



HAL
open science

Orthobunyavirus de la République Centrafricaine : détection, séquençage et analyse phylogénétique

Emmanuel Nakouné-Yandoko

► **To cite this version:**

Emmanuel Nakouné-Yandoko. Orthobunyavirus de la République Centrafricaine : détection, séquençage et analyse phylogénétique. Biologie moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN11306 . tel-01747446

HAL Id: tel-01747446

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747446>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

07306

NANCY-UNIVERSITE
ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT »

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE NANCY-UNIVERSITE

Discipline : Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 03 juillet 2007 par

Emmanuel NAKOUNE-YANDOKO

Titre :

***ORTHOBUNYAVIRUS DE LA REPUBLIQUE
CENTRAFRICAINE : DETECTION, SEQUENÇAGE
ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE***

Directeurs de thèse : Madame le Professeur Chantal FINANCE

Monsieur le Professeur Bertrand RIHN

JURY

Madame le Professeur Sylviane BILLAUDEL (Rapporteur)

Madame le Docteur Michèle BOULOY (Rapporteur)

Monsieur le Professeur Nikolaus MÜLLER-LANTZSCH (Examineur)

Monsieur le Professeur Alain LE FAOU (Examineur)

Madame le Professeur Chantal FINANCE (Directeur)

Monsieur le Professeur Bertrand RIHN (Directeur)

HOMMAGE (IN MEMORIAM)

A la mémoire de ceux qui nous ont quitté
sans nous laisser le temps de les revoir

Mon père

Mon frère aîné

Ma sœur aînée

Vous ne serez jamais dans l'oubli !

A MA FEMME

ASNATH, en récompense pour les années passées loin de toi quand tu avais besoin de moi, à toi ASSO je dédie ce mémoire.

A BEN-ONI, ASCAZAREL, JUNIA, MAMITOU

Mes quatre plus grandes joies de vivre,
Sans eux je ne suis rien, pour eux je suis tout.
Je leur souhaite tout le bonheur du monde.

A MA MERE

Qui a tout donné pour que je sois arrivé là aujourd'hui, qu'elle soit honorée ce jour pour tous ses efforts.

A TOUTE MA FAMILLE

Toute mon affection et mon amour

Remerciements :

A Madame le Professeur Sylviane BILLAUDEL,

Université de Nantes, Laboratoire de Bactériologie-Virologie

Qui a accepté de juger ce travail comme rapporteur, votre compétence en virologie et vos conseils nous aideront à le revoir afin d'en combler les insuffisances. Soyez assurée de notre profond respect.

A Madame le Docteur Michelle BOULOY,

Unité de Génétique Moléculaire des *Bunyaviridae*, Institut Pasteur PARIS.

Qui a la lourde tâche de rapporteur. Nous sommes honoré que vous ayez accepté de juger ce travail. Votre compétence, vos critiques et suggestions dans le domaine des *Bunyaviridae* nous sera aussi très profitable. Soyez assurée de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Nikolaus MÜLLER LANTZSCH

Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Institut für Virologie,

Universität des Saarlandes D-66424 Homburg/Saar

Qui nous a fait l'honneur en acceptant de juger ce travail, vos conseils nous aideront à parfaire ce manuscrit. Soyez assuré de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Alain LE FAOU

Chef de Laboratoire de Virologie du CHU Brabois, Nancy.

Actuellement, Directeur de l'Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine

Vous nous avez accueillis avec bienveillance dans votre laboratoire. Vous avez eu l'idée de ce travail et nous avez guidé tout au long de sa réalisation jusqu'à votre départ en mai 2005.

Veillez trouver ici l'assurance de notre profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Chantal FINANCE

Doyen de la Faculté de Pharmacie, SRSMC-UMR 7565 – Nancy-Université

Qui malgré ses multiples obligations a accepté de prendre la suite de la direction de cette thèse avec une disponibilité constante. Nous n'oublierons jamais le soutien infini qu'elle nous a apporté tout au long de nos études. Nous la prions de trouver ici l'assurance de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bertrand RIHN

CHU de Nancy Brabois et INSERM 525 – Nancy-Université

Qui a su nous guider dans la recherche avec beaucoup de patience et de compréhension. Ses conseils et discussions fructueuses quotidiennes sur l'interprétation de nos résultats, ont permis de progresser en permanence dans ce travail. Pour son soutien indéfectible et sa disponibilité constante. Nous lui prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Antoine TALARMIN

Ancien Directeur de l'Institut Pasteur de Bangui (RCA)

Qui a cru en nos capacités et nous a poussé à les valoriser au travers de ce sujet de thèse dont il fut l'un des initiateurs. Qu'il soit assuré de notre profonde amitié.

A Monsieur le Docteur MAGDALOU,

Directeur de recherche CNRS,

Qui nous a confié des réactifs pour la conduite de l'étude de la protéine non structurale. Toute notre reconnaissance.

A Madame le Docteur MONHOVEN,

Service Commun de Biologie Moléculaire, CHU Nancy, Brabois

Qui nous a fourni les jeux d'amorces nécessaires à la réalisation de ce travail. L'amplification a été longue, les séquences nucléotidiques sont enfin là, et les oligo spécifiques proches. A cette pensée, les virus tremblent de se faire dénicher de la forêt africaine. Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Simonetta Gribaldo,

Unité de Biologie Moléculaire chez les Extremophiles (BMGE). Département Microbiologie, Institut Pasteur PARIS.

Nous la remercions pour l'aide et les conseils qu'elle nous a apportés dans le domaine de la phylogénie. Qu'elle veuille trouver ici l'assurance de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Raphaël DUVAL

De l'unité S.R.S.M.C.- UMR 7565- UHP, Nancy 1

Pour ses précieux conseils et encouragements. Tous mes remerciements.

A Hermine, Véronique, Saoussen, Nicolas, Ghania, Claudine, Hélène, Anne-Charlotte, Simone

Avec qui nous avons eu beaucoup de plaisir à travailler et qui, nous ont supporté pendant de nombreuses années, ... nous le savons, ce n'est pas si facile. Merci de votre patience, vos encouragements mais surtout votre gentillesse et sympathie.

A Sandra, Fabienne, Claudine, Ségolène, Claudine Schmitt, Murielle

Techniciennes au laboratoire de Virologie du CHU de Vandoeuvre-lès-Nancy, pour leur soutien et amitié sincère. Sincères reconnaissances.

A Mmes Pierrette BOCQUILLON, Secrétaire médicale, et **Mauricette CHOUQUET**,
Surveillante du Service de Virologie, **Monsieur Bernard MAYER**, animalier du CHU de
BRABOIS, Vandoeuvre-lès-Nancy, pour leur amabilité.

A Ionela, Thierry, Narcisse, Olga, Fanny, Djibrine,

Institut Pasteur de Bangui

Pour leur encouragement, veuillez trouver ici l'expression de notre amitié.

Nous n'oublions pas,

**Stevens, Jean-Marc, Patrice, Fidèle, Christian, Serge, Sylvain, Bertrand, Keita, Jean-
Pierre, Joseph**

Ces personnes et toute leur famille se retrouvent également remerciées ce jour au même titre
que de nombreuses autres familles que nous considérons comme nos parents.

Nous ne saurons terminer sans adresser tous nos chaleureux remerciements à nos amis et
parents pour leur soutien à la réalisation de ce travail, les familles **PROBST, BAYON,**
NGOUMAPE, OUAIMON et ASSANE.

NAKOUNE YANDOKO EMMANUEL

LISTE DES TRAVAUX

PUBLICATIONS

E. Nakouné Yandoko, A. Talarmin. Les arboviroses africaines. Bulletin de la Société Française de Microbiologie, 2005, 20 (1) : 11-24.

E. Nakouné Yandoko, S. Gribaldo, C. Finance, A. Le Faou and B. H. Rihn. Molecular characterization of African Orthobunyaviruses; J Gen Virol, 2007, 88: 1761-1766.

E. Nakouné Yandoko, Chantal Finance, Alain Le Faou, Bertrand Rihn. Le virus Chikungunya. Annales de Biologie Clinique, 2007, 65 (4): 1-8

COMMUNICATION ORALE

E. Nakouné Yandoko, Caractérisation moléculaire des Orthobunyavirus de la République Centrafricaine. Journées scientifiques régionales du réseau des chercheurs « Maladies parasitaires et vectorielles ». Franceville (Gabon), avril 2007.

E. Nakouné Yandoko, Molecular characterization of African Orthobunyavirus. 10th Saar-Lor-Lux Workshop, Nancy, September 13, 2006.

E. Nakouné Yandoko, Les Bunyavirus africains : séquençage, phylogénie et diagnostic. Journée Pharma-Recherche, avril 2006.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

E. Nakouné Yandoko, C. Finance, B. Rihn, A. Le Faou. Caractérisation moléculaire des Bunyavirus Africains. Société Française de Microbiologie. VII^{ème} Congrès National, Nantes, 30, 31 mai et 1er juin 2007.

