

Les arbovirus au Cameroun*

Isololements à partir de moustiques

[H. BROTTES]¹ A. RICKENBACH,² [P. BRÈS,³ J.-J. SALAÛN⁴ & L. FERRARA⁵

Une enquête portant sur l'inventaire et la répartition actuelle des arbovirus en République fédérale du Cameroun a entraîné, entre autres recherches, des tentatives d'isolement à partir des moustiques. Le présent travail expose les résultats obtenus en 1964-1965 après l'inoculation au souriceau nouveau-né de 351 lots représentant 19 320 moustiques capturés dans la région de Yaoundé. Dix souches d'arbovirus — virus Ntaya ou virus étroitement apparenté, virus Middelburg, virus Bunyamwera et virus Spondweni — ont été isolées et identifiées. La diversité de ces résultats, dans une région aussi étroitement délimitée, reflète sans doute la grande variété de la faune culicidienne locale. De nouvelles espèces ou groupes d'espèces de moustiques ont été impliquées dans l'isolement de ces virus. Pour trois de ceux-ci, Ntaya, Middelburg et Spondweni, il n'a jamais été démontré qu'ils étaient à l'origine d'infections humaines et, en l'occurrence, la recherche des anticorps sériques chez l'homme vivant à proximité des lieux de capture des vecteurs montre que ces virus ne se manifestent pas à un taux significatif sur le plan immunologique.

De nouvelles recherches seront donc nécessaires pour préciser le cycle animal éventuel de ces virus.

L'Institut Pasteur du Cameroun et l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer ont établi depuis le début de l'année 1964 un programme d'activités commun qui a pour but la prospection des arbovirus dans cette région de l'Afrique.

La situation géographique du Cameroun rend facilement prévisible l'existence d'arboviroses dans cette partie centrale de l'Afrique où le climat et la richesse de la faune (insectes et hôtes intermédiaires possibles) réalisent des conditions de transmission favorables. Une souche de virus Semliki (souche Kumba) a d'ailleurs été isolée en 1951 au Cameroun occidental (rattaché alors au Nigéria) à partir d'un lot d'*Eretmapodites grahami* (MacNamara, 1953).

Dès l'année 1963, un premier sondage sérologique à l'aide de prélèvements sanguins effectués dans différentes régions géographiques du Cameroun et

testés par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, avait été pratiqué dans le Service des Arbovirus de l'Institut Pasteur de Paris par l'un d'entre nous. Les résultats de ces premiers tests avaient montré que des anticorps actifs contre les virus du groupe A aussi bien que contre ceux du groupe B étaient présents dans un pourcentage notable des sérums examinés et ces premières constatations nous encouragèrent à pratiquer des tentatives d'isolement.

L'enquête sérologique s'est poursuivie sur place et porte actuellement sur 3800 sérums originaires de nombreuses régions. Elle fera l'objet d'une communication séparée.

Quant aux tentatives d'isolement, elles ont commencé depuis le début de l'année 1964 à partir de deux sources principales:

- a) les malades atteints d'une affection fébrile;
- b) les moustiques.

Nous exposons ici les résultats obtenus à partir des vecteurs de mars 1964 à décembre 1965.

En raison des moyens encore limités dont nous disposons et des difficultés de liaisons rapides avec les régions éloignées de nos laboratoires, notre prospection s'est bornée, pendant ces deux premières années, à la région périphérique de Yaoundé où est implanté l'Institut Pasteur du Cameroun.

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

* Travail de l'Institut Pasteur du Cameroun, de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM), Centre de Yaoundé, Cameroun et de l'Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.

¹ Directeur de l'Institut Pasteur du Cameroun, Yaoundé.

² Directeur de Recherches à l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre de Yaoundé.

³ Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar.

⁴ Chef de Service à l'Institut Pasteur du Cameroun.

⁵ Technicien entomologiste, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre de Yaoundé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

DESCRIPTION GÉOGRAPHIQUE
DE LA RÉGION PROSPECTÉE

Nos investigations ont porté sur la région de Yaoundé dans un rayon maximal de 80 km.

Cette région fait partie de la vaste pénéplaine qui occupe le centre-sud du Cameroun. Autour de Yaoundé, son altitude moyenne est de 600-700 m. Elle présente cependant des hauteurs parfois importantes, notamment au nord et à l'ouest de Yaoundé où des collines abruptes s'élèvent à quelques centaines de mètres au-dessus de la ville, qui culmine elle-même à 795 m, et à l'est, au nord de la route de Yaoundé à Akonolinga. Ailleurs, le modelé est beaucoup plus arrondi. La zone prospectée est délimitée au nord par la vallée de la Sanaga (altitude 440 m à Nachtigal) et au sud par la vallée du Nyong (altitude 632 m à Ebogo).

Le climat est du type équatorial, pluvieux et chaud, néanmoins tempéré par l'altitude, avec quatre saisons bien marquées: une grande saison sèche de décembre à février, une petite saison des pluies de mars à juin, une petite saison sèche en juillet et août, enfin une grande saison des pluies de septembre à novembre.

A Yaoundé, il tombe annuellement près de 1600 mm de pluies, le minimum de précipitations se plaçant en décembre-janvier et le maximum en septembre-octobre. Le degré hygrométrique moyen varie de 76% en février à 83% en août, l'amplitude journalière moyenne variant de 21% en juillet à 35% en janvier. La température moyenne annuelle est de 22°C. La température minimale moyenne mensuelle la plus faible est de 19°C de juin à octobre; la température maximale moyenne mensuelle la plus forte est de 30°C en avril.

La majeure partie de la région prospectée est comprise dans la zone de forêt semi-décidue à *Celtis* et Sterculiacées, frange septentrionale de la forêt dense humide de moyenne altitude (*deciduous forest* des auteurs anglais). En fait elle est souvent dégradée par l'homme en particulier aux abords des routes et des villages où l'on rencontre cultures vivrières et industrielles (cacao), jachères, broussailles arbustives, palmier à huile, etc. Au nord, à partir d'Obala, la forêt s'arrête brutalement, faisant place à des formations graminéennes de savanes entrecoupées de galeries forestières.

Cinq localités ont fourni les moustiques à partir desquels ont été isolées les souches de virus. Deux,

Nkolbisson et Ofoumsek, présentent les caractères de forêt dégradée par l'homme décrits ci-dessus. La centrale électrique de Yaoundé est à 10 km de Yaoundé et à 2 km seulement de Nkolbisson; les captures ont été effectuées dans la forêt qui entoure la concession. Par Okola, on entend les quelques villages qui précèdent la petite ville d'Okola, sur la route de Yaoundé, où les captures ont été faites dans les bananeraies. A Akonolinga, les captures de nuit ont été opérées sur la berge escarpée qui domine la plaine inondée du Nyong.

MATÉRIEL ET MÉTHODES
D'ISOLEMENT DES VIRUS

Toutes nos captures ont été faites au niveau du sol, les unes de nuit sur appât humain, les autres de jour au filet dans la végétation basse sous forêt. Ces dernières se sont montrées de loin les plus intéressantes, car les captures de nuit ne nous ont fourni que 5 espèces sur les 46 espèces ou groupes d'espèces inoculées.

Les captures ont eu lieu en deux périodes très inégales, la première du 10 mars 1964 au 11 juin 1965, la seconde du 9 novembre au 31 décembre 1965.

Huit captures de nuit et 192 captures de jour ont été effectuées en vingt points de la région de Yaoundé (voir carte).

