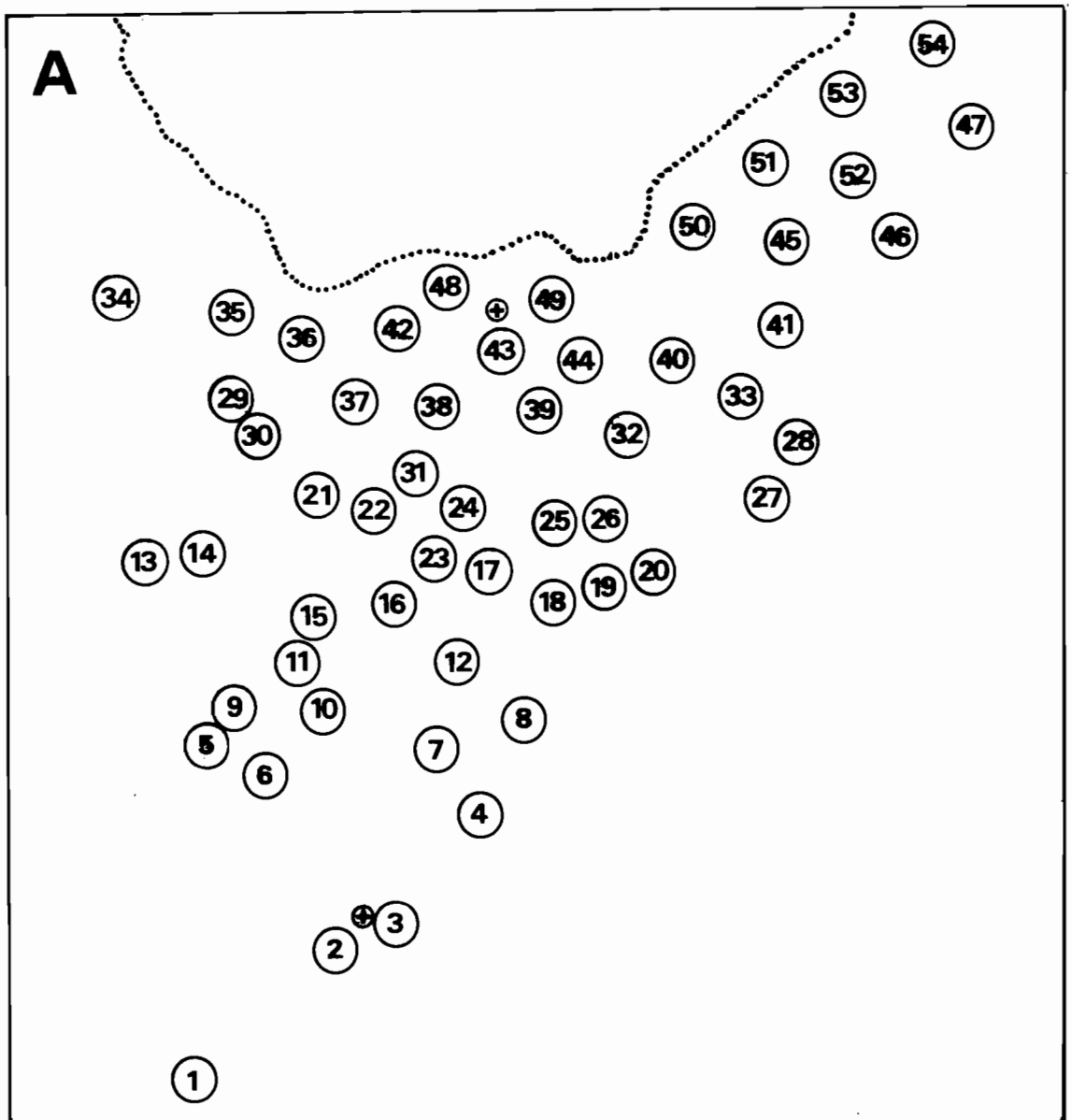
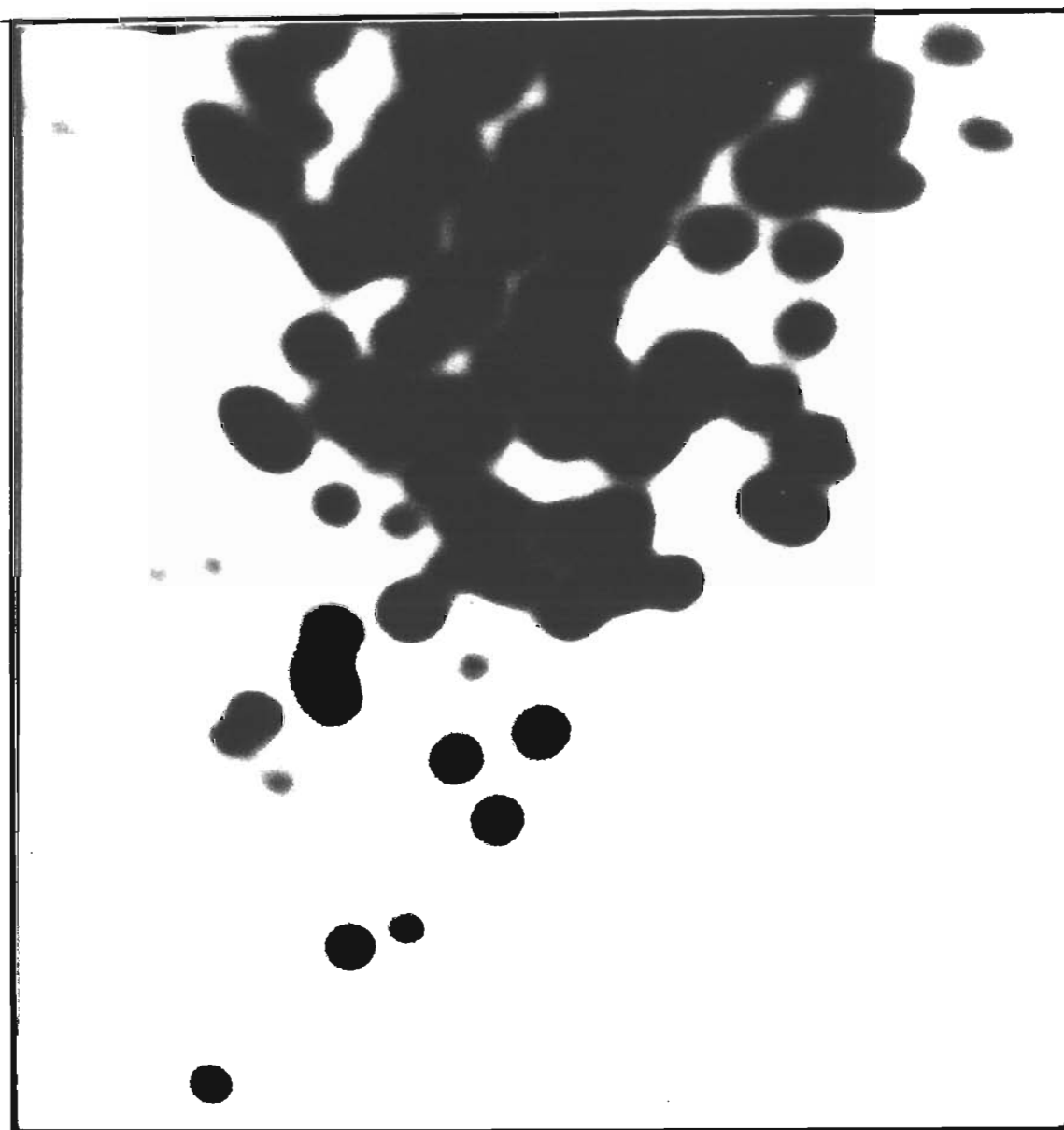


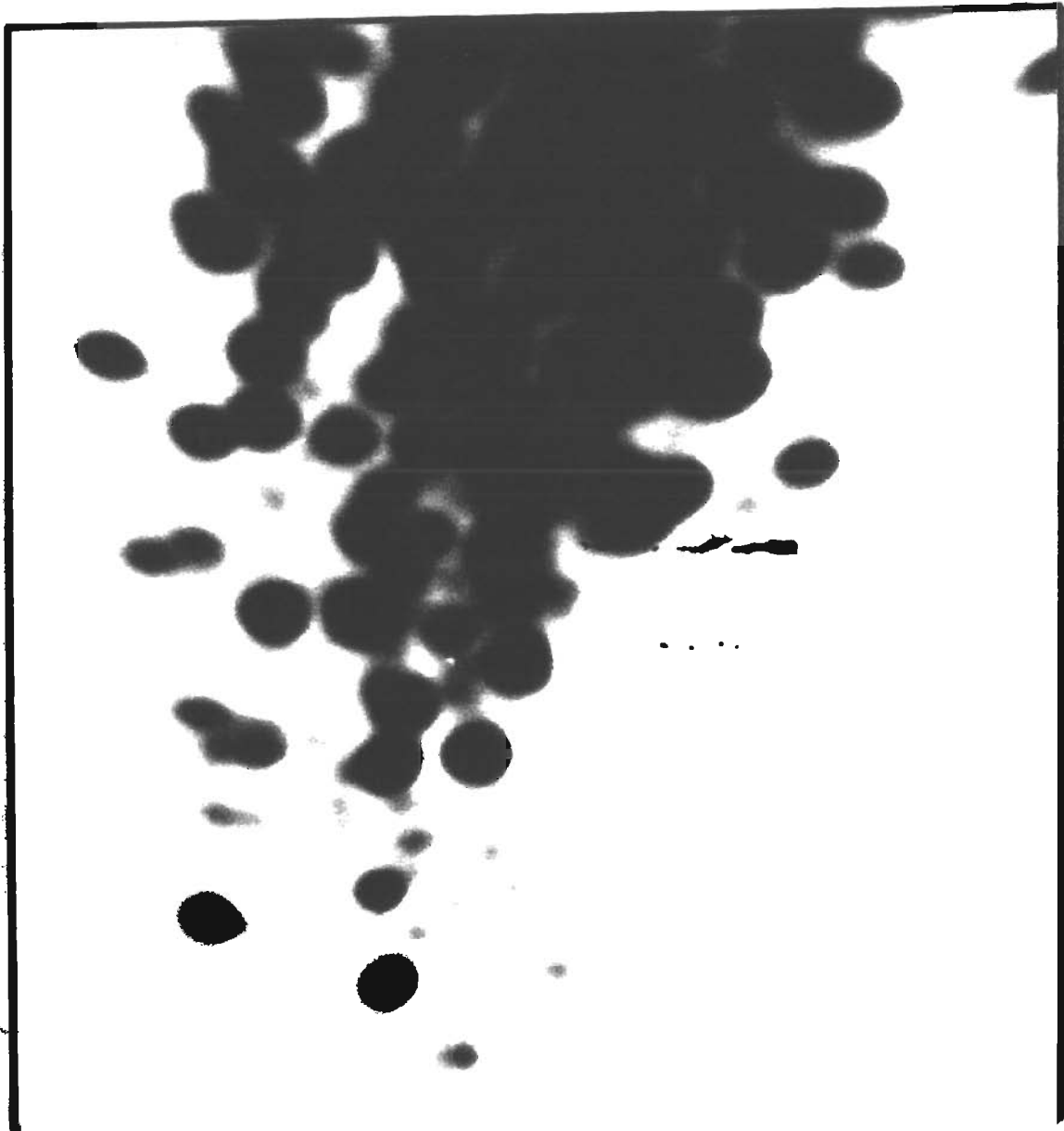
FIGURE 27- CARTE DES OLIGONUCLEOTIDES DE DIGESTION DES sRNA DES
VIRUS LASSA, MOPEIA ET MOBALA PAR LA RIBONUCLEASE T1

Les ARNS ont été isolé et réextraits après résolution sur gel d'agarose et excision des bandes de migration correspondantes. Les ARN ont été ainsi réextrait de l'agarose après fusion de celui ci dans du tampon TNE par la méthode au phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Les ARNS ainsi obtenus ont été traités de façon identique aux ARN totaux- Digestion par la ribonucléase T1, marquage au phosphore* utilisant l'ATP* en présence de polynucléotide kynase et électrophorèse en deux dimension de oligonucléotides marqués à leur extrémité 5".Après autoradiographie les cartes obtenues ont été directement interprétées.