E. Nakouné Yandoko, C. Finance, B. Rihn, A. Le Faou. Caractérisation moléculaire des Bunyavirus Africains. Rencontres de Virologie : Virus, marqueurs d'infections et maladies d'étiologie inconnue. 4 et 5 octobre 2006, Institut Gernez Rieux, CRHU Lille.

E. Nakouné Yandoko, C. Finance, B. Rihn, A. Le Faou. Caractérisation moléculaire des Bunyavirus Africains. 25^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse : 1 et 2 décembre 2005, Palais des Congrès, Paris.

E. Nakouné Yandoko, C. Finance, B. Rihn, A. Le Faou. Caractérisation moléculaire des Bunyavirus Africains. Journées Départementales de Virologie, 21 et 22 novembre 2005, Institut Pasteur Paris.

A. Le Faou, E. Nakouné Yandoko, C. Finance, B. Rihn. Molecular Characterization of African Bunyaviruses (P207) ; pp117, ICEID 2006 March 19-22 Atlanta, Georgia, USA.

PARTICIPATION AUX DIFFERENTS CONGRES ET FORMATIONS

- RESEAU NeRAVIHF : Atelier Diagnostic de Fièvres Hémorragiques Virales, Institut Pasteur Dakar, 6 - 10 juin 2006.

- Cours Régional de Bio-informatique de Casablanca (Maroc): Analyse bio-informatique des données des séquences. 20 au 30 mars 2006.

- Participation Conférence : UHP, faculté de Médecine 31 Janvier 2006 « Landmarks in the Logic of Scientific Discovery ». Professeur Brian WHIPP, Professeur Emerite de Physiologie, *St George's Hospital Medical School Université de Londres*, U.K. et *UCLA Scholl of Medicine*, Los Angeles U.S.A. .

- DIU de Virologie Systématique : Institut Pasteur - Université Paris 7 Denis Diderot, 19 avril 10 juillet 2004.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	8
CHAPITRE 1: LES <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>.....	11
1.1 CLASSIFICATION DES <i>BUNYAVIRIDAE</i>	13
1.2 LES PRINCIPAUX GENRES DE <i>BUNYAVIRIDAE</i>	15
1.2.1 Genre <i>Orthobunyavirus</i>	15
1.2.2 Genre <i>Phlebovirus</i>	19
1.2.3 Genre <i>Nairovirus</i>	22
1.2.4 Genre <i>Hantavirus</i>	24
1.2.5 Genre <i>Tospovirus</i>	27
1.3 LES <i>OTHOBUNYAVIRUS</i>	28
1.3.1 Epidémiologie et écologie	28
1.3.2 Les agents infectieux	30
1.3.2.1 Structure des virus	30
1.3.2.2 Propriétés biochimiques et biophysiques.....	33
1.3.3 Multiplication du virus.....	33
1.3.3.1 Animaux sensibles	33
1.3.3.2 Cycle réplcatif.....	35
1.3.4 Physiopathologie des infections.....	35
1.3.5 Caractéristiques cliniques et traitement	39
1.3.6 Diagnostic	40
1.3.7 Lutte et prévention	41
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	43
2.1 MATERIELS	44
2.1.1 Souches virales	44
2.1.2 Produits chimiques et Tampons.....	45
2.1.3 Equipement	46
2.1.4 Petit matériel	46
2.1.5 Milieu de culture cellulaire	47
2.1.6 Amorces pour la RT-PCR.....	47

2.2 METHODES	49
2.2.1 Culture virale	49
2.2.2 Extraction de l'acide nucléique.....	49
2.2.3 Amplification génique	50
2.2.4 Séquençage de l'ADN	51
2.2.5 Analyse des séquences obtenues.....	52
2.2.5.1 Alignement multiple	52
2.2.5.2 Analyse phylogénétique.....	52
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	55
3.1 ANALYSE DU SEGMENT S	56
3.1.1 Séquençage	56
3.1.2 Caractéristiques du segment S	65
3.1.3 Protéine de la nucléocapside.....	67
3.1.4 Protéine non structurale	72
3.1.5 Analyse phylogénétique du segment S	76
3.2 ANALYSE DU SEGMENT M.....	82
3.2.1 Séquençage	82
3.2.2 Caractéristiques du segment M.....	88
3.2.3 Protéine G2	90
3.2.4 Analyse phylogénétique du segment M.....	94
3.3 APPLICATIONS BIBLIOMETRIQUES.....	98
3.4 DISCUSSION	103
3.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
ANNEXES.....	122

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure n° :

1 : Cycle de transmission du virus La Crosse.....	15
2 : Isolement du virus California encephalitis dans l'Etat de New York de 1959 à 2005	16
3 : Avortement des animaux en gestation au cours d'infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift.....	19
4 : Principales épidémies à virus de la fièvre de la vallée du Rift en Afrique.....	20
5 : Fièvres hémorragiques Crimée-Congo dans le monde.....	23
6 : <i>Apodemus agrarius</i> , réservoir du virus Hantaan	24
7 : <i>Tobacco necrosis</i> necrovirus	27
8 : Structure des virus du genre <i>Orthobunyavirus</i>	31
9 : Organisation du génome des <i>Bunyaviridae</i>	32
10 : Organisation du génome des virus du genre <i>Orthobunyavirus</i>	32
11 : Coupe ultra mince de cerveau de souris infecté par le virus Bunyamwera	34
12 : Virus La Crosse observé au microscope électronique.....	34
13 : Cycle de réplication des <i>Orthobunyavirus</i>	35
14 : Physiopathologie des infections à <i>Orthobunyavirus</i>	37
15 : Contrôle de purification d'amplicons de différentes souches étudiées	58
16 : Résultat de séquençage du segment S de la souche Nola ArB2882	59-60
17 : Comparaison sur MultAlin des séquences sens et antisens	61
18 : Comparaison de séquence partielle de la souche Nola ArB2882 à celle de référence NC_001927.....	62
19 : Alignement multiple de séquences nucléotidiques complètes du segment S des souches de RCA.....	64
20 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine de nucléocapside	68
21 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine de nucléocapside après suppression de celle de M'Poko ArB365	69
22 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine non structurale.....	73
23 : Alignement multiple de séquences nucléotidiques des protéines de la nucléocapside ..	76-77
24 : Arbre phylogénétique non enraciné obtenu à l'aide des séquences nucléotidiques de la protéine N par la méthode du maximum de vraisemblance.....	79

25 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % de produits d'amplification du segment M de Bunyamwera ArB29051	82
26 : Séquence sens/antisens et chromatogramme du virus M'Poko	84-85
27 : Comparaison sur MultAlin des séquences du virus M'Poko après inversion de la séquence antisens	86
28 : Alignement des séquences de la protéine G2 de différentes souches	93
29 : Arbre phylogénétique non enraciné obtenu à l'aide des séquences de la protéine G2 ...	96
30 : Arbre phylogénétique non enraciné de séquences de la protéine G2 sans la séquence de M'Poko	97
31 : Page d'accueil du serveur Bunyavirus.....	101
32 : Phénomènes génétiques et entités du serveur Bunyavirus	102

Tableau n° :

I : Classification des <i>Bunyaviridae</i>	14
II : Principaux virus du genre <i>Orthobunyavirus</i>	17
III : Principaux virus du genre <i>Phlebovirus</i>	21
IV : Principaux virus du genre <i>Nairovirus</i>	22
V : Principaux virus du genre <i>Hantavirus</i>	25
VI : Rongeurs réservoirs des <i>Hantavirus</i>	26
VII : Principaux virus du genre <i>Tospovirus</i>	27
VIII : Les souches virales étudiées	44
IX : Amorces utilisées	48
X : Délai d'apparition des effets cytopathogènes	56
XI : Composition en bases et acides aminés du segment S des <i>Orthobunyavirus</i> de RCA. 66	
XII : Pourcentage d'identité entre les séquences des protéine de la nucléocapside et protéine non structurale	75
XIII : Longueur des séquences nucléotidiques du segment M des souches de RCA	87
XIV : Caractéristiques des séquences nucléotidiques de la protéine G2	89
XV : Comparaison des séquences nucléotidiques et d'acides aminés de la protéine G2 des souches étudiées	91