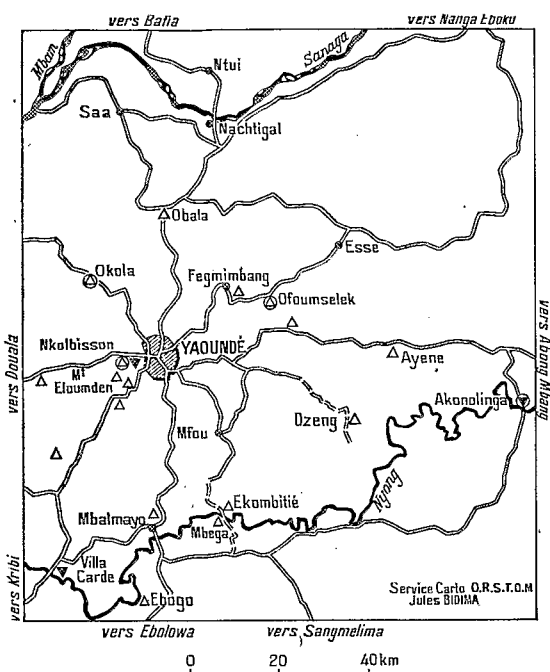
Captures de nuit

Les captureurs avaient les jambes nues. Ils étaient munis chacun d'une lampe électrique qu'ils n'allumaient que lorsqu'ils sentaient la piqûre. Le moustique était aussitôt capturé dans un tube de verre de 60 mm x 14 mm immédiatement bouché au coton. La rapidité des captureurs était suffisante pour que la plupart des moustiques n'aient pas le temps de se nourrir. Les tubes étaient relevés toutes les heures et conservés dans un réfrigérateur portatif à gaz. Le lendemain matin, les moustiques étaient apportés au laboratoire à Yaoundé où ils étaient aussitôt identifiés.

Captures de jour

Nous avons pratiqué deux ou trois captures par semaine pendant toute la durée des deux périodes de captures. Cent soixante-huit d'entre elles, sur un total de 192, ont eu lieu à Nkolbisson qui présente le double avantage de n'être qu'à 8 km de Yaoundé et

POINTS DE CAPTURES DANS LA RÉGION DE YAOUNDÉ



maximum 479), correspondait à une localité et, dans la mesure du possible, ne comportait qu'une seule espèce ou un seul groupe d'espèces. Cependant, dans les localités rarement visitées, les espèces peu abondantes étaient groupées en un seul lot. Il en fut de même lors des captures faites à Nkolbisson: jusqu'en juin 1964 pour les *Culex* qui, nous y reviendrons, n'étaient pas alors déterminés spécifiquement et, jusqu'en avril 1964 seulement, pour les autres moustiques. A partir de mai 1964, la plupart des lots furent constitués d'une seule espèce, mais ils étaient le résultat de plusieurs captures successives.

Trois cent cinquante et un lots ont été inoculés, totalisant 19 320 femelles.

Cent seize espèces, sous-espèces ou variétés ont été identifiées. Elles feront l'objet d'un article ultérieur. Quarante-six espèces ou groupes d'espèces ont été inoculés (tableau 1).

Conservation des moustiques

En général, les moustiques femelles sont à la disposition du service de virologie quelques heures après leur capture et, sans attendre la digestion d'un éventuel repas sanguin dont le délai entraîne souvent une mortalité importante, les insectes sont placés à la température de -65°C . L'observation et l'expérience nous ont montré que très peu de femelles étaient gorgées et les risques de neutralisation d'un virus éventuel par les anticorps présents dans le sang ingéré sont réduits au minimum. La préparation de l'inoculum a lieu quelques jours ou quelques semaines après le stockage à grand froid.

Préparation des suspensions, inoculation et surveillance

Les techniques utilisées¹ sont directement inspirées de celles de l'East African Virus Research Institute à Entebbe, Ouganda.

La durée d'observation des animaux inoculés est fixée à 14 jours. On n'a pas procédé à des passages aveugles.

MÉTHODES D'IDENTIFICATION DES VIRUS

Les épreuves sont conduites selon les procédés exposés par Casals (1961):

a) titrages par inoculation de série de dilutions décimales;

de posséder une faune culicidienne nombreuse et variée.

Les séances de captures étaient de 3 ou 4 heures consécutives, le plus souvent le matin, quelquefois l'après-midi. Nous avons utilisé de 3 à 9 captureurs.

Ceux-ci, munis chacun d'un filet de tulle moustiquaire, marchaient lentement en forêt dans la végétation basse. Les moustiques, chassés de leurs lieux de repos, étaient capturés au vol et recueillis individuellement en tubes de verre. Ils étaient apportés au laboratoire le même jour. Lorsque les captures avaient lieu ailleurs qu'à Nkolbisson, les moustiques étaient conservés en glacière pendant la durée du trajet de retour.

Identification des moustiques

Au laboratoire, les moustiques vivants étaient déterminés un à un à la loupe binoculaire dans leur tube et triés par espèces ou groupes d'espèces.

Chaque lot, formé en moyenne de 50 femelles pour les captures de jour (minimum 2, maximum 501) et de 159 pour les captures de nuit (minimum 9,

¹ Bres, P. (1963) *Techniques de laboratoire pour l'étude des arbovirus*, document non publié de l'Institut Pasteur de Dakar.

TABLEAU 1
NOMBRE DE FEMELLES INOCULÉES PAR ESPÈCE

Espèce	Nombre
<i>Aedes (Aedimorphus) groupe tarsalis</i> (Newstead)	1861
A. (A.) groupe <i>abnormalis</i> (Theobald)	55
A. (A.) groupe <i>domesticus</i> (Theobald)	227
A. (A.) <i>argenteopunctatus</i> (Theobald)	18
A. (A.) <i>mutilus</i> Edwards	212
A. (A.) <i>capensis</i> Edwards	12
A. (A.) <i>simulans</i> (Newstead et Carter)	98
A. (A.) <i>rickenbachi</i> (Hamon et Adam)	374
A. (A.) <i>cumminsi</i> (Theobald)	1815
A. (<i>Neomelaniconion</i>) groupe <i>palpalis</i> (Newstead)	1030
A. (A.) <i>circumluteolus</i> (Theobald)	43
A. (N.) <i>jamoti</i> Hamon et Rickenbach	76
A. (<i>Pseudarmigeres</i>) <i>kummi</i> Edwards	194
A. (<i>Stegomyia</i>) <i>simpsoni</i> (Theobald)	16
A. (S.) <i>africanus</i> (Theobald)	7
A. (S.) <i>apicoargenteus</i> (Theobald)	2
<i>Culex (Culex) guarti</i> Blanchard	57
C. (C.) <i>ingrami</i> Edwards	9
C. (C.) <i>weschei</i> Edwards	243
C. (C.) <i>moucheti</i> Evans	218
C. (C.) <i>pruina</i> Theobald	619
C. (C.) <i>annulioris</i> ssp. <i>consimilis</i> Newstead	13
C. (C.) <i>poicillipes</i> (Theobald)	29
C. (C.) <i>telesilla</i> De Meillon et Lavoipierre	2309
C. (<i>Culiciomyia</i>) <i>nebulosus</i> Theobald	1190
C. (C.) <i>cinereus</i> Theobald	1485
C. (<i>Lutzia</i>) <i>tigrripes</i> Grandpré et Charmoy	16
C. (<i>Neoculex</i>) <i>albiventris</i> Edwards	509
C. (N.) groupe <i>rima</i> Theobald	2
<i>Culex</i> spp. indéterminé	1260
<i>Cullseta (Theomyia) fraseri</i> (Edwards)	3
<i>Eretmapodites</i> groupe <i>chrysogaster</i> Graham	1717
E. groupe <i>inornatus</i> Newstead	264
E. groupe <i>oedipodius</i> Graham	390
E. <i>leucopus</i> Graham	78
<i>Mansonia (Coquillettidia) pseudoconopas</i> (Theobald)	427
M. (C.) <i>maculipennis</i> (Theobald)	7
M. (<i>Mansonioides</i>) <i>africana</i> Theobald	1653
<i>Uranotaenia bilineata</i> Theobald	4
U. b. var. <i>connali</i> Edwards	4
U. <i>annulata</i> var. <i>apicoaeniata</i> Theobald	1
U. <i>mashonaensis</i> Theobald	1
<i>Anopheles (Anopheles) paludis</i> Theobald	284
A. (<i>Cellia</i>) <i>hargreavesi</i> Evans	407
A. (C.) <i>moucheti</i> Evans	13
A. (C.) <i>smithi</i> var. <i>rageaui</i> Mattingly et Adam	68

b) filtrabilité à travers un filtre Millipore de 0,22 μ de porosité;

c) conservation du titre après lyophilisation;

d) tests au désoxycholate de sodium et à l'éther;

e) essai de mise en évidence d'une hémagglutinine.