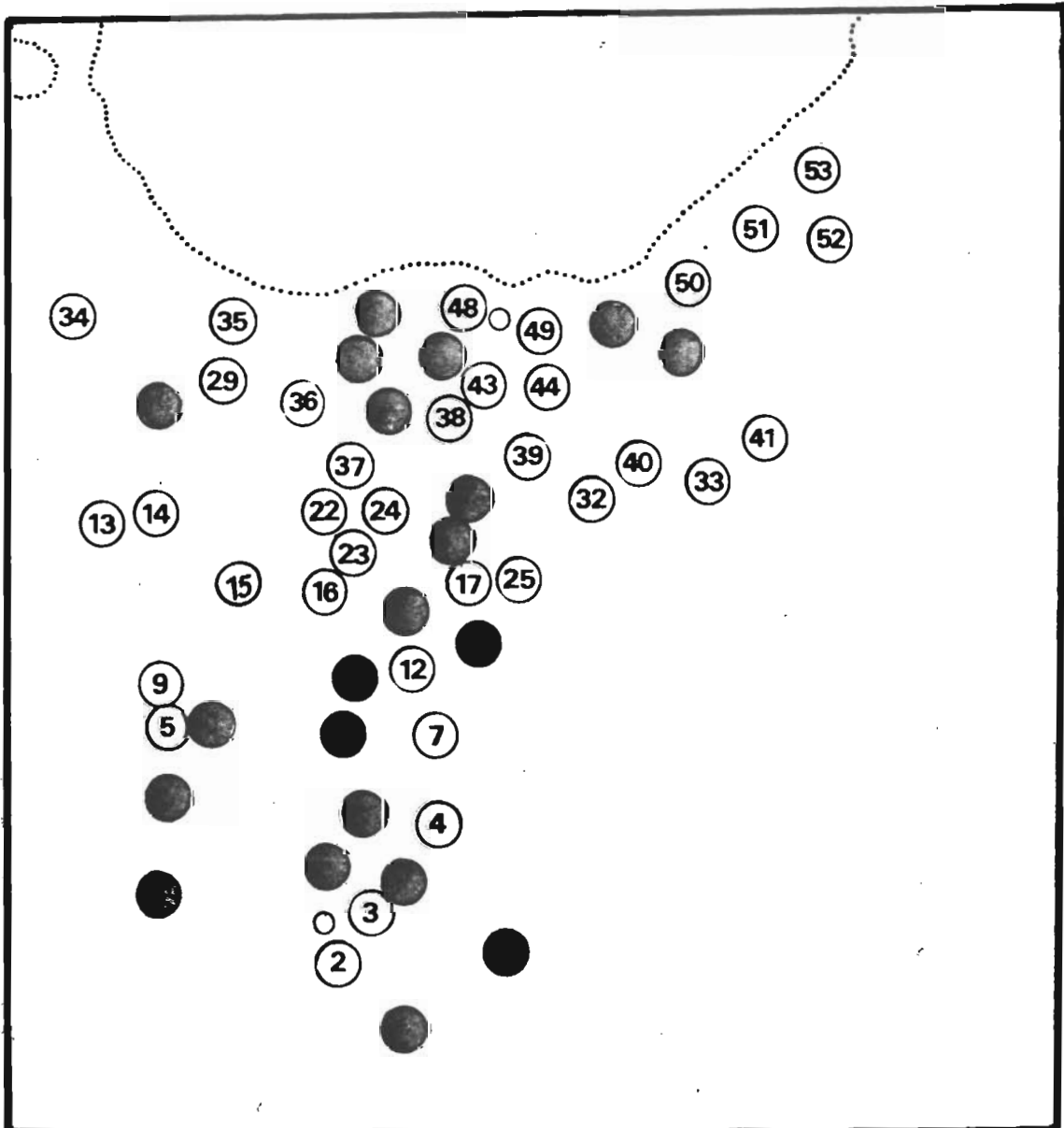
- A = ARNS de la souche clonée (Lp3) Lassa "Josiah humaine de Sierra Leone
- B = ARNS de la souche clonée (Mp3) Mopeia de rongeur du Mozambique
- C = ARNS de la souche clonée (A11) Mobala de rongeur de RCA
- D = ARNS de la souche sauvage (Fofana) Lassa humaine de Sierra Leone



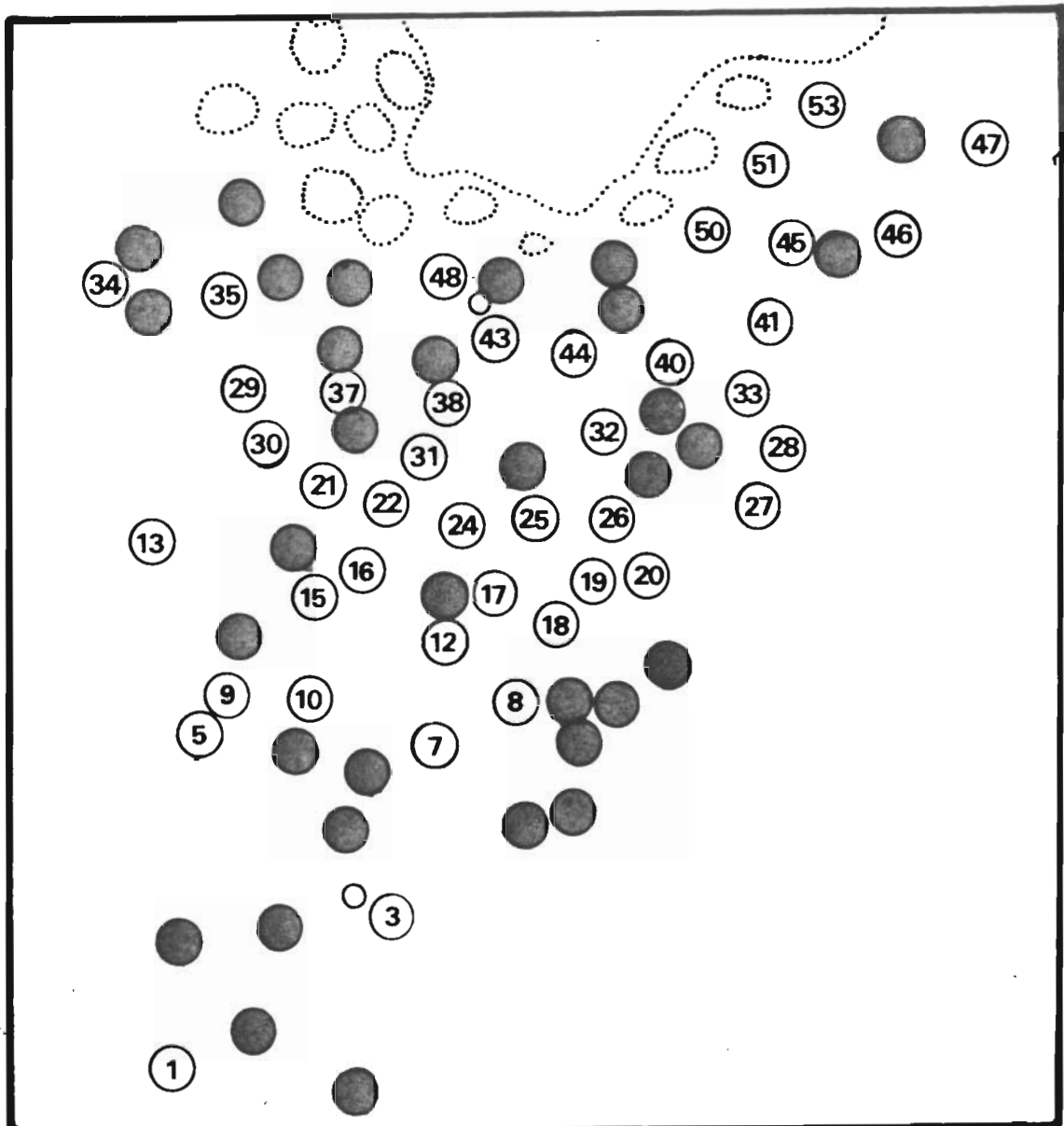




MOP SRNA



MOB SRNA



CONCLUSIONS

De par leur morphologie, leur biologie et leurs caractères physico-chimiques, les virus de la Fièvre de Lassa et ceux qui lui sont apparentés se classent, nous l'avons vu, dans la famille des arénaviridés. Si nombre de caractères analysés montrent les liens qui existent entre ces virus et les autres espèces virales de la famille, nous avons pu décrire toutefois une certaine originalité de groupe pour les arénavirus d'Afrique en les distinguant en particulier de ceux du Complexe Tacaribe. Enfin nous avons pu définir à l'intérieur de cet ensemble des individualités constituées par des isolats de même origine. Ainsi devons nous aujourd'hui considérer l'existence sur le continent africain d'une variété notable d'arénavirus possédant des caractères communs et pour lesquels le virus de Lassa, de par son antériorité d'isolement, sera considéré comme la souche prototype d'une entité taxonomique que nous proposons de nommer "Le Complexe Lassa".

On peut considérer que les viroses engendrées chez l'Homme par les arénavirus font partie de l'ensemble des zoonoses [Mohanty et Dutta, 1981; Acha et Szyfres, 1982]. Dans ce groupe des maladies animales transmissibles à l'Homme, une question apparaît immédiatement: pourquoi certains virus ou parasites faisant fi d'une spécificité d'hôte plus ou moins marquée, deviennent ils pathogènes pour l'Homme et quels sont les

mécanismes qui ont conduit à cette issue? Ainsi avons nous tenté pour les arénavirus, de retrouver le cheminement qui pourrait expliquer tout au moins en partie, leur situation actuelle.