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
CCHF	<i>Fièvre hémorragique Crimée-Congo</i>
CRORA	Centre de Référence OMS et de Recherche pour les <i>arbovirus</i>
ECP	Effet cytopathogène
FC	Fixation du complément
FH	Fièvre hémorragique
FHSR	Fièvre hémorragique avec syndrome rénal
FVR	Virus de la fièvre de la vallée du Rift
HSP	Syndrome Pulmonaire à Hantavirus
IC	Intracérébral
IgM	Immunoglobuline de type M
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
IPB	Institut Pasteur de Bangui
ME	Microscopie électronique
NSD	Maladie du mouton de Nairobi (<i>Nairobi sheep disease</i>)
nt	nucléotide
NT	Neutralisation
ORF	<i>Open reading frame</i> /cadre ouvert de lecture
Gène Gc	Glycoprotéine d'enveloppe Gc
Gène Gn	Glycoprotéine d'enveloppe Gn
Protéine L	ARN polymérase ARN dépendante virale
Protéine N	Protéine de la nucléocapside
Protéine NSm	Protéine non structurale du segment M
Protéine NSs	Protéine non structurale de segment S
RCA	République Centrafricaine
RT-PCR	Reverse Transcriptase - <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RVF	Fièvre de la Vallée du Rift
SNC	Système nerveux central
SNN	Souriceaux nouveau nés

UV

Vero E6

Rayon Ultraviolet

Clone 6 des cellules de rein de singe, CCL-81

INTRODUCTION

La famille des *Bunyaviridae* regroupe des virus transmis par des arthropodes qui partagent des propriétés communes morphologiques et antigéniques. Cette famille compte plus de 350 virus animaux et végétaux classés en cinq genres : *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlébovirus* et *Tospovirus*. Les virus des genres *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* et *Phlebovirus* sont pathogènes pour l'homme. Ils sont responsables d'arboviroses pouvant aller d'un syndrome grippal à une fièvre hémorragique (FH). Les Hantavirus sont surtout en cause dans des atteintes pulmonaires survenant à la suite d'un contact avec un animal réservoir tandis que les *Tospovirus* sont des virus des plantes.

L'importance des *Bunyaviridae* en République Centrafricaine (RCA) est mal connue et mérite des études complémentaires afin de caractériser avec précision les espèces en cause pour (i) pouvoir mettre en place un diagnostic fiable, (ii) mieux caractériser les vecteurs et, (iii) identifier les réservoirs animaux qui restent souvent inconnus. Jusqu'à présent leur identification repose sur des critères sérologiques. Du fait de communautés antigéniques et de réactions croisées au sein d'un même genre, cette identification est parfois difficile. L'identification complète n'est possible qu'à la condition d'avoir des anticorps monoclonaux spécifiques ou de pratiquer de séroneutralisation si l'on dispose de l'ensemble des immun-sérums. L'étude de leurs génomes paraît donc indispensable pour vérifier et/ou affiner leur classification. La caractérisation génomique est actuellement l'outil le plus commode soit par hybridation en utilisant des amorces spécifiques de groupe soit par séquençage de segments encadrés par des amorces consensus pour un diagnostic d'espèce. Les régions les plus conservées du génome des

Orthobunyavirus sont le segment S, du fait des deux cadres ouverts et chevauchants de lecture ainsi que de la complémentarité des séquences terminales (environ 19 nt), communes aux 3 segments d'ARN. Un nombre limité de séquences nucléotidiques est actuellement disponible dans les banques de données et concerne surtout les virus isolés en Amérique et en Asie/Océanie. La taxonomie moléculaire des *Bunyaviridae* qui circulent en RCA n'est pas envisageable, dans un premier temps, pour caractériser l'ensemble des souches de *Bunyaviridae* qui circulent en RCA. Aussi les *Orthobunyavirus* seront-ils étudiés dans un premier temps et la démarche mise en place sera appliquée aux *Nairovirus* et *Phlebovirus* également isolés dans le pays.

Le génome des *Orthobunyavirus* est un acide ribonucléique (ARN) de polarité négative composé de trois segments de tailles différentes appelés L pour *large*, M pour *medium* et S pour *small*. Les réservoirs d'*Orthobunyavirus* sont les vertébrés mais la transmission est effectuée par des arthropodes : le plus souvent il s'agit de moustiques mais certaines espèces sont transmises par les Culicoïdes ou les Tiques. Actuellement 47 espèces d'*Orthobunyavirus* sont caractérisées et elles regroupent environ 150 souches différentes. Elles sont présentes partout dans le monde, principalement dans les régions inter-tropicales.

En RCA, 11 espèces d'*Orthobunyavirus* ont été isolées entre les années 60 et 94 à l'Institut Pasteur de Bangui (IPB), le plus souvent, à partir des moustiques et de quelques vertébrés. L'espèce principale est le virus Bunyamwera. Seul un petit nombre d'isolats humains (12 souches) est rapporté. Leur identification repose sur des critères sérologiques.

Les souches africaines ont, dans l'ensemble, été peu étudiées. La RCA est située au cœur d'une zone où plusieurs virus responsables de pathologies souvent mortelles, sont endémiques, émergents ou ré-émergents. Ils circulent à bas bruit et sont susceptibles

d'émerger à tout moment du fait de modifications écologiques mettant en contact l'homme, les vecteurs et les réservoirs.

Le but de ce travail était :

- (i) d'effectuer une caractérisation moléculaire des différents *Orthobunyavirus* isolés en RCA,**
- (ii) de réaliser une analyse phylogénétique des isolats étudiés avec ceux isolés dans d'autres régions du monde dont les séquences sont disponibles dans *GenBank*.**

Une telle étude, originale du fait du petit nombre de travaux menés en Afrique, permettrait non seulement de disposer de séquences nucléotidiques des souches africaines mais surtout de mettre au point les outils moléculaires pour le diagnostic ultérieur et l'identification des *Orthobunyavirus* responsables d'infections humaines. Ainsi il est loisible de mieux connaître l'importance des arboviroses à *Bunyaviridae* en RCA, leur distribution dans le pays et leur impact en santé publique. En effet l'isolement de ces virus en pathologie humaine est rarement obtenu, car la période de virémie au cours de l'infection est très courte et les symptômes souvent non caractéristiques. La mise à disposition d'outils moléculaires permettrait également de les rechercher dans les vecteurs et les réservoirs animaux.

CHAPITRE 1
LES *ORTHOBUNYAVIRUS*

Le virus Bunyamwera a été isolé à l'origine à partir de lots de moustiques de type *Ae. (S)* en Ouganda au cours d'une enquête de surveillance de la fièvre jaune en 1943 (Smithburn, 1946). Cet événement apparemment insignifiant allait ouvrir la voie à la découverte et la caractérisation d'une grande famille de virus : la famille des *Bunyaviridae*. Après l'isolement du virus Bunyamwera, plusieurs autres arbovirus ont été découverts. Ces virus, clairement, n'appartenaient pas au groupe antigénique classique des arbovirus formant les genres *Alphavirus* et *Flavivirus* des *Togaviridae* (Casals, 1963). Au cours des décennies qui ont suivi, la découverte d'autres virus et l'association des analyses sérologiques, biochimiques et morphologiques ont conduit à la notion de « séro groupe ». Le séro groupe est ainsi constitué de virus apparentés pouvant être regroupés par de faibles réactions sérologiques croisées (Murphy *et al.*, 1973).

La famille des *Bunyaviridae* compte aujourd'hui plus de 350 virus répartis dans le monde et impliqués dans plusieurs maladies importantes chez l'homme, le bétail et les plantes. La plupart de ces virus à l'exception des *Hantavirus*, sont maintenus dans la nature par l'existence d'un réservoir constitué du couple vertébré / arthropode le virus se répliquant grâce à un cycle alternant sa réplication chez ces deux composants. Les vecteurs varient selon les virus. Bien que les moustiques soient les plus fréquents, les phlébotomes et tiques sont également en cause. Des transmissions transovariennes ont été prouvées pour nombre de ces virus chez leurs hôtes arthropodes. Ces virus généralement non cytopathogènes pour les cellules d'insectes, peuvent réduire la synthèse de macromolécules et produire un effet cytopathogène (ECP) chez des cellules sensibles de vertébrés. La distribution géographique et l'histoire naturelle des vertébrés ou des arthropodes hôtes, jouent un rôle important dans la détermination de la distribution des virus et l'épidémiologie de la maladie.

1.1 CLASSIFICATION DES *BUNYAVIRIDAE*

La classification des virus au sein de la famille des *Bunyaviridae* a bénéficié des méthodes moléculaires qui ont permis de mieux caractériser ces virus en particulier les *Hantavirus*, très difficiles à cultiver sur lignée cellulaire. Des efforts de classification de virus en particulier les espèces, ont entraîné des révisions dans le catalogue des virus de la famille des *Bunyaviridae*. Le septième rapport du 7^e Comité International de Taxonomie sur la classification et la nomenclature des virus décrit :

- 47 espèces et 4 tentatives d'espèces dans le genre *Orthobunyavirus*,
- 22 espèces dans le genre *Hantavirus*,
- 7 espèces dans le genre *Nairovirus*,
- 9 espèces dans le genre *Phlebovirus* et 16 non groupés,
- 8 espèces dans le genre *Tospovirus* et cinq tentatives d'espèces.