Nous cherchons également à observer les lésions cérébrales expérimentales qui nous semblent assez caractéristiques pour avoir une réelle valeur d'orientation du diagnostic vers le groupe des arbovirus. Le prélèvement intéresse le cerveau de souriceau laissé *in situ* dans la boîte crânienne, ce qui permet de mieux observer les lésions méningées et évite les manœuvres traumatisantes.

Chastel (1963) a étudié avec minutie les lésions histologiques expérimentales provoquées par le virus chikungunya isolé au Cambodge. Nous nous sommes inspirés de ses observations et de ses commentaires pour reconnaître les lésions caractéristiques chez nos souriceaux. En outre, la plupart des pièces ont été envoyées au Service d'anatomo-pathologie de l'Institut Pasteur de Paris, et nous remercions particulièrement ici les D^{rs} Levaditi et Destombes.

Une étude comparée avec les encéphalites provoquées par les autres virus pathogènes en inoculation intracérébrale chez le souriceau mérite d'être envisagée pour confirmer ou infirmer la valeur de cet examen.

L'identification complète des souches isolées est achevée à l'Institut Pasteur de Dakar par l'un d'entre nous à l'aide des méthodes sérologiques:

a) épreuve d'inhibition de l'hémagglutination, selon la méthode de Clarke & Casals (1958) sur plaques, contre 4 à 8 unités d'antigènes;

b) épreuve de fixation du complément suivant la technique standard (dite LBCF) proposée par le Centre des maladies transmissibles d'Atlanta, Etats-Unis d'Amérique, et adaptée à la microméthode de Takatsy.¹ Le plus souvent, le titre optimal des antigènes et des antisérums est déterminé par la méthode « en échiquier »;

c) épreuve de neutralisation selon la méthode des mélanges de sérum non dilué avec des dilutions progressives de virus qui, après 1 heure d'incubation au bain-marie à 37°C, sont inoculés à raison de 0,02 ml par voie intracérébrale à des souriceaux âgés de 3 jours. L'indice de neutralisation est exprimé en logarithme.

¹ US Department of Health, Education, and Welfare (1962) *Diagnostic complement fixation method (LBCF)*, Communicable Diseases Center Laboratory Branch Training Manual.

RÉSULTATS

Les résultats que nous présentons¹ ont été obtenus à l'aide de méthodes sérologiques éprouvées et à l'aide de réactifs de référence internationale. Néanmoins, ils sont considérés comme provisoires, des méthodes plus fines pouvant être un jour susceptibles de modifier cette première identification et de faire considérer les virus isolés comme des espèces voisines ou d'éventuels variants.

La récapitulation de nos isolements s'établit ainsi:

— cinq souches de virus Ntaya ou d'un virus étroitement apparenté: YM 21-64, YM 43-64, YM 59-64, YM 158-64, YM 179-64;

— deux souches de virus Middelburg: YM 3-64 et YM 20-64;

— deux souches de virus Bunyamwera: YM 25-65 et YM 52-65;

— une souche de virus Spondweni: YM 175-64;

— une souche de virus non groupable en cours d'étude: YM 50-64;

— deux souches en cours d'identification: YM 31-65 et YM 34-65.

L'origine de ces souches est résumée dans le tableau 2.

VIRUS NTAYA OU APPARENTÉS

Cinq souches ont été isolées: YM 21-64, YM 43-64, YM 59-64, YM 158-64 et YM 179-64.

¹ Les abréviations suivantes sont utilisées pour l'exposé des résultats:

HA : hémagglutination.

IH : inhibition de l'hémagglutination.

n : réaction négative.

NP : réaction non pratiquée.

Souris 1.2.3...: souris immunisée par 1, 2 ou 3 inoculations.

Lapin 1.2.3...: lapin immunisé par 1, 2 ou 3 inoculations.

Virus: CHIK=chikungunya; ONN=o'nyong-nyong; SEM=Semiiki; SIND=Sindbis; MID=Middelburg; NTA=Ntaya; WESS=Wesselbron; USU=Usutu; FJ=fièvre jaune; UGS=Ouganda S; WN=West Nile; ZIK=Zika; SPOND=Spondweni; DAK=Dakar bat; ILE=Ilesha; BUN=Bunyamwera; GER=Germiston; UKA=Ukawa.

Les titres des virus sont exprimés pour le volume de l'inoculum de 0,02 ml.

En réaction d'IH, les titres sont exprimés par l'inverse de la dernière dilution du sérum inhibant complètement l'hémagglutination.

En réaction de séroneutralisation, la DL₅₀ (sérum normal) et l'indice de neutralisation (antisérum) sont exprimés en logarithmes.

Les trois premières d'entre elles ont été isolées au cours du 2^e trimestre 1964, à une époque où aucune souche de référence n'était encore entretenue au laboratoire.

La morbidité et la mortalité, tardives et irrégulières au moment de l'isolement, se généralisent assez rapidement avec raccourcissement de la période d'incubation au cours des passages. Le réisolement a été obtenu pour toutes les souches, quoique avec difficulté pour la souche YM 59-64 (trois tentatives ont été nécessaires).

Ces souches sont pathogènes pour la souris adulte après inoculation intracérébrale, et elles n'ont aucun effet cytopathogène sur les cultures cellulaires suivantes: KB, rein de singe, rein de hamster, fibroblastes de poulet.

Les lésions histologiques expérimentales observées sont typiques des encéphalites à arbovirus, sauf en ce qui concerne la souche YM 158-64 qui ne provoque que des lésions discrètes, se limitant à des phénomènes de congestion des capillaires et une gliose peu marquée au niveau des cornes d'Ammon.

L'hémagglutinine a été obtenue avec une relative facilité soit après traitement au fluorocarbène, soit après extraction au saccharose-acétone.

Le tableau 3 résume les principales caractéristiques de ces souches.

Les études antigéniques poursuivies à Dakar ont montré une relation étroite avec le virus Ntaya en inhibition de l'hémagglutination, en fixation du complément et en séroneutralisation croisée.

Les trois premières souches ont été étudiées pratiquement simultanément à Dakar.