Les quelques lignes qui vont suivre ne représentent ni une théorie, ni un modèle, elles ne font que regrouper des observations éparses et pourraient constituer une tentative dans la recherche sur l'origine des Arénavirus. On peut penser aisément que les arénavirus sont des virus de Rongeurs ; plusieurs observations peuvent être retenues dans ce sens et peu à l'encontre. En effet le virus Tacaribe est le seul de la famille à ne pas avoir été isolé de rongeur mais de chauve-souris. Cette différence mise à part, on a pu démontrer pour nombre de ces virus le phénomène d'infection chronique que ceux-ci sont susceptibles de provoquer chez le rongeur ; cela constitue une étape vers une forme de "parasitisme absolu". On reconnaît aisément à cet état parasitaire une valeur adaptative du germe par opposition à un comportement lethal qu'il pourrait développer vis à vis de l'hôte. Enfin, aucun vecteur arthropode n'a été mis en évidence in natura chez ces rongeurs infectés par des arénavirus, ce qui tend à montrer l'exclusivité d'hôte-réservoir de ces micromamifères. C'est ici qu'intervient la notion indispensable à l'histoire et à l'évolution qui est celle de chronologie des événements.

Quand et comment les virus ont-ils évolué ? Girard et Hirth [1980], concluent ainsi un de leurs ouvrages: "...les virus représentent un monde très particulier, bien défini et très varié, dont l'évolution s'est effectuée, et s'effectue encore

selon des règles qui lui sont propre, en parallèle avec l'évolution des espèces qu'ils parasitent". Nous retiendrons de cette proposition la notion de pérennité de l'infectant et de l'infecté, mais plus qu'une évolution parallèle qui est synonyme de séparée à l'infini, nous pensons plus volontiers que les arénavirus ont, quant à eux, coévolués; l'hôte et le parasite influant tour à tour sur son partenaire. On a pu démontrer que des souches de souris de laboratoire pouvaient génétiquement présenter un degré variable de sensibilité aux arénavirus allant de l'état d'infection létale à celui d'infection chronique [Webb et coll., 1973; Webb et coll., 1975; Jarhling et Peters "A role of mouse genotype in outcome of Lassa virus infection, non publié]; c'est sans doute là un modèle artificiel d'évolution "en raccourci" mais qui pourrait exister en partie dans la nature où les règles, alors un peu changées donneraient plus volontiers une évolution quantique vers certains des stades observés au laboratoire. Nous retiendrons que le virus peut donc influencer directement par sélection, l'évolution de son hôte. Si donc on pose, sans pouvoir en administrer la preuve, l'hypothèse d'une coévolution des arénavirus il nous faut alors, ce qui pourrait paraître plus aisé, retrouver au niveau planétaire les mouvements de populations de rongeurs qui ont pu amener une distribution des arénavirus comme nous la connaissons aujourd'hui. Les arénavirus, à l'exception du virus CML, occupent des zones géographiques limitées et leur circulation paraît se borner à un écosystème particulier propre à chaque type de virus, faisant intervenir un hôte-réservoir de spécificité plus ou moins étroite.

La famille de rongeurs la plus florissante en Afrique est celle des Muridés. C'est la plus nombreuse en genres et en espèces. Sur 90 genres de Rongeurs recensés en Afrique, 23 (soit 37,5%) appartiennent à la famille des Muridés, avec 90 espèces, et vraisemblablement la famille la plus nombreuse en individus [Delany et Happold, 1979]. Ainsi la plupart des enquêtes épidémiologiques ont-elles porté sur les spécimens les plus fréquemment rencontrés principalement dans l'environnement de l'Homme. Si l'on se réfère aux divers isolements d'arénavirus et à leur prévalence en anticorps chez les rongeurs d'Afrique, on constate que seule la sous famille des Murinés est concernée. Cette observation peut désigner ainsi un groupe préférentiel mais non exclusif comme réservoir de virus, ce que semblent être les Murinés d'Afrique vis à vis des arénavirus.

En ce qui concerne le virus CML, il semble bien avoir très tôt infesté le genre Mus musculus originaire du Turkestan. Ce genre s'est étendu peu à peu par le Nord en Europe Occidentale pour y donner l'espèce Mus mus musculus et par le Sud, en Asie du Sud Ouest puis en Afrique et de retour en Europe par la Péninsule ibérique avec l'espèce Mus mus domesticus. Aujourd'hui ces deux espèces sont porteuses du virus CML et ne croisent pas entre elles, ce qui laisse à penser que le virus préexistait dans l'espèce ancestrale avant sa double "migration" [F. Lehman Grube, In OMS, 1975, p. 626]. La "traversée" de l'Afrique par la souris porteuse du virus CML ou plus vraisemblablement d'un virus en voie de spéciation, se situerait au Pléistocène. A cette époque le retrait vers l'Ouest de la grande forêt

ombrophile qui barrait tout le continent dans sa partie équatoriale, aura favorisé le passage des vertébrés vers l'Afrique australe [Delany et Happold, 1979]. De plus au milieu du Pléistocène, un climat favorable de type paléartique [Maley, 1980] aura-t-il favorisé un contact entre les différents genres de rongeurs présents depuis le Pliocène et par conséquent un éventuel échange de virus. Au Pléistocène terminal d'importantes variations climatiques au niveau Africain et l'évolution de la zone saharienne vers un climat de type sahélien, sont autant de facteurs qui auront favorisé la diversification des espèces de rongeurs pour une adaptation à un biotope et leur ségrégation dans ces biotopes plus ou moins étendus. Reste à considérer le couple réservoir-virus, du point de vue de l'évolution microscopique. L'ARN évolue environ 10 000 fois plus vite que l'ADN si on considère le taux de mutations, délétions et recombinaisons [Holland et coll., 1982]. On peut aisément imaginer que dans un premier temps un arenavirus ancestral se soit trouvé isolé dans une même espèce de rongeurs laquelle s'est trouvée elle-même isolée, pour des raisons écoclimatiques, dans des écosystèmes identiques mais géographiquement distants. Les souches virales de même origine ont alors évolué et donné naissance à des souches antigéniquement proches mais différenciables et bien adaptées dans tous les cas à leur hôte. Les facteurs d'évolution de ces ARN ségrégués dans des conditions similaires seraient essentiellement dus au hasard; en effet on s'accorde aujourd'hui pour donner à la microévolution un potentiel de changement uniquement lié au hasard et non aux

mutations favorables ou non.

Pour nous résumer, la souris vectrice d'un arénavirus primordial aurait donc essaimé sur le continent africain où les Muridés déjà en place ont pu à leur tour recevoir ce virus et en ségréger des souches en raison des isolements de biotopes dus aux changements climatiques. Rappelons ici, que quelques rares Mus leqqada sp. ont été trouvés porteurs d'anticorps anti-Lassa en zone d'endémie [McCormick et coll., 1980; Gonzalez et coll., 1980]. Ainsi trouve-t-on aujourd'hui d'une part des arénavirus africains possédant des ressemblances antigéniques nettes avec le virus CML et d'autre part ces mêmes virus avec des caractères antigéniques différents acquis chez des hôtes de même espèce ou genre mais distants géographiquement. Enfin il est à remarquer que la relative stabilité de la région paléartique aura favorisé une bonne circulation du genre Mus et une "homogénéisation" des souches du virus CML en Europe. Chastel [1976] a pu montrer des variations phénotypiques de différentes souches du virus CML mais sans rapport avec l'antigénicité qui seraient donc liées à l'ARNL. L'apparition du pouvoir pathogène pour l'Homme de la souche Lassa reste une énigme et démontre un manque de caractère adaptatif chez ce virus témoin d'une évolution encore inachevée. L'absence du virus CML en Scandinavie pourrait être liée à des conditions climatiques.

De l'autre côté de l'Atlantique la situation est quelque peu différente ; les arénavirus du Nouveau Monde semblent à l'exception du virus Tacaribe, accepter comme hôtes

naturels les rongeurs de la sous famille des Hesperomyinés (famille des Cricétidés). Les Cricétidés sont semble-t-il apparus au Pliocène-Myocène, en Amérique Latine venant d'Amérique du Nord par l'isthme de Panama [Herskhovitz, 1966]. Ce sont de loin la famille la plus riche en espèces et en individus sur ce continent. Les espèces liées aux isolements d'arénavirus sont taxonomiquement assez proches (Arata, 1975) et démontrent ainsi une certaine homogénéité de ces virus dans le choix de leur hôte. Malgré la connaissance virologique plus ancienne et plus complète du complexe Tacaribe, la question de l'origine de ce groupe et de sa diversification demeure une énigme. Plusieurs éléments pourraient servir dans une telle quête. C'est d'abord le fait que, comme nous avons pu l'observer en Afrique les arénavirus semblent se limiter à une région plus ou moins étendue.

Les arénavirus, à l'exception du virus CML, occupent donc des zones géographiques limitées et leur circulation paraît se borner à un écosystème particulier propre à chaque type de virus et faisant intervenir un hôte-réservoir de spécificité plus ou moins étroite. Ainsi, ^{Webb et coll.} ~~K.M. Johnson~~ [in Lehmann-Grube 1973] ^{mellark} ~~mettent~~ ils l'accent sur la singulière répartition des arénavirus Machupo et Latino en Bolivie; en effet, chacun des virus semble occuper une zone géographique particulière sans interférer sur la zone de l'autre. Ainsi la fièvre hémorragique de Bolivie ne s'observe-t-elle que dans ^{la province de El Beni} ~~cette vallée du~~ et à quelques centaines de kilomètres de là, elle est absente et remplacée dans le même biotope et chez le même hôte, Calomys par le virus Latino, non pathogène pour l'homme. Ne sommes-nous pas ici dans la

situation des virus Lassa et Ebola séparés par moins de 500 Km? Malgré l'apparente aberration du virus dans le choix de son hôte, nous pouvons là aussi tirer quelques enseignements; en effet les cheiroptères sont taxonomiquement éloignés des rongeurs et on préfère leur trouver un ancêtre plus proche des insectivores ou des primates. Si l'on admet un ancêtre commun aux arénavirus du Nouveau Monde, le virus Tacaribe se serait séparé très précocément de la souche ancestrale; la ségrégation créée par une situation insulaire (Trinidad-Tobago) établie jusqu'à nos jours, l'aurait "forcé" au maintien chez un hôte (peut-être à l'origine accidentel) mais localement très représenté. Nous ne pouvons ~~toutefois~~ ^{malheureusement pas} aller plus loin pour le moment dans cette recherche sur l'origine des arénavirus du Nouveau Monde. Avec l'esquisse du complexe Lassa, Il est certain que l'étude comparative des arénavirus de part et d'autre de l'atlantique ne pourra qu'être riche en enseignement dans ce sens.