Van Regenmortel *et al.* (2000). Puisque les critères de classification changent parmi les genres, aussi bien qu'au sein des familles de virus, il est certain que la taxonomie de la famille des *Bunyaviridae* continuera d'évoluer.

Tableau 1 : Classification des *Bunyaviridae*

Genre	Maladie
<i>Orthobunyavirus</i>	Encéphalite à virus La Crosse
<i>Phlebovirus</i>	Fièvre de la vallée du Rift
<i>Nairovirus</i>	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo
<i>Hantavirus</i>	Fièvre hémorragique à syndrome rénal Fièvre hémorragique à syndrome pulmonaire
<i>Tospovirus</i>	Virus de plantes

1.2. LES PRINCIPAUX GENRES DE BUNYAVIRIDAE

1.2.1 LE GENRE *ORTHOBUNYAVIRUS*

Le genre *Orthobunyavirus* compte actuellement plus de 150 virus repartis dans le monde entier à l'exception de l'Australie (Tableau II). Ces virus sont transmis par des moustiques et infectent différents mammifères (Figure n° 1).

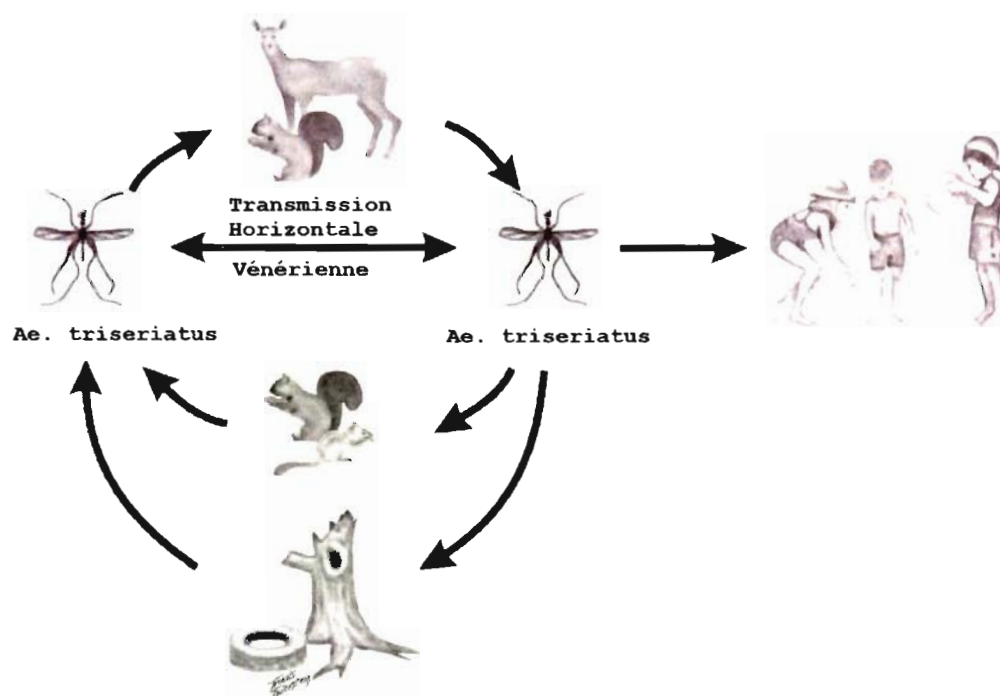


Figure n° 1 : Cycle de transmission du virus La Crosse.

Après l'isolement de la première souche de **virus Bunyamwera** en Ouganda, ce virus a été retrouvé partout en Afrique, en particulier en Afrique subsaharienne, souvent associé à des cas de syndromes fébriles chez l'homme (Gonzalez et Georges, 1988). Pendant plusieurs décennies, un grand nombre de virus membres du séro groupe Bunyamwera ont été isolés à partir de lots de moustiques en Amérique.

Le virus type, **California encephalitis virus** a été isolé en 1941 en Californie au cours d'enquête classique de surveillance de la circulation des arbovirus. Son implication dans trois cas d'encéphalite a été prouvée (Hammon et Reeves, 1952) et depuis lors, il est régulièrement isolé aux USA (Figure n° 2). On retrouve généralement les virus du séro groupe California dans de vastes zones écologiques situées entre les régions tropicales tempérées (virus Guaroa et Lumbo) et les zones arctiques (virus Inkoo et Snowshoe hare).

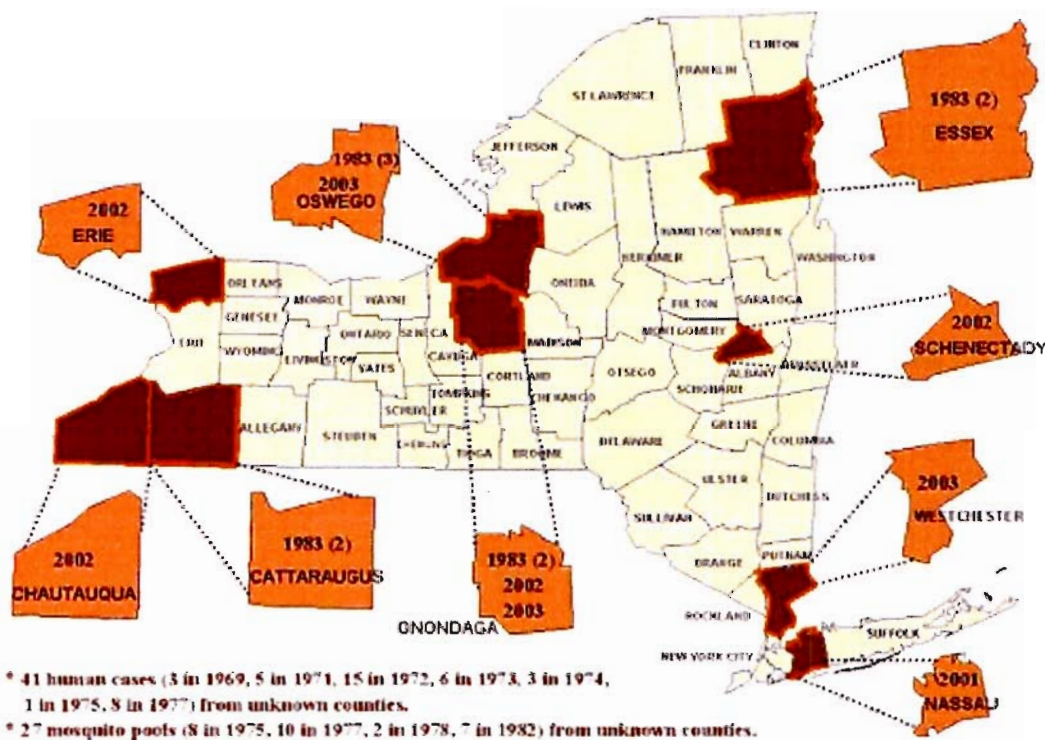


Figure n° 2 : Isolement du virus CE à partir de cas cliniques et de lots de moustiques dans l'état de New York de 1969 à 2005.

Plusieurs virus appartenant au **sérogroupe Simbu** ont également été isolés dans la même période à travers le monde. Parmi ceux-ci, le virus Oropouche au Trinidad en 1955, Akabane au Japon en 1959 (Anderson *et al.*, 1961 ; Inaba *et al.*, 1975) et Ingwavuma en Afrique (Tableau II). L'isolement de plusieurs souches virales ayant de propriétés différentes a abouti à la séparation du genre *Orthobunyavirus* en 14 sérogroupe (Tableau II).