Antigène HA

(Extraction au saccharose-acétone)

Souche	Titre des hémagglutinines à pH			
	5,7	6,0	6,2	6,4
YM 21-64	0	10240	5120	20480
YM 43-64	0	5120	5120	2560
YM 59-64	0	0	320	320

Souche	6,6	6,8
YM 21-64	20480	10240
YM 43-64	320	0
YM 59-64	640	320

TABLEAU 2
ISOLEMENTS DE VIRUS EN 1964 ET 1965

Moustiques						Souches de virus isolées
N° du lot	Espèces	Nombre	Provenance	Date de capture	Date d'inoculation	
YM 3-64	<i>Mansonia africana</i>	479	Akonolinga	12.III.64	13.III.64	Middelburg
YM 20-64	<i>Eretmapodites</i> groupe <i>chrysogaster</i>	14	Nkolbisson	13.IV.64 et 14.IV.64	16.IV.64	Middelburg
	<i>E.</i> groupe <i>inornatus</i>	1				
	<i>Aedes</i> groupe <i>tarsalis</i>	10				
	<i>A. kummi</i>	3				
	<i>A.</i> groupe <i>palpalis</i>	3				
	<i>Mansonia pseudoconopas</i>	1				
YM 21-64	<i>Culex</i> spp. indéterminé	32	Nkolbisson	13.IV.64 et 14.IV.64	16.IV.64	Ntaya
YM 43-64	<i>Culex albiventris</i>	2	Nkolbisson	26.V.64	27.V.64	Ntaya
	<i>Culex</i> spp. indéterminé	24				
YM 50-64	<i>Eretmapodites</i> groupe <i>chrysogaster</i>	15	Okola	21.V.64	2.VI.64	?
YM 59-64	<i>Culex albiventris</i>	4	Nkolbisson	2.VI.64	6.VI.64	Ntaya
	<i>Culex</i> spp. indéterminé	29				
YM 158-64	<i>Culex nebulosus</i>	27	Ofoumselek	25.IX.64	30.IX.64	Ntaya
YM 175-64	<i>Eretmapodites</i> groupe <i>chrysogaster</i>	31	Ofoumselek	16.X.64	22.X.64	Spondweni
YM 179-64	<i>Culex cinereus</i>	19	Ofoumselek	16.X.64	22.X.64	Ntaya
	<i>C. telesilla</i>	4				
	<i>C. moucheti</i>	1				
	<i>C. tigripes</i>	1				
	<i>C. albiventris</i>	11				
YM 25-65	<i>Aedes</i> groupe <i>domesticus</i>	52	Nkolbisson	du 14.X.64 au 12.III.65	18.III.65	Bunyamwera
YM 31-65	<i>Eretmapodites leucopus</i>	17	Nkolbisson	du 26.X.64 au 14.IV.65	20.IV.65	?
YM 34-65	<i>Culex telesilla</i>	135	Nkolbisson	2.IV.65 et 6.IV.65	20.IV.65	?
YM 52-65	<i>Aedes</i> groupe <i>tarsalis</i>	4	Centrale électrique de Yaoundé	30.IV.65	22.V.65	Bunyamwera
	<i>A. simulans</i>	1				
	<i>A. capensis</i>	2				
	<i>A. mutilus</i>	1				
	<i>A. kummi</i>	1				

TABLEAU 3
CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES DE VIRUS NTAYA OU APPARENTÉS

Souche	Délai d'isolement (jours)	Temps moyen de survie des souris après 4 passages (jours)	Réisolement	Sensibilité des souches		Pouvoir pathogène chez la souris adulte après inoculation		Titres		Héماغlutinine
				au désoxy-cholate de sodium	à l'éther	intracérébrale	intrapéritonéale	Yaoundé	Dakar	
YM 21-64	13	4-5	+	>2 log	>3 log	+	n	10 ^{5,5}	10 ^{6,5}	+
YM 43-64	7	4-5	+	4 log	1,5 log	+	n	10 ^{7,2}	10 ^{6,5}	+
YM 59-64	11-12	4	+	NP	>3 log	+	n	10 ⁵	10 ^{4,6}	+
YM 158-64	10-15	4	+	NP	>2 log	+	n	10 ⁶	10 ^{5,6}	+
YM 179-64	8-9	5	+	NP	NP	+	n	NP	10 ^{5,4}	+

Réactions d'IH

Réactions croisées de fixation du complément
(Méthode LBCF: antigènes au fréon)

Antigène	Sérums de référence		BUN	Sérum	Antigènes			
	du groupe A	du groupe B			YM 21-64	YM 43-64	NTA	WN
YM 21-64	n	10240	NP	YM 21-64 (souris 3)	46/8	8	8	n
YM 43-64	n	2560	NP	YM 43-64 (souris 3)	8	8/16	8	n
YM 59-64	n	10240	n	NTA (souris 5)	16	8	16/16	n
				WN (souris 3)	n	n	n	32/16

Réactions croisées d'IH dans le groupe B

Les résultats de ces réactions sont donnés dans le tableau 4.

TABLEAU 4
RÉACTIONS CROISÉES D'INHIBITION DE L'HÉماغGLUTINATION DANS LE GROUPE B

Sérum	Titres IH pour les antigènes										
	YM 59/64	YM 21-64	YM 43-64	NTA	WESS	USU	FJ	DAK	WN	ZK	SPOND
YM 59-64 (lapin 3)	20	NP	20	80	20	n	n	n	n	n	n
YM 59-64 (lapin 4)	80	NP	160	640	320	160	40	20	160	n	n
YM 21-64 (lapin 2)	80	1280	80	640	320	160	n	n	20	n	n
YM 43-64 (lapin 1)	40	40	160	40	n	n	n	n	n	n	n
NTA (souris 4)	80	NP	20	80	20	n	n	n	n	n	n
WESS (lapin 2)	1280	NP	NP	640	10240	1280	160	320	320	20	20
USU (lapin 1)	640	NP	NP	2560	NP	1280	20	80	640	20	NP
FJ	n	n	n	20	20	20	320	n	n	n	n
DAK (souris 2)	80	NP	NP	80	40	80	n	160	40	n	n
WN (souris 1)	640	20	n	160	80	320	n	40	80	n	NP
ZIK (souris 1)	40	n	n	40	20	20	n	n	n	1280	n
SPOND (souris 4)	80	NP	NP	160	40	20	n	n	n	n	80

Sérum ou ascite	YM 59-64 (dilution : 8)	YM 43-64 (dilution : 16)	NTA (dilution : 4)
YM 59-64 (souris 2)	16	8	16
YM 59-64 (souris 5)	16	8	16
YM 43-64 (souris 5)	16	16	8
NTA (souris 5)	32	32	32

Réactions croisées de séroneutralisation

Sérum normal	Virus			
	YM 21-64	YM 43-64	NTA	WN
	10 ⁻⁴	10 ^{-4,9}	10 ^{-4,3}	10 ^{-7,3}
<i>Antisérums</i>				
YM 21-64 (lapin 3)	1,4	1,3	1,7	0,8
YM 43-64 (lapin 3)	2,4	2,9	2,5	NP
NTA (lapin 3)	2,4	2,2	2,5	NP
WN (lapin 3)	NP	NP	NP	4

Pour la souche YM 59-64, les réactions croisées de séroneutralisation n'ont pas pu être interprétées de façon valable car le titre de ce virus après incubation de 1 heure à 37°C tombe d'une façon trop importante à 10^{3,7}.

Les résultats obtenus prouvent qu'il existe une relation très étroite entre ces souches et le virus Ntaya.

Cependant, la souche YM 21-64 a été adressée au Service des Arbovirus de l'Institut Pasteur de Paris, où dix poulets furent immunisés par deux injections de virus (aux 7^e et 14^e jours) et saignés au 21^e jour. Cette méthode a donné régulièrement à ses auteurs (Hannoun, Chaumont & Panthier, 1965) des sérums très spécifiques en inhibition de l'hémagglutination, qui permettent de différencier des souches voisines.

Les résultats obtenus ont montré que Ntaya est la seule souche du groupe B qui révèle une parenté avec YM 21-64: quatre sérums de poulet sont inhibiteurs vis-à-vis de Ntaya alors qu'un seul l'est à la fois vis-à-vis de St Louis et de Ntaya, aucune inhibition n'étant observée avec les virus suivants: dengue types 1 et 2, West Nile, encéphalite de la Murray Valley, fièvre jaune, Wesselsbron, Spondweni. Mais les titres d'inhibition (1/10) sont de beaucoup inférieurs à ceux observés avec le virus homologue, et il apparaît donc une différence incontestable entre les deux virus.

Les résultats des études antigéniques poursuivies à Dakar avec les deux autres souches, YM 158-64 et YM 179-64, conduisent également à les considérer comme des souches très voisines, sinon identiques, à Ntaya.

VIRUS MIDDELBURG

Deux souches, YM 3-64 et YM 20-64, ont été isolées.