Pour ^{en} revenir aux arénavirus d'Afrique et étant donné le nombre réduit d'enquêtes systématiques consacrées à leur recherche sur le continent africain, l'extrême variété des biotopes rencontrés selon les latitudes et la quantité importante d'espèces de rongeurs ^{sont autant de facteurs qui nuisent à,} ~~présentes, on est en mesure de~~ penser que nombre d'arénavirus restent aujourd'hui encore inconnus. Si dans le futur des études se développaient dans ce sens, l'introduction de techniques nouvelles pour l'isolement faisant appel à des systèmes biologiques variés, à type de cultures cellulaires ou animaux de laboratoire, serait un facteur important dans la mise en évidence d'éventuels arénavirus méconnus. En effet ce rôle du

système utilisé dans la réussite de l'isolement avait déjà été démontré pour les arénavirus du Nouveau Monde. La découverte du virus Mobāla semble bien liée à l'utilisation des cultures cellulaires alors que de vastes enquêtes faites pendant des années pour les arbovirus ont ~~mis~~ ^{fait} inoculer des milliers de prélèvements faits sur des rongeurs au souriceau nouveau-né sans jamais donner lieu à l'isolement d'un arénavirus. Johnson en 1975 [OMS, 1975. p. 627], fort des expériences acquises aux Amériques sur le groupe Tacaribe, faisait la réflexion suivante: "In the case of arenavirus we now seem to have a situation in wich viruses are in search of rodents; I have a feeling that there are in fact many arenaviruses that are yet undiscovered".

Ceci n'est point une ^ocnclusion mais bien un prologue à l'introduction d'un nouveau paradigme sur l'évolution des virus; les arénavirus si délicatement placés semble-t-il dans leurs biotopes de l'Ancien et du Nouveau Monde apparaissent comme un matériel propice à une telle recherche. Comme les mammifères dans leurs errances^S avaient aidé Wegener à donner les fondements de ce qui devait devenir la théorie de la technique des plaques, les rongeurs nous aideraient-ils à comprendre l'origine et la diversification des arénavirus?

TABLEAU 18: ARENAVIRIDAE

Virus	Hôte naturel	Distribution	Auteurs
LCMV	<u>Mus musculus</u>	Amériques, et Europe	Amstrong Lillie, 1934
LASSA	<u>Mastomys ssp.</u>	Nigeria	Buckley and Casals, 1970
MOPEIA	<u>Mastomys natalensis</u>	Mozambique	Wulff et coll., 1977
MOPEIA "Z"	<u>Mastomys natalensis</u>	Zimbabwe	Johnson et coll., 1981
MOBALA	<u>Praomys jacksoni</u>	R.C.A.	Gonzalez et coll., 1983
JUNIN	<u>Calomys musculus</u>	Argentine	Parodi et coll., 1958
TACARIBE	<u>Artibeus jamaicensis trinitatis</u> <u>Artibeus literatus palmarum</u>	Trinidad	Downs coll., 1963
MACHUPO	<u>Calomys calosus</u>	Bolivie	Johnson et coll., 1965
AMAPARI	<u>Oryzomys gaeldi</u> <u>Neacomys quianae</u>	Brésil	Pinheiro et coll. 1966
PARANA	<u>Oryzomys buccinatus</u>	Paraguay	Webb et coll., 1970
TAMIAMI	<u>Sigmodon hispidus</u>	USA (Floride)	Calisher et coll., 1970
PICHINDE	<u>Oryzomys albicularis</u>	Colombie	Trapido and San Martin, 1971
LATINO	<u>Calomys calosus</u>	Bolivie	Webb et coll., 1973
FLEXAL	<u>Oryzomys sp.</u>	Brésil	Pinheiro et coll. 1977

FIGURE 28: REPARTITION DES ARENAVIRUS DANS LE MONDE

Légende:

- 1= Tacaribe
- 2= Machupo
- 3= Amapari
- 4= Parana
- 5= Tamiami
- 6= Pichinde
- 7= Latino
- 8= Flexal
- 9= CML
- 10= Lassa
- 11= Mopeia
- 12= Mobala

En grisé figure l'aire de répartition du virus de la Chorio Méningite Lymphocytaire de la Souris dans les pays où ce virus a été recherché et mis en évidence :Allemagne, Angleterre, Argentine, Autriche, Belgique, Brésil, Bulgarie, France, Hollande, Hongrie, Portugal, Tchécoslovaquie, Roumanie, URSS, USA.

(Chastel et coll.,1970; Assad et coll.,1980).



7. BIBLIOGRAPHIE CITEE

ACHA.P.M. & SZYFRES B.1982.La Choriomeningite lymphocytaire.In zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux.Office International des Epizooties edit., Paris: p.p.175-179

American Type Culture Collection.1983,4th ed.,p.145

ANON.T.,GRAU O.,SEGOVIA Z.M. & FranceFERNANDEZ M.T. 1976, J. Virol.18:833-838

ARMSTRONG C. and LILLIE R.D.1934,Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St.Louis encephalitis epidemic.Publ.Hlth.Rep. (Wash.)49:1019-27

ARMSTRONG C. and SWEET

ASSAAD F.,GISPEN R.,KLEEMOLA M.,SYRUCEK L. & ESTEVES K.1980,Neurological diseases associated with viral and Mycoplasma pneumoniae infections,Bull.OMS,58:297-311

BOULVERT Y. 1980. Esquisse de la carte phytogéographique de la Centrafrique au 1/1000000ème.Doc.ORSTOM.

BUCHMEIER M.J.,ELDER J.H. & OLDSTONE M.B.A.1978.Virology,89,123-135

BUCHMEIER M.J.,LEWICKI H.A.,TOMORI O.& JOHNSON K.M.1980,Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arenaviruses.Nature,288:486-487

BUCHMEIER M.J. and OLDSTONE B.A.1981,Molecular studies of LCM virus induced immunopathology: Developpment and caracterization of monoclonal antibodies to LCM virus, in:Replication of Negative Strand Viruses,D.H.L.Bishop and R.W.Compans edit.Amsterdam,Elsevier/North Holland.p.71-77

BUCKLEY S.M. and CASALS J. 1970, Lassa Fever a new disease of man from West Africa.III.Isolation and characterization of the virus.Am.J.Trop.Med.Hyg.,19:680-91

BURNET F.M. & FENNER F.1953,The production of antibodies.2d Ed.Macmillan,London and Melbourne.

CAREY D.E.,KEMP G.E.,WHITE H.A. et al.1974,Epidemiological aspects of 1970 epidemic, Jos, Nigeria.Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.,66:402-408

CARTER M.F.,BISWAL N. & RAWLS W.E..1974,Characterization of

nucleic acid of Pichinde virus. J. Virol., 11:61-68

CASALS J., BUCKLEY S.M. & CEDENO R. 1975, Antigenic properties of arenaviruses. Bull. Wld. Hlth. Org. 52:421-427

A CORRIGER A PARTIR D'ICI

CHABRAS A. Aperçu sur le climat centrafricain. ASECNA edit., Bangui, 1962: PP26

CHASTEL CL. 1970. Les arénavirus. Un nouveau groupe d'agents viraux d'importance médicale. Med Trop., 30, 801-808.

CHASTEL C., SOHIER R. et TERRAILLON J. 1970, Enquête sérologique sur la choro-méningite lymphocytaire en France, Rev. Hyg. et Méd. soc., 18:439-454

CLEGG J.C.S. and LLYOD G. 1983. Structural and cell-associated proteins of Lassa virus. J. Gen. Virol., 64:1127-1136

CLEVELAND P.H., WICKHAM M.G., GOLDBAUM M.H., WORTHEN D.M. 1981. A rapid and simplified solid-phase radioimmunoassay for antibody to soluble antigens using a filter manifold. J. Immunoassay, 2:117-136

CLEWLEY J.P. et DHL BISHOP. 1982. Oligonucléotide Fingerprinting of Viral Génomes. In new développements in practical virology: C.R. Howard Edit. Alan R. Liss, Inc., NY. pp 231-277

COX

DAJUZ R., Précis d'écologie. Bordas edit., Paris, 1982

DELANY M.J. and HAPPOLD D.C.D., Ecology of African mammals. Longman edit., London and New York, 1979

DELGUIDICE, R.A., and H.E. HOPPS. 1977. Mycoplasma infection in cell cultures, p. 57-39. Plenum Press, New York.

DOWNS W.G., ANDERSON C.R., SPENCE L., AITKEN T.H.G. & GREENHALL A.H., 1963. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12:640-646

EAGLE H. 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130:432-437

ELLIOTT L.H., McCORMICK J.B., JOHNSON K.M. 1982. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. J. Clin. Microbiol., 16:704-708

FARBER F.E. & RAWLS W.E. 1975. J. Gen. Virol., 26:21-31

FRAME J.D., BALDWIN J.M., GOCKE D.J. et al. 1970. Lassa Fever, a new virus from West Africa I. Clinical description and pathological

findings. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:670-676

FRASER D.W., Campbell C.C., Monath T.P., Eoff P.A. & Gregg M.B. 1974.

Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970 -1972. I. Epidémiologic studies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23: 1131-1139

GAKO G.P., VEZZA A.C., BISHOP D.H.L. & COMPANS R.W. 1977. Virology, 83 :84-85

GIRARD D.M. & HIRTH L., Virologie générale et moléculaire. Doin edit. Paris, 1980

GONZALEZ J.P., SALUZZO J.F. et GEORGES A.J. 1980, Fièvres hémorragiques à virus Lassa, Ebola, et Marburg en République Centrafricaine. II. Enquêtes sérologiques parmi les populations humaines de la Basse Lobaye. 13ème Conf. Tech. OCEAC-Yaounde, pp. 903 908

GONZALEZ J.P., McCORMICK J.B., SALUZZO J.F. & GEORGES A.J., 1983. An Arenavirus isolated from wild caught rodents (*Pracomys* sp.) in the Central African Republic. Intervirology, 19:105-112

GONZALEZ J.P., McCORMICK J.B., SALUZZO J.F. and GEORGES A.J. 1983. Les Fièvres Hémorragiques Africaines d'Origine Virale: Contribution à leur étude en République Centrafricaine. Cah. ORSTOM ser. Ent. med. Parasitol. XXI, 2:119-130

GONZALEZ J.P., BAUDON D. et McCORMICK J.B. 1984. Les fièvres hémorragiques africaines d'origine virale: premières données sérologiques obtenues dans les populations humaines de Haute Volta et du Bénin. Rapp. Tech. OCEAC. Bobodioulasso, Haute Volta, pp.

GONZALEZ J.P., BUCHMEIER M.J., ELLIOTT L.H., MITCHELL S.W., McCORMICK J.B. & KILEY M.P., 1984. Comparative analysis of several Lassa-like

arenavirus isolates from Africa, in "Molecular biology of Negative Strand Virus" (D.H.L. Bishop and R.W. Compans edit.) Elsevier/North Holland, New York.

GONZALEZ J.P., McCORMICK J.B., GEORGES A.J. & KILEY M.P. 1984. Mobla virus: Biological and physicochemical properties of a new arenavirus isolated in the Central African Republic. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), 135E:

HAYFLICK; HAMERLING monocl.

HERSHKOVITZ P. Mice, land and bridges and Latin American faunal interchange .In Wenzel R.L. & Tipton V.J. Ed., Ectoparasites of Panama. Chicago, Field Museum of National Hystory. 1966

HOWARD C.R. and YOUNG P.R. 1984. Variation among New and Old World arenaviruses, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 78:299-306

HUBERT B., MEYLAN A., PETTER F., POULETTE A., TRANIER M. 1982. Different species in genus *Mastomys* from western, central

and southern Africa (Rodentia: Muridae), Proc. Colloquium on Small African Mammals, Ann. Roy. Sci. Nat.