Tableau II : Principaux virus membres du genre *Orthobunyavirus*

Sérogroupe	Principaux virus	Origine géographique	Principaux vecteurs	Maladie
Bakau	Bakau	Asie	Moustique	
	Nola	Afrique	Moustique	
Bunyamwera	Bunyamwera	Afrique	Moustique	Homme
	Birao	Afrique	Moustique	
	Bozo	Afrique	Moustique	
	Cache Valley	Amérique du Nord	Moustique	Homme, Ovin, Bovin, Equin
	Fort Sherman	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Germiston	Afrique	Moustique	Homme
	Ilesha	Afrique	Moustique	Homme
	Kairi	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Main drain	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Shokwe	Afrique	Moustique	Homme
	Wyeomyia	Amérique du Sud	Moustique	Homme
Xingu	Amérique du Sud	Moustique	Homme	
Bwamba	Bwamba	Afrique	Moustique	Homme
	Pongola	Afrique	Moustique	Homme
Groupe C	Apeu	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Caraparu	Amérique Sud/Nord	Moustique	Homme
	Itaqui	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Madrid	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Marituba	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Murutucu	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Nepuyo	Amérique Sud/Nord	Moustique	Homme
	Oriboca	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Ossa	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Restan	Amérique du Sud	Moustique	Homme
California	California enc.	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Guaroa	Amérique Sud/Nord	Moustique	Homme
	Inkoo	Europe	Moustique	Homme
	Jamestown Canyon	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	La Crosse	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Snowshoe hare	Amérique du Nord	Moustique	Homme
	Tahina (Lumbo)	Europe/Afrique	Moustique	Homme
Guama	Catu	Amérique du Sud	Moustique	Homme
	Guama	Amérique du Nord	Moustique	Homme
Koongol	Koongol	Australie	Moustique	Homme
Minatitlan	Minatitlan	Amérique du Nord	Moustique	Homme
Nyando	Nyando	Afrique	Moustique	Homme
Olifantsvlei	Olifantsvlei	Afrique	Moustique	
Patois	Patois	Amérique du Nord	Moustique	
	Estero	Amérique du Nord	Tique	
Simbu	Akabane	Afrique, Asie, Australie	Moustique	Bovin
	Ingwavuma	Afrique, Asie	Moustique	Porcin
	Oropouche	Amérique du Sud	Moustique	Homme
Tete	Bahig	Afrique, Europe	Tique	
	Turlock	M'Poko	Afrique	Moustique
	Turlock	Amérique Sud/Nord	Moustique	

1.2.2. LE GENRE *PHLEBOVIRUS*

Les virus du genre *Phlebovirus* sont présents à travers le monde, à l'exception de l'Australie, et les arthropodes vecteurs sont très divers. Les Phlebovirus sont généralement transmis par des phlébotomes desquels le genre a tiré son nom (Tableau III). Le **virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR)** est essentiellement transmis par des moustiques de type *Ae. Stegomyia (S)*. C'est un virus important en Afrique en termes médical et pastoral.

Le virus FVR a été isolé en 1930 par Daubney et collaborateurs à partir d'un agneau infecté, au cours d'une grande épizootie qui a entraîné des avortements et des mortalités parmi des troupeaux de moutons comme le montre la Figure n° 3 (Daubney *et al.*,1931).



Figure n° 3 : Produit d'avortement des animaux en gestation au cours d'infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift.

De grandes épizooties à FVR ont été rapportées dans différentes régions d'Afrique subsaharienne (Fig. n°4) et, de façon rétrospective, des épidémies cliniquement comparables ont été identifiées autour des années 1912 (Duchin *et al.*, 1994). Depuis lors, des séries d'épidémies sont régulièrement enregistrées (Figure n°4).

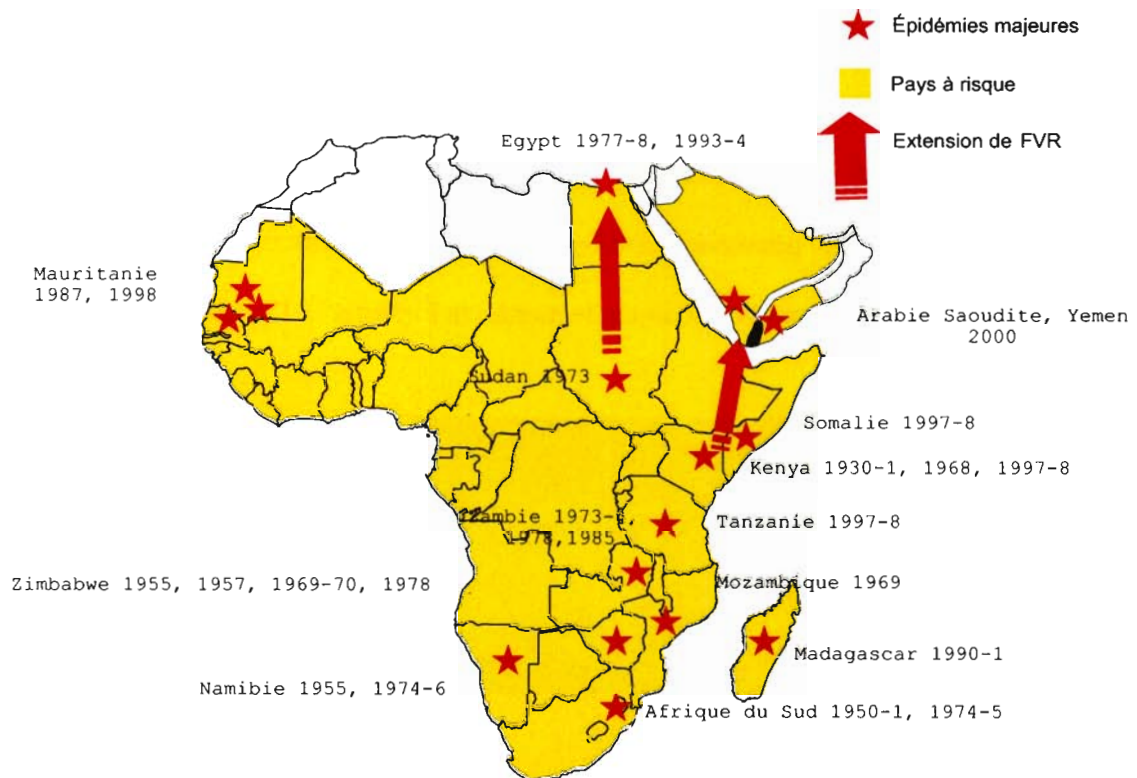


Figure n° 4 : Principales épidémies à FVR en Afrique.

Les virus de la **fièvre à phlébotome de Sicile et de Naples** ont été isolés pour la première fois chez des militaires des troupes américaines engagées dans la bataille de Monte Cassini qui présentaient des syndromes fébriles dans la région de Palerme en Sicile (Italie en 1943) et Naples (Italie en 1944).

Tableau III : Principaux virus du genre *Phlebovirus*.

Sérogroupe	Virus	Répartition	Vecteur	Maladie
	Candiru	Amérique du Sud	?	Homme
	Chagres	Amérique du Nord	<i>Phlébotome, Moustique</i>	
	Punta Toro	Amérique du Sud/Nord	<i>Phlébotome</i>	
				Homme
Fièvres à phlébotome	FVR	Afrique	<i>Moustique</i>	Bovin
	Fièvre de Naples	Afrique, Europe, Asie	<i>Phlébotome</i>	Homme
	Fièvre de Sicile	Afrique, Europe, Asie	<i>Phlébotome</i>	Homme
	Toscana	Europe	<i>Phlébotome</i>	Homme
Uukuniemi	Uukuniemi	Europe	<i>Tique</i>	Oiseau marin

I.2.3 LE GENRE *NAIROVIRUS*

Le genre Nairovirus a ainsi été nommé après l'isolement du virus de le **Maladie du mouton de Nairobi** (NSD), à Nairobi au Kenya en 1910, après l'inoculation de sang d'un mouton atteint de gastroentérite aiguë à d'autres moutons sains (Montgomery, 1917). Les Nairovirus sont presque exclusivement transmis par des tiques, mais un petit nombre d'isollements a été obtenu à partir de moustiques. Plusieurs sérogroupes ont été définis mais les plus importants sont :

- le groupe de la **Fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF)**, avec les virus CCHF et Hazara,
- le groupe de **virus NSD**, avec les virus NSD et Dugbe (Tableau IV).

Tableau IV : Principaux virus du genre *Nairovirus*

Sérogroupe	Virus	Répartition	Vecteur	Maladie
FH de Crimée-Congo	CCHF	Afrique, Asie, Europe	Tique	Homme
	Hazara	Asie	Tique	Homme Homme
Maladie du mouton de Nairobi	NSD	Afrique, Asie	Tique, moustique	Bovin Homme
	Dugbe	Afrique	Tique, moustique	Bovins
Dera Ghazi Khan	DGK	Asie	Tique	
Hughes	Hughes	Amérique Sud/Nord	Tique	Oiseau
Qalyub	Qalyub	Afrique	Tique	
Sakhalin	Sakhalin	Asie	Tique	
Thiafora	Thiafora	Afrique	?	

Le virus CCHF a été identifié pour la première fois dans la péninsule de Crimée vers les années 1940, quand une grande épidémie de FH est survenue chez des agriculteurs. Elle a touché plus de 200 personnes avec un taux de mortalité d'environ 10 % (Chumakov, 1963). D'autres cas de maladies similaires ont été rapportés dans toute l'Europe, l'Asie du centre, l'ex-URSS, la Roumanie et la Bulgarie (Figure n° 5).