Au moment de leur isolement, aucune souche sauvage ou de référence de cet arbovirus n'était entretenue au laboratoire.

L'isolement fut facilement obtenu pour YM 3-64 qui provoqua d'emblée la mort de l'ensemble des souris inoculées. La souche fut d'ailleurs réisolée avec la même facilité. L'inoculum de YM 20-64, de titre sans doute faible, n'entraîna qu'une morbidité partielle et le réisolement ne fut pas obtenu malgré deux tentatives.

Après adaptation des souches, la symptomatologie fut la même chez les souris pour les deux souches: évolution rapide en 2-3 jours vers la mort brutale survenant le plus souvent au cours de crises de tétanie généralisée accompagnée de cyanose.

YM 3-64 n'est pas pathogène pour la souris adulte après inoculation intracérébrale ou intrapéritonéale. La souche YM 20-64 ne fut pas testée. Un effet cytopathogène lent sur cellules de reins de jeune hamster fut noté pour ces virus. Les lésions histopathologiques expérimentales sont formellement en faveur d'un arbovirus.

Ces souches sont sensibles à l'éther et au désoxycholate de sodium et résistent à la lyophilisation.

L'antigène hémagglutinant a été très difficile à obtenir et seule l'extraction au saccharose-acétone suivie d'un traitement au sulfate de protamine a permis de mettre en évidence l'hémagglutinine à Yaoundé. La même méthode échoua à Dakar.

Un protocole d'identification a été établi à l'Institut Pasteur de Dakar pour les deux souches:

YM 3-64 (9^e passage): DL₅₀=10^{-5,5}; temps moyen de survie: 2-3 jours à 10⁻³ (souriceaux de 24 heures inoculés par voie intracérébrale).

YM 20-64 (5^e passage): DL₅₀=10⁻⁶; temps moyen de survie: 3 jours à 10⁻³ (souriceaux de 24 heures inoculés par voie intracérébrale).

Antigène HA

Aucun antigène n'a pu être obtenu après trois essais par la méthode au saccharose-acétone et traitement par le sulfate de protamine pour YM 3-64, et après deux essais pour YM 20-64.

Réaction d'IH

Sérum	Antigènes de références (8 unités HA)				
	SEM	CHIK	ONN	SIND	MID
YM 3-64					
(souris 1)	n	n	n	n	80
(souris 3)	n	n	n	n	640
(lapin 3)	n	n	n	n	2560

Sérum	Antigènes de références (8 unités HA)				
YM 20-64	SEM	CHIK	ONN	SIND	MID
(souris 1)	n	n	n	n	40
(souris 3)	n	n	n	n	1280
(lapin 3)	n	n	n	n	2560

Réactions croisées de fixation du complément
(Technique LBCF, microméthode)

Il n'a pas été possible d'obtenir un antigène YM 20-64 satisfaisant malgré trois essais.

Sérum	Antigènes		
	YM 3-64	MID	YM 20-64
YM 3-64 (souris 3)	32/4	32/4	NP
MID (souris 3)	32/4	32/8	NP
YM 20-64 (souris 3)	8/4	32/4	—

Réactions croisées de séroneutralisation

Sérum normal	Virus		
	YM 3-64	YM 20-64	MID
	-6,64	-6,0	-5,86
Antisérum			
YM 3-64 (souris 3)	4,1	NP	3,36
YM 20-64 (souris 5)	NP	3,5	3,36
MID (lapin 3)	4,1	3,5	3,36

Conclusion. Il s'agit de deux souches du virus Middelburg.

VIRUS BUNYAMWERA

Deux souches, YM 25-65 et YM 52-65, ont été isolées.

L'isolement de ces deux souches présenta quelques difficultés; les broyats de moustiques étaient certainement doués de toxicité et la mortalité non spécifique nous obligea à répéter les inoculations.

Le réisolement fut obtenu à partir du broyat YM 25-65, mais échoua avec le broyat YM 52-65.

La récolte des moustiques ayant fourni YM 52-65 fut motivée par le fait qu'une jeune fille européenne habitant sur les lieux avait présenté quelques jours auparavant un épisode fébrile brutal accompagné de céphalées et d'un exanthème maculeux généralisé. Malheureusement, il nous fut impossible de faire un prélèvement sanguin.

L'adaptation des souches fut assez rapide, avec mortalité régulière en 2-3 jours pour les souris.

La souche YM 25-65 est pathogène pour les souris adultes inoculées par voie intracérébrale et irrégulièrement pathogène si l'on utilise la voie intrapéritonéale. Les lésions cérébrales histologiques sont typiques.

Sensibles à l'éther et au désoxycholate de sodium, ces virus ont un titre très élevé ($10^{8,3}$ et $10^{8,5}$ à Yaoundé) qui n'est pas affecté de façon importante par la lyophilisation.

Aucune hémagglutinine n'a pu être mise en évidence à Yaoundé, malgré de nombreuses tentatives. A Dakar, un antigène hémagglutinant faible a été obtenu par l'extraction au saccharose-acétone et l'identification a été relativement facile à l'aide des autres réactions sérologiques.

Les examens, à l'Institut Pasteur de Dakar, ont porté sur les deux souches suivantes:

YM 25-65 (14^e passage): $DL_{50}=10^{-7,50}$; temps moyen de survie: 3 jours à 10^{-4} .

YM 52-65 (9^e passage): $DL_{50}=10^{-7,50}$; temps moyen de survie: 2 jours à 10^{-4} .

Antigène HA

(Extraction au saccharose-acétone)

Souche	Titre des hémagglutinines à pH				
	5,9	6,0	6,2	6,4	6,6
YM 25-65	0	20	20	0	—
YM 52-65	0	80	80	20	0

Réactions d'IH

Sérums de référence

Antigène	du groupe A	du groupe B	BUN	UKA	ILE	GER
YM 52-65	0	0	320	320	0	0

Réactions croisées d'IH

Sérum	Antigènes		
	YM 25-65	YM 52-65	BUN
YM 25-65 (souris 3)	NP	320	80
YM 25-65 (lapin 3)	NP	320	5120
YM 52-65 (souris 1)	NP	320	160
YM 52-65 (souris 3)	NP	320	320
BUN (souris 5)	NP	320	160

Réactions croisées de fixation du complément

Sérum	Antigènes		
	YM 25-65	YM 52-65	BUN
YM 25-65 (souris 4)	64/256	64/256	64/256
YM 52-65 (souris 3)	128/256	128/256	NP
BUN (souris 5)	16/256	NP	16/128

Réactions croisées de séroneutralisation

Sérum normal	Virus			
	YM 25-65	YM 52-65	BUN	ILE
	$10^{-7,45}$	$10^{-7,57}$	$10^{-9,20}$	$10^{-5,80}$
Antisérums				
YM 25-65 (lapin 3)	5,29	NP	5,4	1,30
YM 52-65 (lapin 3)	NP	5,57	4,71	0,30
BUN (souris 5)	5,29	5,57	5,60	0,20
ILE (lapin 2)	1,95	2,07	1,7	4,1

Conclusion. Il s'agit de deux souches du virus Bunyamwera.

VIRUS SPONDWENI

Une souche, YM 175-64, a été isolée.

L'isolement a été réalisé facilement sur deux portées de souriceaux. Le temps moyen de survie de 7-8 jours s'est stabilisé à 4 jours au cours des passages. Le réisolement a été également obtenu avec facilité. Aucune souche de virus Spondweni n'était entretenue au laboratoire.

La souche est pathogène pour la souris adulte par inoculation intracérébrale mais non par inoculation intrapéritonéale. Aucun effet cytopathogène n'a été observé sur les cultures cellulaires éprouvées: KB, rein de singe, rein de hamster, fibroblastes de poulet. Les lésions histologiques cérébrales sont nettement en faveur d'un arbovirus.