IVANOFF B., DUCUESNOY Ph., LANGUILLAT G., SALUZZO J.F., GEORGES A., GONZALEZ J.P. and McCORMICK J.B. 1982. Haemorrhagic fever in Gabon. I. Incidence of Lassa, Ebola and Marburg viruses in Haut Ogooué. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 76: 719-720

JACOB F. 1982. La logique du vivant

JOHNSON K.M., OCHENG D., GITAU L.G., SICHOGO A., TUKEI P.M., NGINDU A., LANGATT A., SMITH D.H., JOHNSON K.M., KILEY M.P., SWANEPOEL R., ISAACSON M. 1983. Viral haemorrhagic fever in Kenya, 1980-1981. Trop. Geogr. Med., 35: 43-47

JOHNSON K.M., TAYLOR P., ELLIOTT L.H., TOMORI O. 1981a, Recovery of Lassa-related arenavirus in Zimbabwe. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1291-94

JOHNSON K.M., ELLIOTT L.H., HEYMANN D.L. 1981b. Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurveys. J. Clin. Microb. 5, 14: 527-529

JOHNSON K.M., WEBENGA N.H., MACKENSI N.B. & coll. 1965, Virus isolation from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. Am. J. Trop. Med. Hyg., 14: 816-818

KEARNEYS mMnCl

KEENLYSIDE R.A., McCORMICK J.B., WEBB P.A., SMITH E., ELLIOTT L. & JOHNSON K.M. 1983, Case control study of Mastomys natalensis and humans in Lassa virus infected households in Sierra Leone, Am. J. Trop. Med. Hyg., 32: 829-837

KERN P., SCHMITZ H. & DIETRICH M. 1982. Recherches d'anticorps de Lassa dans les environs de Lambaréné-Gabon. 14^{ème} Con. Tech., OCEAC edit., Yaoundé, Cameroun: p377-379

KESSLER S.W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. Journal of Immunology 115, 1617-1624.

KILEY M.P., LANGE J.V. and JOHNSON K.M. 1979. Protection of Rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. Lancet, ii: 738

KILEY M.P., TOMORI O., REGNERY R.L. and JOHNSON K.M. 1981. Characterization of the Arenaviruses Lassa and Mozambique. In "The replication of Negative Strand Viruses", DHL Bishop and RW Compans edit., Elsevier North Holland, Inc. 1981. 1-9.

LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685

LEHMANN-GRUBE F. 1973, Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses, Springer-Verlag, Heidelberg, New York.

LEIFER E., BOCKE D.J. and BOURNE H. 1970. II Report of laboratory-acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease. Amer. J. Trop. med. & Hyg. 19: 677-679

McMASTER G.K. and CARMICHAEL G.C. 1979. Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 74: 4835-4848

McCORMICK J.B., JOHNSON K.M., WEBB P.A. AND KREBS J.W. 1980. Lassa Fever: Clinical, Virologic and Ecologic aspects. in Vth International Congress of Virology, Stassbourg, France. p. 200

MARTINI G.A., KNAUFF H.G., SCHMIDT H.A., MAYER G., BALTZAR G. 1938. Über eine bisher unbekante, von Affen eingeschleppte Infektionskrankheit: Marburg-Virus-Krankheit. Deutsch. Med. Wochr. 93: 559-571

MELCHERS F., POTTER M. and WARREN N.L. 1979. Lymphocyte Hybridomas. In "Current Topics in Microbiology and Immunology", Vol. 81, Edit MF, MP and WNL.

MIMS C.A. Observations on mice infected congenitally or neonatally with lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus. Arch. ges. Virusforsch., 30: 67-74 (1970).

MISONNE X., 1969. African and Indo-Australian Muridae-Evolutionary trends. Ann. Mus. Roy. Cent. Tervuren, Belgium. Ser. 1N-8°, N° 172; 6-24

MOHANTY S.B. & DUTTA S.K. Veterinary virology, Lea & Febiger edit., Philadelphia, 1981

MOLLENHAUER H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain. Technol., 39: 111-114

MONATH T.P. 1975. Lassa fever: Review of epidemiology and epizootiology. Bull. OMS., 52: 577-592

MONATH T.P., NEWHOUSE V.F., KEMP G.E., SETZER H.W., CACCIAPOUTI A. 1974. Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. Science, 185: 263-65

MURPHY F.A., WEBB P.A., JOHNSON K.M., WHITFIELD S.G. and CHAPPEL W.A. 1970. Arenaviruses in Vero cells: Ultrastructural Studies, J. Virol., 6, 4: 507-518

MURPHY F.A. and WITHFIELD S.G. 1975. Morphology and morphogenesis of arenavirus. Bull. WHO, 52: 409-419

NOWAK R.M., PARADISO J.L. 1983. In Walker's Mammals of the World. 4th edit., Johns Hopkins University Press, Baltimore-London, 735-737

Organisation Mondiale de la Santé. 1975, Symposium on arenavirus infections of public health importance, Bull. OMS, 52: 381-766

Organisation Mondiale de la Santé. 1981. Surveillance de la Fièvre de Lassa, Relevé épidém. hebdom., 6: 47

Organisation Mondiale de la Santé. 1982. Surveillance de la Fièvre de Lassa, Relevé épidém. hebdom., 7: 71

PAJOT F.X. 1973. Contribution à l'étude écologique d'Aedes (Stegomyia) simpsoni (Theobald), 1905. Diptera, Culicidae. Thèse d'Etat. pp. 1-327

PALMER E.L., OBIDJESKI J.F., WEBB P.A. & JOHNSON K.M., 1977. J. Gen. Virol. 36: 541-545

PARODI A.S., GREENWAY D.J., RUGGIERO H.R., RIVERO E., FRIGERIO M., DE LA BARRERA J.M., GARZON F., BOXACA M., DE GUERRERO L. & NOTA N., 1958.

Sobre la etiología del brote epidémico de junin. El Día Médico, 30: 2300-2302

PEDERSEN I.R. 1979. Structural components and replication of arenaviruses. Adv. Virus Research, 24: 277-330

PEDERSEN I.R. & KÖNIGSHOFER E. 1976. J. Virol., 20: 14-21

PETERS C.J., WEBB, P.A. and JOHNSON K.M. 1973. Measurement of antibodies to Machupo virus by indirect immunofluorescent technique. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 526-531

PETTER F. 1977, Les rats à mamelles multiples d'Afrique occidentale et centrale: Mastomys erythroleucus (Temminck, 1853) et M. huberti (Wroughton, 1908), Mammalia, 41: 441-444

RAMOS B.A., COURTNEY R.J. & RAWLS W.E. 1972. J. Virol., 10: 661-667

ROSEVEAR D.R. 1969, The rodents of West Africa. British Museum, London.

SALUZZO J.F., GONZALEZ J.F. et GEORGES A.J. 1980, Fièvres hémorragiques à virus Lassa, Ebola, et Marburg en République Centrafricaine. I. Enquêtes sérologiques parmi les populations humaines du M'Bomou (Sud-Est de la R.C.A.). 13ème Conf. Tech. OCEAC-Yaounde, June 1980, pp. 897-902

SILLANS R. 1959. Les savanes de l'Afrique centrale. Essai sur la physionomie, la structure et le dynamisme des formations végétales ligneuses des régions sèches de la République Centrafricaine. Ed. Lechevallier, Paris, pp. 423.

USDA 1977. Proposed biocontrol guidelines for agricultural and

biomedical laboratories. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control Edit., Office of Biosafety, Atlanta, Georgia. 30333. U.S.A.

VEZZA A.C. & BISHOP D.H.L. 1977. J. Virol., 24:712-715

WEZZA et coll. 1978

WEBB P.A., JOHNSON K.M., PETERS C.J. et coll., Behaviour of Machupo and Latino virus in Calomys callosus from two geographic areas of bolivia. Lehman-Grube Edit., In Lymphocytic Choriomeningitidis virus and other Arenaviruses. Berlin: Springer Verlag, 1973, pp. 313-322

WEBB P.A., JUSTINES G. & JOHNSON K.M., 1975. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. Bull. WHO, 52:493-499

WILDY P. 1971. Classification and Nomenclature of Virus. Monograph. Virology, 5:73.

WOODRUFF A.W., MONATH T.P., MAHMOUD A.F., PAIN A.K. and MORRIS C.A. 1973. Lassa Fever: report of an imported case. Br. Med. J. 3: 616-617

WULFF H., LANGE J.V. 1975a. Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infections. Bull. WHO, 52:429-436

WULFF H., FABIYI A., MONATH T.P. 1975b, Recent isolations of Lassa virus from Nigerian rodents, Bull. WHO, 52:609-613

WULFF H., McINTOSH B.M., HAMMER D.B., JOHNSON K.M. 1977, Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa. Bull. WHO, 55:441-444

WULFF H., LANGE J.V. and WEBB P.A. 1978. Interrelationships among arenavirus measured by indirect immunofluorescence. Intervirology, 9:344-350

WULFF, H., and K.M. JOHNSON. 1979. Immunoglobulin M and G responses measured by immunofluorescence in patients with Lassa or Marburg virus infection. Bull. W.H.O. 57:631-635.

ZINKERNAGEL

6. Tableaux et figures:

- Tableau 1: Prévalence en anticorps fluorescents anti-Lassa dans diverses populations humaines de R.C.A.
 Tableau 2: Prévalence en anticorps anti-Lassa dans divers groupes animaux de Centrafrique
 Tableau 3: Spécimens inoculés pour l'isolement du virus Mobala
 Tableau 4: Souches de virus Mobala isolés de rongeurs sauvages capturés en République Centrafricaine
 Tableau 5: Caractéristiques antigéniques de deux souches du virus Mobala dans la réaction d'immunofluorescence indirecte
 Tableau 6: Prévalence en anticorps humains anti Lassa dans différentes populations d'Afrique
 Tableau 7: Prévalence en anticorps fluorescents anti Mobala dans diverses populations humaines de R.C.A.
 Tableau 8: Sérologie comparée de sérums humains possédants des anticorps fluorescents contre les virus LAS, MOP et MOB
 Tableau 9: Prévalence en anticorps fluorescents anti-Lassa dans divers groupes animaux d'Afrique
 Tableau 10: Sérologie comparée de sérums animaux possédants des anticorps fluorescents contre les virus LAS, MOP et MOB
 Tableau 11: Poids moléculaires comparés des protéines structurales des virus Lassa, Mopeia et Mobala
 Tableau 12: Cinétique d'apparition des protéines virales intra-cellulaires du virus Mobala mises en évidence par IFI
 Tableau 13: Morphologie des plages
 Tableau 14: Analyse comparative de la répllication des virus Lassa, Mopeia et Mobala
 Tableau 15: Recherche d'un effet pathogène chez le souriceau nouveau-né par inoculation intracérébrale.
 Tableau 16: Inoculation de diverses souches d'arénavirus d'Afrique au souriceau nouveau-né
 Tableau 17: Identité des souches Mobala entre elles par utilisation des anticorps monoclonaux et IFI
 Tableau 18: Parentés antigéniques détectées par anticorps monoclonaux en IFI entre diverses souches d'arénavirus
 Tableau 19: Cinétique d'apparition des anticorps fluorescents chez le souriceau nouveau né
 Tableau 20: Pourcentage d'homologie des oligonucléotide T1 de l'ARN total du virus Lassa et de virus apparentés
 Tableau 21: Analyse des cartes oligonucléotidiques de divers arénavirus.
 Tableau 22: Homologie des oligonucléotide T1 des sARN des virus Lassa, Mopeia et Mobala.
 Tableau 23: Arénavirus