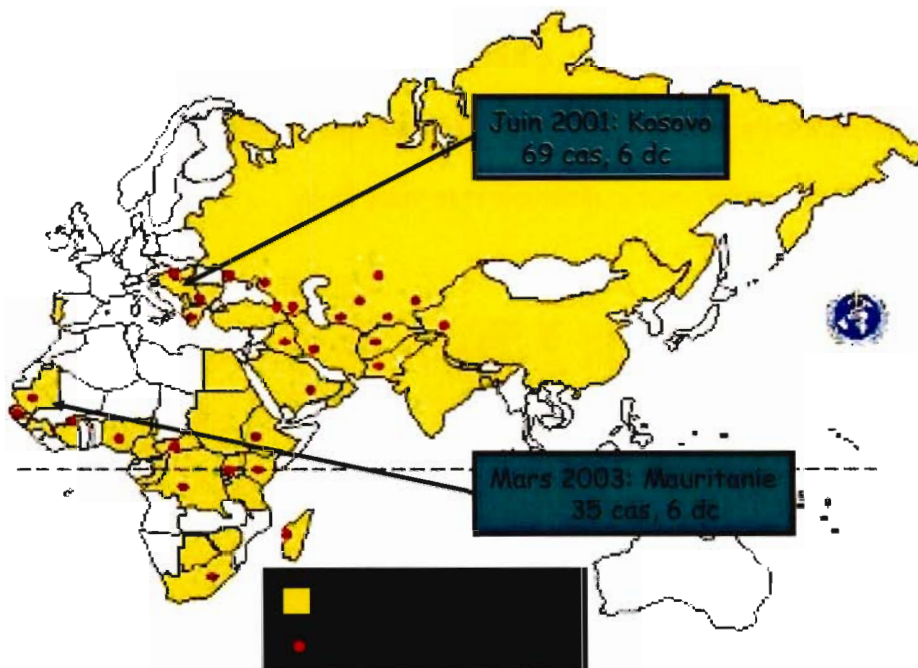


Figure n° 5 : Fièvres hémorragiques Crimée-Congo dans le monde. *Source OMS.*

Cependant, le virus n'a été isolé pour la première fois qu'en 1956 dans la région de Kisangani, en République Démocratique du Congo, chez un patient fébrile (Simpson *et al.*, 1967 ; Woodall *et al.*, 1967).

1.2.4 LE GENRE *HANTAVIRUS*

La découverte des *Hantavirus* remonte à 1951-1953 quand les troupes des Nations Unies ont été déployées au cours des conflits frontaliers entre les Corées du Nord et du Sud.

Parmi 3000 cas de fièvres aiguës, un tiers environ présentait des manifestations hémorragiques et une mortalité de 5 % à 10 % a été enregistrée (Lee, 1989 ; Smadel, 1959). La maladie initialement appelée fièvre hémorragique de Corée, est aujourd'hui nommée **fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR)**. Malgré des efforts considérables, il a fallu attendre environ 25 ans pour que le rongeur, *Apodemus agrarius* (Figure n° 6), fût identifié comme réservoir et le virus isolé.



Figure n° 6 : *Apodemus agrarius*, réservoir du virus Hantaan.

Ce fut une grande surprise de constater que ce virus transmis par des rongeurs partage les caractéristiques des arbovirus de la famille des *Bunyaviridae*. Il a été nommé **Hantaan virus** du nom de la rivière à proximité de laquelle les premiers cas ont été identifiés en Corée (Tableau V) et ensuite devenu le prototype du genre *Hantavirus* (Lee *et al.*, 1982).






Tableau V : Principaux virus du genre *Hantavirus*.

Sérogroupe	Virus	Répartition	Vecteur	Maladie
Hantaan	Hantavirus	Dans tout le monde	<i>Apodemus agrarius</i>	FHSR
	Dobrava/Belgrade	Balkans	<i>Apodemus flavicollis</i>	FHSR
	Séoul	Dans tout le monde	<i>Rattus norvegicus</i>	FHSR
Puumala	Puumala	Europe, Asie	<i>C. glareolus</i>	FHSR
	El Moro Canyon	USA, Mexique	<i>R. megalotis</i>	nd
	Khabarovsk	ex-URSS	<i>Microtus fortis</i>	nd
Thottapalayam	prospect Hill	USA, Canada	<i>M. pennsylvanicus</i>	nd
	Thailand	Thaïlande	<i>Bandicota indica</i>	nd
	Thottapalayam	Inde	<i>Suncus murinus</i>	nd
	Tuta	Europe	<i>Microtus arvalis</i>	nd
	Andes	USA	<i>Peromyscus leucopus</i>	SPH
Sin Nombre	Araraquara	USA	<i>Bolomys lasiurus</i>	SPH
	Bayou	USA	<i>Oryzomys palustris</i>	SPH
	Black Creek Canal	USA	<i>Sigmodon hispidus</i>	SPH
	Castelo dos Sonhos	USA	?	SPH
	Choclo	USA	<i>O. fulvescens</i>	SPH
Sin Nombre	Juquitiba	USA	?	SPH
	Laguna negra	USA	<i>Ca. laucha rodents</i>	SPH
	Sin Nombre	USA, Canada, Mex.	<i>P. maniculatus</i>	SPH

FHSR = Fièvres hémorragiques à syndrome rénal ; SPH= Hantavirus à syndrome pulmonaire ;
C = *Clethrionomys* ; *R* = *Rethrodontomys* ; *M* = *Microtus* ; *O* = *Oligoryzomys* ; *Ca* = *Calomys* ;
P = *Peromyscus* ; Mex = Mexique

Actuellement 4 espèces de *Hantavirus* sont décrites (Tableau VI). L'évènement majeur dans l'histoire des *Hantavirus* fut la découverte en Amérique en 1993, de virus responsable de maladie qui progresse rapidement vers une sévère défaillance respiratoire avec des infiltrations pulmonaires bilatérales. Cette découverte entraînera la différenciation de **virus Hantaan à syndrome pulmonaire (HSP)** des Hantavirus responsables de FHSR (Nichol *et al.*, 1993).

Tableau VI : Rongeurs réservoirs des Hantavirus

Virus prototype	Maladie	Aire géographique	Rongeur
Hantavirus	Maladie classique sévère à hantavirus.	Chine, URSS orientale, Corée du Sud.	 <i>Apodemus spp.</i>
Dobravavirus	Maladie classique sévère à hantavirus néphropathique	Asie Balkan	 <i>Apodemus sylvaticus</i>
Virus Seoul	Néphropathie épidémique	Chine, Japon, Russie occidentale, USA et Amérique du Sud	 <i>Rattus spp.</i>
Virus Puumala	Néphropathie épidémique	France, Royaume Unis, Russie occidentale et Scandinavie, Balkan	 <i>Clethrionomys glareolus</i>
Virus Sin Nombre	Syndrome pulmonaire à hantavirus.	USA, Canada, Mexique	 <i>Peromyscus maniculatus</i>

1.2.5 LE GENRE *TOSPOVIRUS*

Les *Tospovirus* sont des virus de plantes qui se propagent par l'intermédiaire des thrips, petits insectes qui vivent en groupe et qui sont de redoutables ravageurs des cultures d'oignons, de poireaux (Wijkamp, *et al.*, 1993). Les thrips constituent l'ordre des *Thysanoptères* (*Thysanoptera*). L'histoire des *Tospovirus* remonte à 1915, avec la reconnaissance des feuilles de tomates fanées tachetées en Australie (Brittlebank, 1919). Huit espèces de thrips sont recensées comme vecteurs de ces virus, 5 dans le genre *Frankliniella* et 3 dans le genre *Thrips* (Tableau VII). L'importance de ces virus en agriculture est maintenant reconnue (Prins et Goldbach, 1998). On retrouve les *Tospovirus* dans les zones agricoles de régions tropicales, mais aussi dans les cultures de serres en régions tempérées.

Tableau VII : Principaux virus du genre *Tospovirus*.

Sérogroupe	Virus	Distribution géographique	Vecteur
	Tomate tachetée fanée	Ubiquitaire	<i>Frankliniella sop</i>
	Tache nécrosée balsamine		<i>Frankliniella occidentalis</i>
	Bourgeon d'arachide nécrosé		<i>Thrips palmi</i>



Figure n° 7 : *Tobacco necrosis necrovirus*.

1.3. LES *ORTHOBUNYAVIRUS*

1.3.1. EPIDEMIOLOGIE ET ECOLOGIE

Les virus du **sérogroupe California** sont responsables d'environ 60 à 130 cas d'encéphalites rapportés par an, bien qu'un nombre de cas très important n'est probablement pas signalé du fait des difficultés de diagnostic et de nombreuses formes peu ou pas symptomatiques.

Le **virus La Crosse** est le plus important des virus du sérogroupe "California encephalitis" en terme de santé publique aux Etats-Unis. Le vecteur principal est le moustique *Ae.(S) triseriatus* dont l'habitat est en forêt où il se reproduit dans les trous d'arbre. On retrouve ce vecteur dans tout le Nord, le Centre Ouest et le Nord-est des Etats-Unis. Le virus est maintenu chez le moustique par transmission transovarienne, ce qui permet son hibernation dans les œufs (Watt *et al.*, 1974). Pendant l'été, les écureuils, les tamias, les renards et les marmottes d'Amérique deviennent virémiques à la suite d'infection par le LCV et sont des hôtes amplificateurs importants (Thompson, 1983).