La sensibilité à l'éther et au désoxycholate de sodium n'a pas été recherchée.

Un antigène hémagglutinant faible a été obtenu au 12^e passage à Yaoundé, mais non à Dakar.

La souche a été examinée à l'Institut Pasteur de Dakar:

YM 175-64 (10^e passage): $DL_{50}=10^{-7,0}$; temps moyen de survie: 4 jours à 10^{-3} (souriceaux de 24 heures inoculés par voie intracérébrale).

Inoculation après lyophilisation (11^e passage): $DL_{50}=10^{-5,60}$.

Antigène HA

Il n'a pas été obtenu après deux essais par la méthode au saccharose-acétone.

Réactions d'IH

Sérum	NTA	Antigènes de référence			
		WESS	USU	WN	DAK
YM 175-64 (souris 3)	80	40	40	40	n
YM 175-64 (lapin 3)	80	160	160	80	20
	FJ	UGS	ZIK	SPOND	
	n	n	n	20	
	90	20	80	40-80	

Réactions croisées de fixation du complément (Technique LBCF, microméthode)

Sérum	Antigènes		
	YM 175-64	SPOND	USU
YM 175-64 (souris 3)	64/8	64/4	8/8
SPOND (souris 3)	32/8	32/6	0/0
USU (lapin 1)	NP	NP	128/8

Réactions croisées de séroneutralisation

Sérum normal	Virus	
	YM 175-64	SPOND
	$10^{-5,8}$	$10^{-7,25}$
Antisérums		
YM 175-64 (lapin 3)	1,91	2,25
SPOND (lapin 3)	3,14	4,30

Conclusion. Cette souche est très voisine, sinon identique, à Spondweni.

VIRUS EN COURS D'IDENTIFICATION

Souche YM 50-64

La primo-inoculation est pratiquée le 2.VI.64 chez deux portées de souriceaux: l'une reste indemne, tandis que deux animaux présentent des paralysies le 13^e jour dans la seconde. On note une généralisation des atteintes neurologiques à tous les animaux au cours des passages et une stabilisation de la période d'incubation à 3-4 jours. Le réisolement est obtenu le 23.VI.64 sur un seul souriceau qui présente un retard de développement et des signes d'atteinte nerveuse le 16^e jour, et donne ensuite des passages positifs.

La souche est pathogène pour les souris adultes après inoculation intracérébrale, non pathogène par la voie intrapéritonéale (7^e passage). On n'observe pas d'effet cytopathogène sur les cultures cellulaires déjà mentionnées.

Les lésions histologiques expérimentales se sont affirmées au cours des passages: très discrètes, voire inexistantes au 2^e passage, elles sont nettes au 7^e, avec nécrose d'une partie de la corne d'Ammon et réaction gliale intense.

La souche est sensible au désoxycholate de sodium et à l'éther.

L'antigène HA obtenu après extraction au fréon a été trop faible pour être utilisé lors des premiers passages et ce n'est qu'au 11^e passage que les titres ont été exploitables: 1/640 à pH 6,2.

Les essais d'extraction au saccharose-acétone ont échoué aussi bien à Yaoundé qu'à Dakar.

Les épreuves sérologiques d'inhibition de l'hémagglutination, de fixation du complément et de neutralisation ont montré que ce virus n'a aucune relation avec les virus africains suivants: Semliki, chikungunya, o'nyong-nyong, Sindbis, Middelburg, Ndumu, Ntaya, Wesselsbron, Usutu, fièvre jaune, Ouganda S, Dakar bat, West Nile, Zika, Spondweni, Entebbe bat, Bunyamwera, Ilesha, Ukawa, Bwamba,

Pongola, Lumbo, Chenuda, Simbu, Mossuril, Nyamanini, Nyando, Lagos bat. Une faible neutralisation, et dans un seul sens, a été observée avec Germiston mais elle n'est pas concluante.

En conclusion, la souche YM 50-64 paraît différente des 29 arbovirus africains énumérés. Cette souche est en cours d'étude à l'East African Virus Research Institute, à Entebbe, d'où le Dr Williams nous a confirmé qu'elle n'a aucune relation en réaction de fixation de complément avec tous les arbovirus africains de la collection de l'Institut.

Souches YM 31-65 et YM 34-65

Nous ne mentionnons ces souches qu'à titre documentaire. Leur identification ne fait que commencer.

Leur nature d'arbovirus est affirmée par leur sensibilité à l'éther et au désoxycholate de sodium et par les caractéristiques des lésions cérébrales obtenues chez le souriceau.

Les titres de ces virus sont très élevés, supérieurs à 10⁸; toutes les tentatives pour mettre en évidence une hémagglutinine ont échoué jusqu'à maintenant.

Les premiers résultats sérologiques sont difficilement interprétables; à première vue, ces souches ne feraient partie ni du groupe A, ni du groupe B, ni du groupe Bunyamwera.

DISCUSSION

Les 351 lots de moustiques inoculés nous ont fourni 13 souches d'arbovirus parmi lesquels quatre types différents de virus ont été identifiés:

- 5 souches de virus Ntaya ou d'un virus étroitement apparenté;
- 2 souches de virus Middelburg;
- 2 souches de virus Bunyamwera;
- 1 souche de virus Spondweni.

Trois souches doivent encore être identifiées.

Une telle variété de virus dans une région aussi étroitement délimitée est remarquable; elle est sans doute le reflet de la grande variété de la faune culicidienne, les arbovirus manifestant une certaine spécificité vis-à-vis de l'espèce vectrice.

Nous n'avons pas isolé de virus chikungunya ni de virus o'nyong-nyong, qui pourtant circulent à l'état hyperendémique à travers l'ensemble de l'Ouest africain comme tendent à le démontrer les résultats de diverses enquêtes sérologiques (Brès et al., 1965), mais nos captures ne se sont pas adressées

à leurs vecteurs habituellement reconnus, en particulier *Anopheles gambiae* et *A. funestus* pour le virus o'nyong-nyong.

La validité de nos isollements a été discutée à propos de chacune de nos souches et nous ne voulons y revenir que pour souligner les faits suivants: aucune souche de référence ne fut introduite au laboratoire avant le mois de juin 1964 alors que cinq isollements avaient déjà été réalisés; les virus Spondweni et Middelburg n'ont jamais figuré dans notre collection; le virus Bunyamwera de référence ne fut manipulé que sous la forme d'antigène hémagglutinant au cours de l'année 1965, aucun passage de la souche n'ayant eu lieu pendant cette période.

L'étalement des isollements dans le temps, tel que le fait ressortir le tableau 2, n'est pas non plus en faveur de « faux isollements » que les conditions de travail parfois critiquables nous font toujours redouter.

Parmi les virus identifiés, seuls deux sont signalés dans la littérature pour avoir été isolés chez l'homme

au cours d'infections naturelles: le virus Bunyamwera, en Afrique du Sud (Kokernot et al., 1958), au Nigéria (Bearcroft, Portefield & Sutton, 1963) et en Ouganda; le virus Spondweni (primitivement identifié à Zika), au Nigéria (MacNamara, 1954).

Les virus Ntaya et Middelburg n'ont jamais été rencontrés chez l'homme; seuls les anticorps ont été décelés.