- Figure 1: Carte phytogéographique de la République Centrafricaine (D'après I. Boulvert, 1980).
 Figure 2: Carte des domaines phytogéographiques en Afrique.
 Figure 3: Carte des précipitations annuelles en République Centrafricaine (D'après R. Chabras, 1976).
 Figure 4: Le laboratoire de haute sécurité (ou Maximum Containment Laboratory) aux Centers for Disease Control
 Figure 5: Praomys
 Figure 6: Carte de répartition du sous-genre Mastomys en Afrique (D'après Hubert et coll., 1981)
 Figure 7: Paysages centrafricains où ont été capturés les rongeurs porteurs d'un nouvel arénavirus en Afrique.
 Figure 8: Carte de répartition des arénavirus isolés en Afrique et zones de prévalence en anticorps vis à vis du virus Lassa
 Figure 9: Le virus Mobala en microscopie électronique
 Figure 10: Inclusions virales intracellulaires dans les cellules Vero infectées par le virus Mobala en IFI
 Figure 11: Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines de structures
 Figure 12: Electrophorogrammes comparatifs en gele de polyacrylamide de plusieurs souches d'arénavirus d'Afrique.
 Figure 13: Immunoprécipitation en gel de polyacrylamide des protéines virale marquées par la méthionine³⁵
 Figure 14: Expérience de pulse-chase par immunoprécipitation et anticorps monoclonaux
 Figure 15: Cinétique d'apparition des protéines virales en culture cellulaire
 Figure 16: Densité de la nucléocapside en gradient de Chlorure de Césium
 Figure 17: Courbe d'intégration des différentes espèces d'ARN après électrophorèse sur agarose
 Figure 18: Courbe de croissance des virus Lassa, Mopeia et Mobala en cultures cellulaires de types Vero et BHK21
 Figure 19: Morphologie des plages en cultures cellulaires de type Vero
 Figure 20: Courbe de croissance des virus Lassa, Mopeia et Mobala
 Figure 21: Taux de survie des souriceaux nouveau né infectés avec différents arénavirus d'Afrique
 Figure 22: Finger Prints des ARN totaux
 Figure 23: Fonction de relation entre les oligonucléotides communs à deux ARN et le % de variation de leur séquence
 Figure 24: Séparation des segments d'ARN du virus Mobala en gradient de sucrose
 Figure 25: Séparation des segments d'ARN sur gel d'agarose pour leur réextraction et leur utilisation dans le FP sARN.
 Figure 26: Finger Print des sARN des virus Lassa, Mopeia et Mobala
 Figure 27: Géographie des Arénavirus

7. Le Virus de Lassa et les arénavirus d'Afrique,
bibliographie complète

- Anonyme, 1970. La fièvre de Lassa ou la peste de l'an 2000. Méd. Mondiale, n° 58:53-55.
- Anonyme, 1975. Unrecognized diseases in Africa. II. Lassa fever. Int. J. Epidemiol., Juin, 2:76-77.
- Anonyme, 1975. Lassa and Marburg Viruses. Med. J. Australia, 30 Août, 2: 333-334.
- Anonyme, 1975. Lassa fever. Brit. Med. J., 1:173-174.
- Arata, A.A., Gratz, N.G. 1975. The structure of rodent faunas associated with arenaviral infections. Bull. OMS, 52:621-627.
- Ardouin, C., Chevalier, J.M., Algayres, J.P. 1981. Les fièvres hémorragiques virales de Marburg, Lassa et Ebola. Med. Trop. 41: 191-199
- Arnold, R.B. and Gary, G.W., Jr., 1977. A neutralization test survey for Lassa fever activity in Lassa, Nigeria. Trans. Ry. Soc. Med. & Hyg. 71:152-154.
- Barnes, A.M., 1975. Problems of rodent control in rural tropical areas. Bull. WHO, 52:669-676.
- Berge, T.D. 1975. International Catalogue of Arboviruses, 2nd ed., DHEW Publ. No. (CDC) 75-8301. U.S. Dep. Health, Educ. Welfare, Public Health Serv., Washington, D.C.
- Best, E.W.R., 1976. The Lassa fever episode. Metro Toronto, August, 1976. Can. J. Publ. Hlth. 67:361-366. 359-360.
- Bowen, G.S., Tomori, O., Wulff, H., Casals, J., Noonan, A. and Downs, W.G., 1975. Lassa fever in Onitsha, East Central State, Nigeria, in 1974. Bull. WHO 52:599-604.
- Buckley S.M., Casals, J. 1970. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19:680-691.
- Buckley, S.M., Casals, J., Downs, W.G., 1970. Isolation and antigenic characterization of Lassa virus. Nature 227:174.
- Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O. et Johnson, K.M. 1980. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arenaviruses. Nature, 288, 5790:486-487.

Buchmeier, M.J. and Oldstone, B.A. 1981. Molecular studies of LCM virus induced immunopathology: Development and characterization of monoclonal antibodies to LCM virus. In "Replication of negative Strand viruses" D. H. L. Bishop and R. W. compans.: p. 71 - 77, Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Canonico, P.C., Jahrling, P.B. and Pannier, W.L. 1982. Antiviral efficacy of pyrazofurin against selected RNA viruses. Antiviral Res. 2:331-337.

Carey, D.E., Kemp, G.E., White, H.A., Pinneo, L., Addy, R.F., Fom, A.L., Stroh, G., Casals, J. and Henderson, B.E., 1972. Lassa fever: Epidemiological aspects of the 1970 epidemic, Jos, Nigeria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 402-408.

Casals, J. and Buckley, S.M., 1973. Lassa fever virus. In: Lehmann-Grube, G., ed. Lymphocytic Choromeningitis virus and other arenaviruses. Berlin, Springer, pp.325-340.

Casals, J. and Buckley, S.M. 1974. Lassa fever. Progr. Med. Virol. 18: 111-126.

Casals, J., Buckley, S.M. and Cedeno, R. 1975. Antigenic properties of the arenaviruses. Bull. WHO Vol., 52: pp.421-427

Casals, J. 1975. Arenaviruses. Yale J. Biol. Med., 48: 115-140.

Center for Disease Control, 1969. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Isolation and characterization of "Lassa" virus. Connecticut and New York. Morbidity and Mortality Weekly Report, 18:293-294.

Center for Disease Control, 1970. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Lassa virusinfection, Pennsylvania. Morbidity and Mortality Weekly Report, 19:123.

Center for Disease Control, 1970. Reports a laboratory infection of Lassa fever. Morbidity and mortality Weekly. Rep. 19(12):123.

Centers for Disease Cont. 1970. Lassa virus infection-Pennsylvania MMWR, 19:123.

Center for Disease Control, 1972. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Lassa fever, Sierra Leone. Morbidity and Mortality Weekly Report, 21:386-387.

Center for Disease Control, 1973. U. S. Department of Health, Education and Welfare. Follow-up on Lassafever, Sierra Leone. Morbidity and Mortality Weekly Report, 22:201-202.

Center for Disease Control, 1976. U. S. Department of Health, Education and Welfare. Possible Lassa fever - Washington, D. C. Morbidity and Mortality Weekly Report, 25:64.

Centers for Disease Control. 1981. Proposed Biosafety Guidelines for Microbiological and Biomedical Laboratories.

Centers for Disease Control. 1980. Recommendations for initial management of suspected or confirmed cases of Lassa fever. MMWR(supl);28:1S-125.

Clayton, A.J. 1975. Lassa fever - To Air Evacuate or not. In: Aeromedical Implication of Recent Experience with Communicable Disease. Agard Conf. Preprint n° 169, London: Tech. Edit. and Reproduction Ltd.

Clayton, A.J. 1977. Lassa immune serum. Bull. OMS, 55:435-439.

Cleeg, J.C.S. and Lloyd, G. 1983. Structural and cell associated proteins of Lassa virus. J. Gen. Virology, 64:1127-1136.

Demartini, J.C., Green, D.E. and Monath, T.P., 1975. Lassa virus infection in Mastomys natalensis in Sierra Leone. Gross and microscopic findings in infected and uninfected animals. Bull. WHO 52:651-663.

Edington, G.M. and White, H.A., 1972. The pathology of Lassa fever: A tribute to the late Dr. J.M. Troup. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 66:381-389.

Edmond, R.T.D., Bannister, B., Lloyd, G., Southee, T.J. and Bowen, E.T.W. 1982. A case of Lassa fever - clinical and virological findings. Brit. Med. J., 285:1001-1002

Elliott, L.H., McCormick, J.B., Johnson, K.M. 1982. Inactivation of Lassa, Marburg and Ebola viruses by gamma irradiation. J. clin. Microbiol. 16:704-708,

Fabiyi, A. and Tomori, O. 1975. Use of the complement fixation (CF) test in Lassa fever surveillance. Evidence for persistent CF antibodies. Bull. WHO 52:605-608.

Fabiyi, A. 1976. Lassa fever (Arenaviruses) as a public health problem. Virol. P. Bull., 4:335-337.

Frame, J.D., Casals, J. and Dennis, E.A. 1970. Lassa virus antibodies in hospital personnel in western Liberia. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73:219-224.

Frame, J.D., Baldwin, J.M., Gocke, D.J. and Troup, J.M., 1970. Lassa fever, a new virus disease from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19: 670-676.

Frame, J.D. 1975. Surveillance of Lassa fever in missionaries stationed in West Africa. Bull. WHO 52:593-598.

Fraser, D.W., Campbell, C.C., Monath, T.P., Goff, P.A. and Gregg, M.B. 1974. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. I. Epidemiologic studies. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 23: 1131-1139.

Fuller, J.G. 1975. Fever! The Hunt for a New Killer Virus. Ballantine Books, New York, N.Y. 10022, March.

Gentilini, M., Duflo, B. Carbon, C. Médecine Tropicale. Flammarion Médecine-Sciences, 75006 Paris.

Gilles, H.M. and Kent, J.C., 1976. Lassa fever: Retrospective diagnosis of two patients seen in Great Britain in 1971. Br. Med. J. Nov. 13, p. 1173.

Giroud, P., Le Gac, P., Ganzin, M., Gaillard, J.A. 1952. Le typhus murin de l'Dubangui est grave, il mériterait le nom de tropical, son diagnostic peut-être difficile, on peut y remédier par électrophorèse sur papier. Bull. Soc. Pathol. Exot., 45:306-310

Gonzalez, J. P., Saluzzo, J. F., Georges, A. J. 1980. Fièvres hémorragiques à virus Lassa, Ebola et Marburg en République Centrafricaine. II. Enquête sérologique parmi les populations humaines de la Basse-Lobaye. 13ème Conf. tech. OCEAC-Yaoundé, June, pp.903-908.