Le **virus Jamestown Canyon** et le virus apparenté **Jerry Slow** sont aussi d'importantes causes d'encéphalite à arbovirus aux Etats-Unis. Ces virus sont transmis par des *Culex inornata* ainsi que plusieurs espèces d'*Ae. ou Stegomyia (S)* présents sur une grande partie de l'Amérique du Nord. La transmission verticale de ce virus a été démontrée par Hardy *et al.*, (1993) chez plusieurs espèces d'*Ae. (S)*.

Le **virus Bunyamwera** est présent à travers toute l'Afrique subsaharienne et semble être une cause importante de fièvre aiguë chez l'homme. Plus récemment, un virus Bunyamwera recombinant a été isolé chez des patients présentant des FH en Somalie et au Kenya (Bowen *et al.*, 2001). L'isolement du virus chez plusieurs espèces d'*Ae. (S)* a permis de les impliquer comme vecteurs principaux (Kokernot, 1957).

Le **virus Cache Valley** est retrouvé à travers les Etats-Unis, le Canada et le Mexique. Il est fréquemment isolé de *Culex inornata*. Le virus infecte souvent les moutons et probablement tous les ruminants. L'infection est associée à la mort de l'embryon et du fœtus, ainsi qu'à diverses malformations congénitales chez le mouton (Edwards *et al.*, 1989 ; McConnell *et al.*, 1987).

Les virus du **sérogroupe Simbu** sont présents partout dans le monde et transmis par piqûre d'insectes du genre *Culicoides*. Depuis le premier isolement du **virus Oropouche** chez un patient fébrile au Trinidad en 1950, son importance en Amérique du Sud et Centrale croît régulièrement (Mercer *et al.*, 2005). Il a été impliqué dans plusieurs épidémies avec un taux d'attaque supérieur à 83 % (Rosa *et al.*, 1996). La plupart de ces épidémies sont relativement limitées en zone urbaine, laissant supposer qu'il y a probablement une séparation entre le cycle urbain et le cycle sylvatique (Dixon *et al.*, 1981). Le taux élevé de prévalence des anticorps dans les populations des zones d'endémie suggère que l'infection humaine peut être à bas bruit dans de telles régions (Baisly *et al.*, 1998). Le principal vecteur en zone urbaine au Brésil serait le *Culicoides paraensis* (Pinheiro *et al.*, 1981).

Le **virus Akabane** est largement distribué à travers l'Australie et l'Asie (Japon, Corée, Taiwan), le Moyen-Orient (se prolongeant occasionnellement au Nord comme la Turquie) et l'Afrique subsaharienne (Taylor et Mellor, 1994 ; Wells *et al.* 1997). Chez l'animal le virus est responsable d'épizooties sporadiques d'avortements, naissances prématurées, mort-nés, anomalies congénitales caractérisées par une raideur articulaire congénitale, hydrocéphalie ou microanencéphalie chez le bétail, les moutons et les chèvres. La maladie n'a jamais été décrite chez l'homme.

1.3.2. L'AGENT INFECTIEUX

1.3.2.1 Structure du virus

Comme les autres *Bunyaviridae*, Le génome des *Orthobunyavirus* est un acide ribonucléique (ARN) de polarité négative composé de trois segments (Fig. n° 8B) appelés L pour *large* (6900 nt), M pour *medium* (4500 nt) et S pour *small* (960 nt). Ils codent respectivement l'ARN polymérase ARN dépendante virale (protéine L : 259 kDa) dans le segment L ; deux glycoprotéines d'enveloppe (protéines G1 : 108 kDa-120 kDa et G2 : 29 kDa-41 kDa) produites à partir d'un peptide précurseur qui est clivé au moment de la traduction et une protéine non structurale (NSm : 15 kDa-18 kDa) dans le segment M ; une nucléoprotéine de capsid (protéine N : 19 kDa-25 kDa) et une protéine non structurale (NSs) d'environ 11 kDa dans le segment S. Les cadres ouverts de lecture (ORF) des protéines N et NSs sont chevauchants. Les virions sont des particules sphériques d'environ 80-120 nm de diamètre, entourées d'une enveloppe lipoprotéique (Figure n° 8A, Figure n° 12).

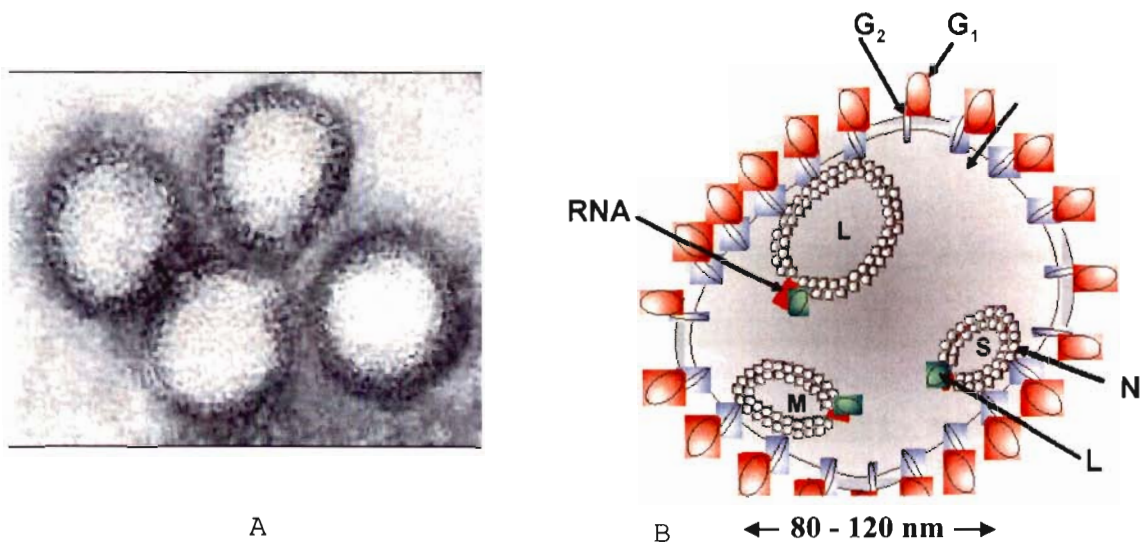


Figure n° 8. Structure des virus du genre *Orthobunyavirus*.

A : L'examen par microscopie électronique révèle que les RNP des *Bunyaviridae* sont circulaires. B : Les trois segments de l'ARN génomique (S, M et L) sont associés à la protéine de la nucléocapside pour former une structure de ribonucléocapside. La nucléocapside (N) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L) sont regroupés à l'intérieur d'une enveloppe lipidique qui porte les glycoprotéines virales Gc (G1) et Gn (G2). (Source : Dr. Elke Mühlberger, Institut für Virologie, Marburg).

L'enveloppe lipidique est acquise par bourgeonnement au niveau des vésicules de l'appareil de Golgi. A la surface, se greffent les spicules. Les particules sont constituées de quatre protéines structurales : la protéine N, la protéine L, et les deux glycoprotéines Gc et Gn. Les protéines N, Gc et Gn représentent les antigènes majeurs.

Les trois ARN monocaténares L, M et S qui constituent le génome sont associés à de nombreuses molécules de nucléoprotéine et quelques copies de protéine L formant des ribonucléoprotéines (RNP). En microscopie électronique (ME), ces RNP apparaissent sous forme circulaire, du fait des séquences complémentaires inversées qui forment des structures en « queue de poêle » aux extrémités 3' et 5' de chaque ARN (Fig. n° 8B). La taille du génome et des protéines varie d'un virus à l'autre, et surtout d'un genre à l'autre. L'organisation du génome des virus de la famille des *Bunyaviridae* est schématisée comme le montre la Figure n°9.