Au cours de nos essais d'isolements chez l'homme, nous avons inoculé 634 échantillons de sang provenant de malades atteints d'affections fébriles et nous n'avons pu isoler qu'une seule souche qui semble appartenir au groupe Bunyamwera (Brottes & Salaün, 1966).¹ D'autre part, une enquête sérologique portant sur les habitants de la région de Yaoundé a montré une très faible incidence des anticorps vis-à-vis des virus isolés parmi les anticorps détectés par inhibition de l'hémagglutination. L'examen de 350 sérums a donné les résultats suivants:

Virus	Sérums contenant des anticorps spécifiques	
	Nombre	%
Ntaya	14	4
Middelburg	23	7
Spondweni	15	4
Bunyamwera	29	8
YM 50-64	13	4

Enfin, 193 sérums ont été recueillis parmi la population vivant depuis plusieurs années à proximité immédiate des lieux de capture de Nkolbisson. Les résultats acquis par inhibition de l'hémagglutination sont les suivants:

Virus	Sérums contenant des anticorps spécifiques	
	Nombre	%
Ntaya	9	5
Middelburg	1	6,5
Spondweni	9	5
Bunyamwera	24	12
YM 50-64	5	2,5

Le cycle humain de ces virus paraît donc exceptionnel sauf, peut-être, en ce qui concerne le virus Bunyamwera.

Les hôtes animaux possibles n'ont pas encore été prospectés et des études immunologiques à partir de sérums de mammifères et d'oiseaux doivent être entreprises dans le périmètre des lieux de capture.

En ce qui concerne les hôtes vecteurs, nous pouvons faire les commentaires suivants.

L'absence de collection de référence jointe aux difficultés taxonomiques propres au genre *Culex* nous empêcha jusqu'en juin 1964 d'en identifier la plupart des espèces. Cependant, en 128 captures à Nkolbisson de juillet 1964 à décembre 1965, *C. nebulosus* était présent 127 fois, *C. cinereus* 119 fois, et *C. telesilla* 120 fois. On peut donc penser raisonnablement qu'au moins une ou deux de ces espèces étaient présentes dans les lots 21-64, 43-64 et 59-64 d'où fut isolé le virus Ntaya. Remarquons d'ailleurs que les deux autres souches de Ntaya, YM 158-64 et YM 179-64, ont été isolées de lots où se trouvaient *C. nebulosus* d'une part, *C. cinereus* et *C. telesilla* d'autre part.

Beaucoup d'espèces d'*Aedes* et d'*Eretmapodites* ne sont séparables les unes des autres que par l'examen des terminalia mâles. La dissection des mâles capturés dans les mêmes conditions que les femelles donne ainsi vraisemblablement une idée de la fréquence relative des différentes espèces à l'intérieur de chaque groupe.

Au cours de notre enquête, cinq groupes d'espèces ont été impliqués dans nos isolements:

a) *Aedes* groupe *tarsalis*: l'espèce la plus fréquente et de loin (60 sur 78 dissections) est *A. yangambiensis* De Meillon et Lavoipierre. Sont également présents *A. tarsalis* (Newstead), *A. yvonneae* Edwards et *A. phyllolabis* Edwards;

b) *Aedes* groupe *domesticus*: les deux espèces dominantes sont *A. domesticus* (Theobald) et *A. leptolabis* Edwards (respectivement 49 et 43 sur 109 dissections). On trouve également *A. longiseta* Edwards, *A. ovazzai* Hamon et Adam et *A. tauffliebi* Rickenbach et Ferrara, 1958;

c) *Aedes* groupe *palpalis*: nous incluons dans ce groupe *A. palpalis* (Newstead), *A. carteri* Edwards, *A. taeniarostris* (Theobald), *A. crassiforceps* Edwards et *A. pogonurus* Edwards. La situation y est confuse car, alors que 81% des femelles répondent à la description d'*A. carteri*, les autres se partageant entre *A. palpalis* et *A. taeniarostris*, sur 159 mâles disséqués, 119, soit 74%, sont des *A. palpalis*, les autres se répartissant entre *A. taeniarostris*, *A. crassiforceps* et *A. pogonurus*. Nous n'avons jamais trouvé de mâles dont les terminalia correspondent à ceux d'*A. carteri*;

d) *Eretmapodites* groupe *chrysoaster*: près de la moitié des mâles sont des *E. chrysoaster* Graham (115 sur 244 dissections); plus du quart sont des

¹ Au moment où nous publions cet article, l'identification de cette souche est maintenant achevée: il s'agit d'un virus Ilesha.

E. grahami Edwards (70). Sont également présents *E. semisimplicipes* Edwards (24), *E. haddowi* Van Someren (20), et enfin, mais rares, *E. intermedius* Edwards, *E. gilletti* Van Someren et *E. pauliani* Grjebine;

e) *Eretmapodites* groupe *inornatus*: *E. inornatus* Newstead est deux fois plus fréquent qu'*E. penicillatus* Edwards (respectivement 42 et 18 sur 60 dissections).

Notons enfin que les *Eretmapodites leucopus* Graham appartiennent à la sous-espèce *productus* Edwards.

Le fait le plus intéressant est l'isolement des cinq souches apparentées au virus Ntaya à partir de lots de *Culex*. Rappelons que le virus fut isolé pour la première fois en Ouganda, d'un lot de 1318 moustiques dont 1284 *Culex* spp. (Smithburn & Haddow, 1951). Ce virus n'avait jamais été réisolé depuis, mais en 1960, Haddow, envisageant la prévalence de l'infection en Egypte et le rôle important joué dans cette région par les *Culex* dans la transmission des maladies à virus, suggérait que certaines espèces de *Culex* pouvaient être les vecteurs naturels du virus Ntaya. Nos isollements paraissent corroborer cette hypothèse. Peut-être même peut-on avancer que les espèces du sous-genre *Culicomyia* sont particulièrement aptes à le transmettre. L'une des souches (YM 158-64) a été isolée d'un lot de *C. nebulosus* et les quatre autres de lots mixtes où, dans l'un des cas (YM 179-64), *C. cinereus* était l'espèce la mieux représentée. Nous avons discuté plus haut la composition possible des lots de *Culex* non identifiés et montré que, vraisemblablement, au moins une des deux espèces de *Culicomyia* y était présente. Des expériences de transmission au laboratoire seront naturellement nécessaires pour appuyer cette hypothèse.

Le virus Middelburg avait jusqu'à présent été isolé en Afrique du Sud de plusieurs espèces d'*Aedes* (Kokernot et al., 1957; Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961). Notre premier isolement à partir de *Mansonia africana* ne peut cependant surprendre, car cette espèce a été impliquée dans l'isolement de nombreux virus: Spondweni (MacIntosh et al., 1961), Bunyamwera et Sindbis (Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961), virus de la fièvre de la Vallée du Rift (East African Virus Research Institute, 1960), et, en association avec *M. uniformis* (Theobald), dans l'isolement des virus Pongola (Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961) et chikungunya (East African Virus Research Institute, 1962). La deuxième souche de Middelburg provient

d'un lot mixte où prédominaient des *Eretmapodites* du groupe *chrysogaster* et des *Aedes* du groupe *tarsalis*. Rappelons que le virus a déjà été isolé d'une espèce du groupe *tarsalis*: *A. albocephalus* (Theobald) (Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961). Quant aux *Eretmapodites* du groupe *chrysogaster*, qui sont impliqués encore dans deux autres de nos isollements, souche non identifiée (YM 50-64) et souche de virus Spondweni (YM 157-64), ils sont connus comme vecteurs expérimentaux de la fièvre jaune (Bauer, 1928, cité par Haddow, 1956) et de la fièvre de la Vallée du Rift (Smithburn et al., 1949, cités par Haddow, 1956). MacNamara (1953) a isolé d'autre part le virus Semliki d'*E. grahami* (cité par Haddow, 1956). On peut donc penser qu'une ou plusieurs espèces du groupe constituent de bons vecteurs des arbovirus. N'oublions cependant pas que l'isolement initial du virus Middelburg fut effectué à partir d'un lot d'*Aedes* (*Neomelanicion*) spp. (Kokernot et al., 1957) et que deux autres isollements proviennent d'*A. (N.) circumluteolus* (Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961), un des meilleurs vecteurs connus de l'Afrique au Sud du Sahara. Il est donc possible que la souche ait été isolée des trois *Aedes* du groupe *palpalis* qui se trouvaient dans le lot, mais nous ne le pensons pas car les 1146 autres *Neomelanicion* inoculés répartis en 24 lots homogènes et 11 mixtes nous ont donné des résultats négatifs.