Gonzalez, J.P., Buchmeier, M.J., McCormick, J.B. et Kiley, M.P. 1983: a. - Comparative analysis of several Lassa-like Arenaviruses isolates from Africa. 5th International Symposium on Negative Strand Viruses (Sept. 83), Hilton Head, S.C., U.S.A.

Gonzalez, J.P., McCormick, J.B., Saluzzo, J.F. et Georges, A.J. 1983. Les fièvres hémorragiques africaines d'origine virales: contribution à leur étude en République Centrafricaine. Cahiers Microb. Parasitol. Ent. Méd. et Parasitol. ORSTOM Vol. XXI N°2: 119-130

Gonzalez, J.P., McCormick, J.B., Saluzzo, J.F., Hervé, J.P., Johnson, K.M. et Georges, A.J. 1983. An Arenavirus isolated from wild-caught Rodents Praomys species in Central African Republic. Intervirology, 19:2.

Gonzalez, J.P., McCormick, J.B., Saluzzo, J.F. and Georges, A.J. 1983. An arenavirus isolated from wild caught rodents (*Praomys* sp.) in the Central African Republic. Intervirology, 19, 2: 105-112.

Gonzalez, J.P., Buchmeier, M.J., McCormick, J.B., Elliott, L.H., Mitchell, S.W. and Kiley, M.P. 1984. Comparative analysis of several Lassa-like arenavirus isolates from Africa. In "Negative Strand Virus" DHL Bishop and R.W. Compans, eds. Elsevier/North Holland, New-York.

Gonzalez, J.P., Baudon, D. et McCormick, J.B. 1984. Les Fièvres hémorragiques africaines d'origine virale: Premières données sérologiques obtenues dans les populations humaines de Haute Volta et du Bénin. Rapp.Tech.OCCGE. Bobodioulasso, Haute Volta:pp.

Gonzalez, J.P., McCormick, J.B., Georges, A.J. and Kiley, M.P., 1984. Mobala Virus: Biological and Physicochemical properties of a new arenavirus isolated in the Central African Republic. Ann.Virol. (Inst.Pasteur), 135 E.:

Gratz, N.G., Arata, A.A. 1975. Problems associated with the control of rodents in Tropical Africa. Bull.WHO, 52:697-706.

Grundy, D.J., Bowen, E.T.W. and Lloyd, G. 1980. Isolated case of Lassa fever in Zaria, Northern Nigeria. Lancet, ii:649-650.

Henderson, B.E., Gary, G.W.Jr., Kissling, R.E., Frame, J.D. and Carey, D.E. 1972. Lassa fever: Virological and serological studies. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 66: 409-416.

Howard, C.R. and Simpson, D.I.H. 1980. The biology of the arenaviruses. J.Gen.Virol. 51:1-14.

International Symposium on Arenaviral infections of public Health Importance. Atlanta, Georgia, July 14-16, 1975. Bull.WHO, 52:381-766

Ivanoff, B., Duquesnoy, Ph., Languillat, G., Saluzzo, J.F., Georges, A.J., Gonzalez, J.P. and McCormick, J.B. 1982. Haemorrhagic fever in Gabon. I. Incidence of Lassa, Ebola and Marburg viruses in Haut Ogooué. Trans.Royal Soc.Trop.Med.Hyg., 76:719-720

Jahrling, P.B., Hesse, R.A., Eddy, G.A., Johnson, K.M., Callis, R.T., Stephen, E.L. 1980. Lassa virus infection of rhesus monkey: Pathogenesis and Treatment with ribavirin. J.Infect.Dis. 141: 580-589

Johnson, K.M. 1975. Status of arenavirus vaccines and their application. Bull.OMS, 52: 729-736.

Johnson, K.M. 1975. The arenaviruses: Some priorities for future research. Bull.OMS 52: 761-763.

Johnson, K.M., Webb, P.A., Lange, J.V., Murphy, F.A. 1977. Isolation and partial characterization of a new virus causing acute hemorrhagic fever in ZAïr. Lancet, i: 569-571.

Johnson, K.M., Elliott, L.H. et Heymann, D.L. 1981. a. - Preparation of Polyvalent Viral Immunofluorescent intracellular Antigens and use in human Serosurveys. J.Clin.Microb. 5, 14: 527-529.

Johnson, K.M., Taylor, P., Elliott, L.H., Tomori, D. 1981. Recovery of a Lassa-related arenavirus in Zimbabwe. Amer.J.Trop.Med.Hyg. 30: 1291-1294.

Johnson, B.K., Ocheng, D., Gitau, L.G., Gichogo, A., Tukei, P.M., Ngindu, A., Langatt, A., Smith, D.H., Johnson, K.M., Kiley, M.P., Swanepoel, R., Isaacson, M. 1983. Viral haemorrhagic fever in Kenya, 1980-1981. Trop.Geogr.Med. 35: 43-47.

Keane, E. and Gilles, H.M. 1977. Lassa fever in Panguma Hospital, Sierra Leone, 1973-1976. Br.Med.J. May 28: pp.1399-1402.

Keenlyside, R.A., McCormick, J.B., Webb, P.A., Smith, E., Elliott, L. and Johnson, K.M. 1983. Case Control study of Mastomys natalensis and human in Lassa virus infected households in Sierra Leone. Amer.J.Trop.Med.Hyg. 32: 829-837.

Kern, P., Schmitz, H., Dietrich, M. 1982. Recherches d'anticorps de Lassa dans les environs de Lambaréné-Gabon. 14ème Conf.Techn. OCEAC Edit.: P.377-379.

Kiley, M.P., Lange, J.V., Johnson, K.M. 1979. Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. Lancet, ii 2: 738.

Kiley, M.P., Tomori, D., Regnery, R.L. and Johnson, K.M. 1980. Characterization of the arenaviruses Lassa and Mozambique. In: Replication of negative Strand Viruses, D.H.L. Bishop and Compas. p.1-9, Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Knobloch, J., McCormick, J.B., Webb, P.A. ET AL. 1980. Clinical observations in 42 patients with Lassa fever. Trop.Med.Parasit. 31: 389-398.

Kuehne, R.W. 1973. Biological containment facility for studying infectious disease. Appl.Microbiol. 26: 236-243.

Le Gac, P. 1946. Recherche sur le Typhus de l'Dubangui-Chari. La maladie des Bougbous. Bull.Soc.Pathol.Exot. 39: 97-103.

Le Gac, P. 1946. Etude sur le Typhus Tropical des savanes de la Haute-Côte-d'Ivoire. Bull.Soc.Pathol.Exot. 39:86-94.

Lehman-Grube, F. 1971. Lymphocitic choriomeningitis Virus. Virology Monographs, 10, Springer-Verlag, New York.

Lehmann-Grube, F. 1975. Discussion of Woodruff, A.W. handling patients with suspected Lassa fever entering Great Britain. Bull. WHO 52:720-721.

Leifer, E., Gocke, D.J. and Bourne, H. 1970. II. Report of laboratory-acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease. Amer.J.Trop.Med.Hyg. 19: 677-679.

Lloyd, G., Bowen, E.T.W., Slade, J.H.R. 1982. Physical and chemical methods of inactivating Lassa virus. Lancet, i:1046-1048.

Lubashevich, I.S., Maryankova, R.F. and Fidarov, F.M. 1981. Acute and persistent infection of Vero cells with Lassa virus. Viruses, 4: 452-456

McCormick, J.B. and Johnson, K.M. 1978. Lassa fever: Historical review and contemporary investigation. Edited by S.R. Pattyn. in Ebola Virus Haemorrhagic Fever. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp.279-285.

McCormick, J.B., Webb, P.A. and Johnson, K.M. 1980. Lassa Immune plasma and ribavirin in the therapy of acute Lassa fever. Edited by R. A. Smith and W. Kirkpatrick. In Ribavirin: A broad Spectrum Antiviral Agent. New York: Academic Press., p.213.

McCormick, J.B., Johnson, K.M., Webb, P.A. and Krebs, J.W. 1980. Lassa fever: Clinical, Virologic and Ecologic aspects. In 5th International Congress of Virology, Strasbourg, France. p.200.

McCormick, J.B., Johnson, K.M., Webb, P.A. and Krebs, J.W. 1981. Lassa fever: Clinical, biologic aspects. In: Abstracts of the 5th International Congress of Virology, Strasbourg, p.200.

McCormick, J.B., Gonzalez, J.P., Kiley, P.M., Elliot, L.H. et Mitchell, S.A. 1982. Current evidence for similarities and differences among african arenaviruses using oligonucleotide mapping and monoclonal antibody. 31st Annual Meeting of the Am.Soc. Trop.Med.Hyg. (Nov.7-11), Cleveland, Ohio.

McCormick, J.B., Webb, P.A., Johnson, K.M., Kargbo-Reffel, F., Smith, E. Lassa virus infection patterns in rural villages. (Manuscript in preparation).

Mertens, P.E., Patton, R., Baum, J.J. and Monath, T.P. 1973. Clinical presentation of Lassa fever cases during the hospital epidemic at Zorzor, Liberia, March-April 1972. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 22:780-784.

Mohr, W., Brinkmann, U. 1975. Lassa fieber. Internist, 16:401-406.

Mohr, W., Brinkmann, U. Probleme der Klinik und Therapie einer neuen Arenavirus Infektion (Lassa-Fieber). Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 81 Band. Tagung Wiesbaden 6 - 10. 4. 75.

Monath, T.P., 1973. Lassa fever. Trop. Doctor 3:155-161.

Monath, T.P., Mertens, P.E., Patton, R., Moser, C.F., Baum, J.J., Pinneo, L., Gary, G.W., Jr. and Kissling, R.E. 1973. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April, 1972. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 22:773-779.

Monath, T.P., 1974. Lassa fever and Marburg virus disease. WHO Chronicle 28:212-219.

Monath, T.P., Newhouse, V.F., Kemp, G.E., Setzer, H.W., Cacciapouti, A. 1974. Lassa virus isolation from Mastomys natalensis rodents during an epidemic in Sierra Leone. Science 185:263-265.

Monath, T. P., Maher, M., Casals, J., Kissling, R. E. and Cacciapouti, A., 1974. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 23:1140-1149.

Monath, T.P. 1975. Lassa fever: Review of epidemiology and epizootology. Bull WHO. 52:577-592.

Monath, T.P. and Casals, J. 1975. Diagnosis of Lassa fever and the isolation and management of patients. Bull. WHO 52:707-715.

Monath, T.P. 1977. Lassa fever: Current problems and future prospects. Vestn. Akad. Med. Nauk. SSSR 5:35-42. (In Russian with Russian and English summaries).

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1969, CDC p.293.

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1970, CDC p.123.

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1971, CDC p. 59.

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1972, CDC pp.237,386.

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1973, CDC p. 202.

Morbidity and Mortality Weekly Reports, 1976, CDC Vol. 25. pp.8,9,10,11.

Moustardier,G. Virus de la fièvre de Lassa. Virolog.Méd.4ème édit.: P.701. Libr.Maloine S.A.,Edit.,21,R.de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris.