Le virus Bunyamwera fut isolé pour la première fois par Smithburn et al. (1946, cités par Haddow, 1960) en Ouganda d'un lot de 4114 *Aedes* spp. dont 2584 appartenaient au sous-genre *Neomelanicion* (*A. palpalis*, *A. taeniarostris* et *A. circumluteolus*). Il a depuis été isolé de nouveau à plusieurs reprises au Tongaland (Afrique du Sud) d'*A. circumluteolus* (Kokernot et al., 1957a; Kokernot et al., 1958). Aucune espèce du sous-genre ne figure dans les deux lots d'où nous l'avons isolé. Mais c'est aussi la première fois à notre connaissance que des *Aedes* du groupe *domesticus* sont impliqués dans un isolement d'arbovirus.

Quatre genres de moustiques et à l'intérieur de l'un d'eux trois sous-genres ont été incriminés dans la transmission du virus Spondweni. Isolé initialement de *Mansonia uniformis* au Tongaland (Kokernot et al., 1957b), il a été retrouvé dans la même région chez *M. africana*, *Aedes* (*Neomelanicion*) *circumluteolus*, *A. (Aedimorphus) cumminsii* et *Eretmapodites silvestris* Ingram et De Meillon (MacIntosh et al., 1961), chez *Culex univittatus* Theobald (Brooke Worth, Paterson & De Meillon, 1961), enfin au

Mozambique dans un lot mixte d'*A. (Ochlerotatus) fryeri* (Theobald) et *A. (Aedimorphus) fowleri* (Charmoy) (MacIntosh et al., 1962). C'est donc un virus qui paraît montrer peu de spécificité dans son adaptation aux moustiques. Nous ne pensons pas, en ce qui concerne notre isolement, qu'il puisse s'agir d'un virus simplement présent dans un repas de sang

récemment ingéré, car nous n'avons jamais trouvé dans nos captures d'*Eretmapodites* fraîchement gorgés.

Cette remarque s'applique bien entendu également aux lots YM 50-64 (*E.* groupe *chryso-gaster*) et YM 31-65 (*E. leucopus*) dont les souches isolées n'ont pas encore été définitivement identifiées.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement le D^r R. Panthier, Chef de Service, et le D^r C. Hannoun, Chef de Laboratoire, Service de la Fièvre jaune et des Arbovirus, Institut Pasteur de Paris, ainsi que le D^r M. C. Williams, Direc-

teur de l'East African Virus Research Institute, Entebbe, et le D^r J. P. Woodall, Rockefeller Foundation, New York, pour les conseils dont ils les ont fait bénéficier pour l'élaboration de ce travail.

SUMMARY

In the framework of an investigation of the distribution of arboviruses in the Federal Republic of Cameroon carried out in 1964 and 1965, attempts were made to isolate arboviruses from mosquitos captured within about 80 km of Yaoundé, in partially degraded semi-deciduous forest between the dense rain forest and the savanna. A total of 192 day captures by net at ground level and 8 night captures on human bait yielded 116 species, subspecies or varieties.

A total of 351 pools was made from the 19 320 females of 46 of the captured species or species-groups; these pools were inoculated into day-old mice for isolation of any arboviruses present. The virus strains were identified by a modification of Casals' methods, involving sodium desoxycholate and ether sensitivity testing, and haemagglutination, haemagglutination-inhibition, complement-fixation and neutralization tests.

It proved possible to isolate 13 arbovirus strains, 10 of which have been identified: 5 of Ntaya or closely related virus, 2 of Middelburg virus, 2 of Bunyamwera virus and 1 of Spondweni virus. One of the unidentified strains was found not to correspond to any of the African viruses in the collections of the reference centres at Dakar and Entebbe. The other two strains are still undergoing identification.

The most interesting finding is the isolation of 5 strains of, or very closely resembling, Ntaya virus from *Culex*

species; this is the first time that isolation of this virus has been mentioned in the literature since its original isolation in Uganda, from a pool also consisting mainly of *Culex*. Middelburg virus, so far isolated from various species of *Aedes*, was here isolated from a homogeneous pool of *Mansonia africana*, a species known to be the vector of many other arboviruses. The 2 Bunyamwera virus strains were isolated from *Aedes*, one of them from a homogeneous pool of the *A. domesticus* complex; this is the first time that this species-group has been found to be involved in the cycle of an arbovirus. The isolation of a Spondweni virus strain from the *chryso-gaster* complex of *Eretmapodites* adds another member to the already long list of possible vectors of this virus.

During the same period, 634 blood samples from fever patients were similarly tested by animal inoculation without revealing any of the above-mentioned viruses. A serological investigation of 193 persons of long residence near the capture sites of the mosquitos showed that these viruses are very rarely found in man, with the possible exception of Bunyamwera virus, for which 12% of the sera gave a positive reaction in the haemagglutination-inhibition test. This is in line with the finding that none of the other three viruses has yet been shown to cause any human disease. The animal cycle of these viruses in the region in question remains to be determined.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bearcroft, W. G. C., Portefield, J. J. & Sutton, R. N. P. (1963) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **57**, 308
 Brès, P., Carrie, J., Desbois, A., Lartigue, J. J. & Mace, G. (1965) *Ann. Inst. Pasteur*, **108**, 341
 Brooke Worth, C., Paterson, H. E. & De Meillon, B. (1961) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **10**, 583-592
 Brottes, H. & Salaün, J.-J. (1966) *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **43**, 77-89

- Casals, J. (1961) *Bull. Org. mond. Santé*, **24**, 723
- Chastel, C. (1963) *Bull. Soc. Path. exot.*, **58**, 915
- Clarke, D. A. & Casals, J. (1958) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **7**, 561
- East African Virus Research Institute (1960) *Report N° 10 (1959-1960)*, Nairobi, Government Printer, pp. 1-57
- East African Virus Research Institute (1962) *Report N° 12 (1961-1962)*, Nairobi, Government Printer, pp. 1-68
- Haddow, A. J. (1956) *Bull. ent. Res.*, **46**, 761-772
- Haddow, A. J. (1960) *Bull. ent. Res.*, **50**, 759-779
- Hannoun, C., Chaumont, L. & Panthier, R. (1965) *Bull. Org. mond. Santé*, **32**, 665
- Kokernot, R. H., De Meillon, B., Paterson, H. E., Heyman, C. S. & Smithburn, K. C. (1957) *S. Afr. J. med. Sci.*, **22**, 145-153
- Kokernot, R. H., Heyman, C. S., Muspratt, J. & Wolstenholme, B. (1957a) *S. Afr. J. med. Sci.*, **22**, 71-80
- Kokernot, R. H., Smithburn, K. C., De Meillon, B. & Paterson, H. E. (1958) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **7**, 579-584
- Kokernot, R. H., Smithburn, K. C., Muspratt, J. & Hodgson, B. (1957b) *S. Afr. J. med. Sci.*, **22**, 103-112
- MacIntosh, B. M., Kokernot, R. H., Paterson, H. E. & De Meillon, B. (1961) *S. Afr. med. J.*, **35**, 647-650
- MacIntosh, B. M., Weibren, M. P., Brooke Worth, C. & Kokernot, R. H. (1962) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **11**, 685-686
- MacNamara, F. N. (1953) *Ann. trop. Med. Parasit.*, **47**, 9
- MacNamara, F. N. (1954) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **48**, 139-145
- Rickenbach, A. & Ferrara, L. (1965) *Bull. Soc. Path. exot.*, **58**, 24-29
- Smithburn, K. C. & Haddow, A. J. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol.*, **77**, 130-133
- Stone, A., Knight, K. L. & Starke, H. (1959) *A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World*, Washington, D. C., Entomological Society of America