Murphy,F.A. ET AL. 1970. Arenaviruses in Vero cells : ultra structural studies.J.Virol., 6:507-518.

Murphy,F.A. ET AL. 1973. Ultra structural studies of arenaviruses. In: Lehmann-Grube,F., ed., Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenavirus.Berlin, Springer. : pp.273-285.

Murphy,F.A. Arenavirus taxonomy : A review 1975. Bull.WHO.52: 389-391.

Murphy,F.A. and Whitfield,S.G. 1975.Morphology and morphogenesis of arenavirus.Bull.WHO 52:409-419.

Murphy,F.A. and Whitfield,S.G. 1975. Morphology and morphogenesis of arenaviruses.Bull.WHO, Vol. 52:pp.409-419.

Murphy,F.A., 1977. Arenaviruses: Diagnosis of lymphocytic choriomeningitis, Lassa and other arenaviral infections. In: Kurstak and Kurstak, editors, Comparative Diagnosis of viral Diseases, Vol.I. Human and Related Viruses, Part A, pp.759-791.Academic Press, New York, San Francisco, London.

Murphy,F.A., Walker,D.H. 1978. Arenaviruses : persistent infection and viral survival in reservoir hosts.In E.Kurstak and K. Maramorosch (ed.). Virus and environment. Academic.Press. New York. p.155-180.

Myra,H. 1976. Lassa fever. In: Elisabeth - A true story,p.75. Fleming H. Revell Comp.Publishers Old Tappan,New Jersey.

Nathanson, N. 1975 : Directions for future research on the pathogenesis of arenaviral infections. Bull.WHO, 52:753-760.

Nielsen,G. 1974. Lassa fieber. Dtsch.Med.Wschr., 99:1319-1321

Organisation Mondiale de la Santé, 1975. Symposium on arenavirus infections of public health importance.Bull.OMS, 52:381-766.

- Organisation Mondiale de la Santé, 1976. Fièvre de Lassa. Relevé épidémique hebdomadaire, 11:86
- Organisation Mondiale de la Santé, 1976. Fièvre de Lassa. Expédition de spécimens cliniques pour le diagnostic de la fièvre de Lassa en laboratoire. Relevé épidém. hebdomadaire, 17:129.
- Organisation Mondiale de la Santé, 1977. Fièvre hémorragique d'origine virale. Relevé épidém. hebdomadaire, 21:177-180.
- Organisation Mondiale de la Santé, 1977. Fièvre hémorragique d'origine virale. Relevé épidém. hebdomadaire, 22:185-192.
- Organisation Mondiale de la Santé, 1981. Surveillance de la Fièvre de Lassa. Relevé épidém. hebdomadaire, 6:47.
- Organisation Mondiale de la Santé, 1982. Surveillance de la Fièvre de Lassa. Relevé épidém. hebdomadaire, 9:71.
- Pène, F., Touze, J.-E., 1976. La Fièvre de Lassa. Aspects cliniques et épidémiologiques. Gaz. Méd. France, (22 Octobre), 83:3211-3214.
- Pfau, C.J., Bergold, G.H., Casals, J. ET AL. 1974. Arenaviruses. Intervirology 4:207-213.
- Rawls, W.E. and Buchmeier, M. 1975. Arenaviruses: purification and physicochemical nature. Bull. WHO, Vol. 52:pp.393-401.
- Rawls, W.E. and Leung, W.-C. 1979. Arenaviruses. In Comprehensive Virology, Vol. 14: pp.157-192. Edit. H. Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner. New York: Plenum Press.
- Renemann, H.H. 1974. Transportation by Air of a Lassa fever Patient in 1974. In Aeromedical Implication of Recent Experience with Communicable Diseases. Agard Conf. Preprint N° 169, London: Tech. Edit. Reproduction Ltd., 1975.
- Rezapkin, G.V., Bashkirtsev, V.N., Tkachenko, E.A. ET AL. 1980. Investigation of the biochemical nature of complement-fixing antigen of arenaviruses. VOPR Virusol. 2:228-232.
- Rose, J.R., 1956. A new clinical entity? Lancet 2:197.
- Rose, J.R., 1957. An outbreak of encephalomyelitis in Sierra Leone. Lancet 2:914-916.
- Rowe, W.P., Murphy, F.A., Bergold, G.H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann-Grube, F., Mims, C.A., Traub, E., Webb, P.A. 1970: Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. J. Virol. 5:651-652.
- Saltzman, S. 1978. La Fièvre de Lassa: Etat des connaissances huit

ans après son identification. Edit. des Gr. Missionnaires. pp. 316.

Saluzzo, J.F., Gonzalez, J.P. et Georges, A.J. 1980. Fièvres hémorragiques à virus Lassa, Ebola et Marburg en République Centrafricaine. I. Enquêtes sérologiques parmi les populations humaines du M'Bomou (Sud-Est de la R.C.A.) 13ème Conf. Tch. OCEAC Yaoundé, June 1980: pp. 897-902.

Saluzzo, J.F., Gonzalez, J.P., Georges, A.J., Johnson, K.M. 1981. Mise en évidence d'anticorps vis-à-vis du virus Marburg parmi les populations humaines du sud-est de la République Centrafricaine. C.r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris 292: 29-31.

Saluzzo, J.F., Gonzalez, J.P. et Georges, A.J. 1982. Données récentes sur l'épidémiologie des fièvres hémorragiques dues aux virus Lassa, Ebola et Marburg en République Centrafricaine. 14ème Conf. Tech. OCEAC. Edit.: 362-369.

Sarrat, H., Camain, R., Baum, J. and Robin, Y., 1972. Diagnostic histopathologique des hépatites dues au virus Lassa. Bull. Soc. Path. Exot. 65: 642-650.

Schmitz, H., Knobloch, J., Dietrich, M. 1981. Prevalence of Antibodies to Lassa-virus in Liberia. Trop. Med. Parasit. 32: 200

Schumacher, W., Schmid, R. 1974. Transport eines Lassakranken mit einer Boeing 707. öff. Gesundh.-Wes. (Umschau), 36: 881-884

Simpson, D.I.H., Zuckerman, A.J. 1975. Lassa by letter. Lancet du 11 Octobre 1975, 2 (7937): 701-702.

Simpson, D.I.H. 1978. Viral haemorrhagic fevers of man. Bull. WHO 56: 819-832.

Smith, E.A., 1974. A review of Lassa fever outbreaks in Nigeria. Niger. Med. J. 4: 216-219.

Speir, R.W., Wood, O., Liebhaber, H., Buckley, S.M. 1970. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of vero cell cultures infected with Lassa virus. Amer. J. Trop. Med. & Hyg. 19: 692-694.

Thomas, I.L., Evans, S., Pinneo, L., Frame, J.D. 1976. Outbreaks of Lassa fever at the Vom Christian Hospital, Nigeria, 1974-1975 and 1976. Communication personnelle.

Troup, J.M., White, W.A., Fom, A.L. and Carey, D.E., 1970. An outbreak of Lassa fever on the Jos Plateau, Nigeria, in January-February, 1970. A preliminary report. Amer. Jour. Trop. Med. Hyg. 19:695-696

USDHHS. 197. Proposed biosafety guidelines for microbiological and biomedical laboratories. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control Edit. Office of Biosafety, Atlanta, Georgia, 30333. U.S.A.

Walker, D.H., Wulff, H., Lange, J.V. and Murphy, F.A., 1975. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea pigs and *Mastomys natalensis*. Bull. WHO 52:523-534.

Walker, D.H., Wulff, H. and Murphy, F.A., 1975. Experimental Lassa virus infection in the squirrel monkey. Amer. J. Path. 80:261-278.

Walker, D.H., Johnson, K.M., Lange, J.V., Gardner, J.J., Kiley, M.P. and McCormick, J.B. 1982. Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus. Journal of Infectious Diseases, 146.:360-368.

Walker, D.H., McCormick, J.B., Johnson, K.M., Webb, P.A., Kombo-Kono, G., Elliott, L.H., Gardner, J.J., 1982: Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. Amer. J. Pathol. 107:349-356.

Wannarka, G.L., Stephen, E.L. and Canonico, P.G. 1982. Preclinical evaluation in monkeys of a ribavirin regimen proposed for use in Lassa fever patients. Toxicol. Appl. Pharmacol. 64:155-159.

Webb, P.A., Krebs, J.B., Trippel, S.J. et al. 1982. Risk of Lassa virus transmission in hospital and village setting—three years study in West Africa. 4th International Conference on Comparative Virology. Banff, Alberta, Canada.

Weekly Epidem. Rec., 1972, Vol. 47, p.340. (Preliminary report of 11 cases of Lassa fever in Liberia in March of 1972.)

Weekly Epidem. Rec. 1972, Vol. 47, p.426. (Preliminary report of the identification of Lassa fever in Sierra Leone.)

Weekly Epidem. Rec. 1975. Vol. 50: pp.290-291. Biological hazards associated with *Mastomys*.

Weekly Epidem. Rec. 1976. Vol. 51, p.66. (Lassa fever surveillance. Reports isolation of a Lassa-like virus from *Mastomys natalensis* in Mozambique.)

Weekly Epidemiologic Record. 1981. Lassa fever surveillance; 56:47.

Weekly Epidemiologic Record. 1982. Lassa fever surveillance; 57:342

Weight, W.J., 1976. Lassa fever. Nurs. Times du 15 Avril, 72, (15) :578-579.

White, A. 1972. Lassa fever: A study of 23 hospital cases. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66:390-401.

Winn, W.C., Monath, T.P., Murphy, F.A. and Whitfield, S., 1975. Lassa virus hepatitis. Observation a fatal case from the 1972 Sierra Leone epidemic. Arch.Path. 99:599-604.

Winn, W.C., Jr. and Walker, D.H. 1975. The pathology of human Lassa fever. Bull.WHO, 52:535-545.

Woodruff, A.W., Monath, T.P., Mahmoud, A.F., Pain, A.K. and Morris, C.A. 1973. Lassa fever: Report of an imported case. Br.Med.J. 3:616-617.

Woodruff, A.W., 1975. Handling patients with suspected Lassa fever entering Great Britain. Bull.WHO, 52:717-721.

Wulff, H., Fabiyi, A. and Monath, T.P., 1975. Recent isolations of Lassa virus from Nigerian rodents. Bull.WHO 52:609-613.

Wulff, H., and Lange, J.V., 1975. Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. Bull.WHO 52:429-436.

Wulff, H., McIntosh, B.M., Hamner, D.B. and Johnson, K.M., 1977. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa. Bull.WHO 55:441-444.

Wulff, H., Lange, J.V., Webb, P.A. 1978 : Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. Intervirology 9: 344-350.

Wulff, H. and Johnson, K.M. 1979. Immunoglobulin M and G responses measured by immunofluorescence in patients with Lassa or Marburg virus infections. Bull. WHO 57:631-635.

Zweighthaft, R.M., Fraser, D.W., Hattwick, A.W., Winkler, W.G., Fordan, W.C., Alter, M., Wolfe, M., Wulff, H. and Johnson, K.M., 1977. Lassa fever : Reponse to an imported case. N.Engl.J.Med. 297: 803-807.