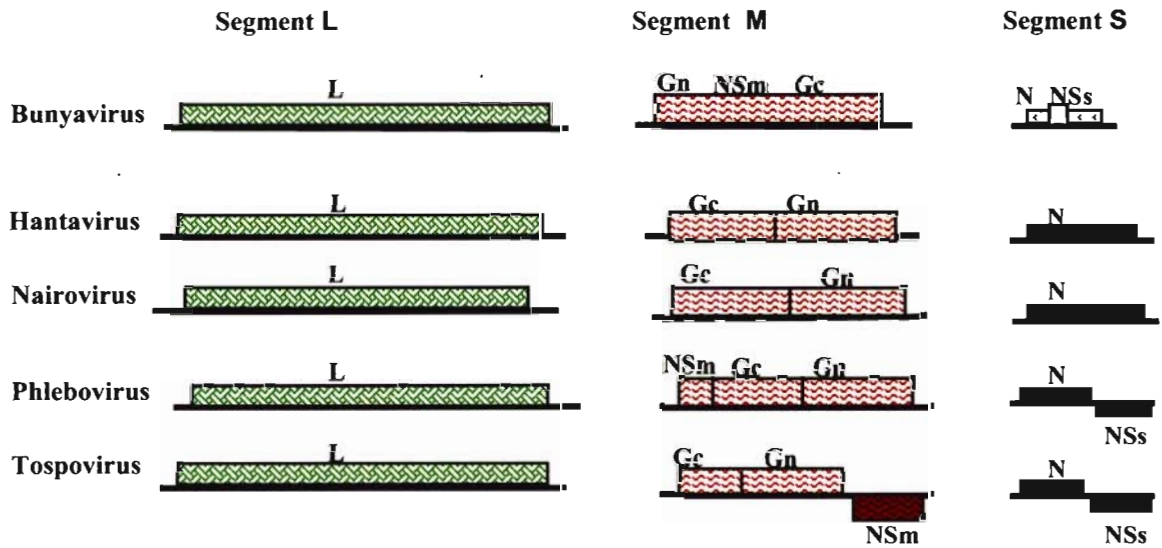


Figure n° 9 : Organisation du génome des *Bunyaviridae*.

Le segment S des *Orthobunyavirus* a deux cadres ouverts de lecture chevauchant sur le brin antigénomique (Figure n°10).

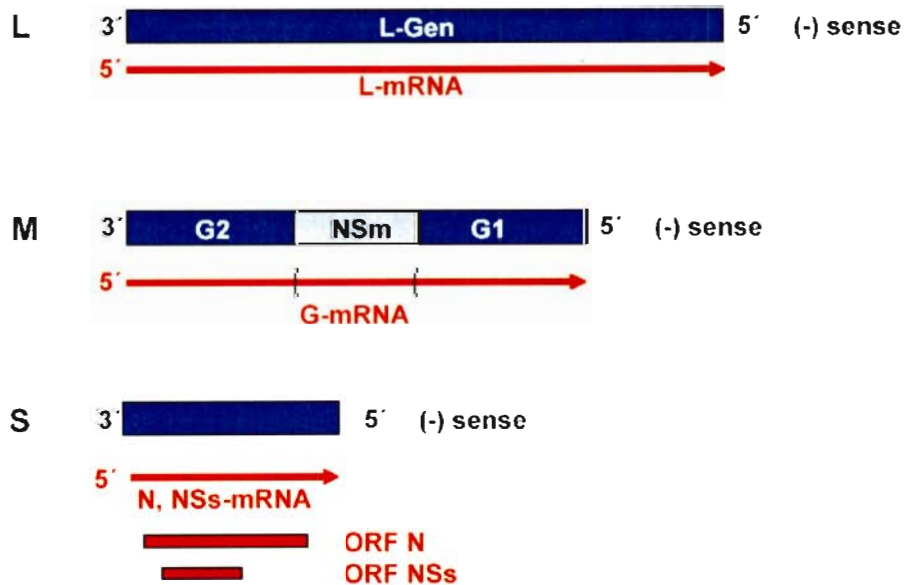


Figure n° 10 : Organisation du génome des virus du genre *Orthobunyavirus* (Source : Dr. Elke Mühlberger, Institut für Virologie, Marburg). En l'absence de protéine de matrice, il est vraisemblable que la nucléoprotéine interagit avec le domaine cytoplasmique des glycoprotéines humaines.

1.3.2.2 Propriétés biochimiques et biophysiques

Le virus Uukuniemi (*Phlebovirus*) est composé de 2 % d'ARN, 58 % de protéines, 33 % de lipides et 7 % d'hydrates de carbone (Obijeski et Murphy, 1977). Le coefficient de sédimentation des virions se situe entre 400 et 500 S, et leur densité de flottaison en saccharose varie de 1,16 à 1,18 g/cm³, et en CsCl de 1,20 à 1,21 g/cm³. Le traitement par les solvants des lipides ou les détergents non ioniques détruit l'enveloppe virale et aboutit à la perte complète du pouvoir infectant [Mathews, 1982 ; Obijeski et Murphy, 1977].

1.3.3. Multiplication du virus

1.3.3.1 Animaux sensibles

Chaque virus a un spectre d'hôte particulier, mais tous ont en commun la capacité d'infecter le souriceau et souvent la souris. L'inoculation intracérébrale (IC) du souriceau nouveau né (SNN) a longtemps été la méthode de choix pour l'isolement de ces virus. Les arbovirus infectent également leurs hôtes invertébrés, d'abord dans le tube digestif, puis les glandes salivaires et les ovaires, ce qui permet la transmission transovarienne. La méthode classique pour isoler les *Orthobunyavirus* est, soit l'inoculation par voie IC à des SNN (Figure n° 11), soit l'infection des cellules sensibles comme le clone E6 de cellules Vero (cellules de rein de singe).

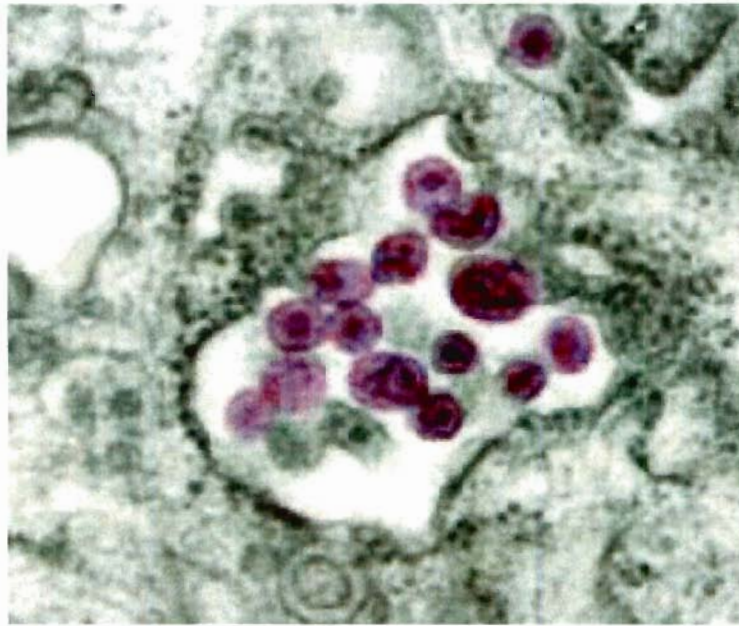


Figure n° 11 : Coupe ultra mince de cerveau de souris infecté par le virus Bunyamwera 6 jours après infection. Les virions sont accumulés dans un espace limité entre les neurones par bourgeonnement de la membrane intracytoplasmique (Golgi). Certains virions sont encore localisés dans la lumière de la vésicule golgienne. Source : Murphy, *School of Veterinary Medicine, University of California, Davis* (x 40 000).

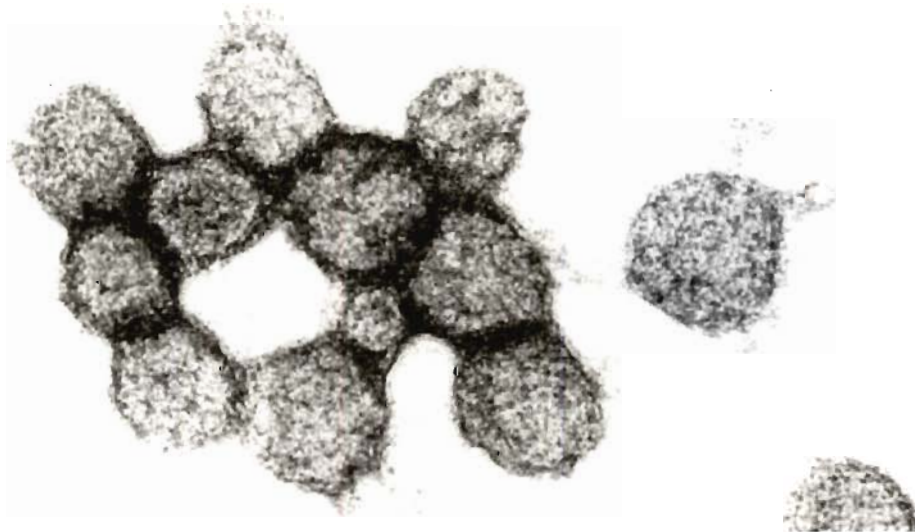


Figure n° 12 : Virus La Crosse observé au microscope électronique.

1.3.3.2 Cycle répliatif

Toutes les étapes du cycle viral ont lieu dans le cytoplasme (Figure n° 13). L'absorption, la pénétration et la décapsidation ont été peu étudiées.

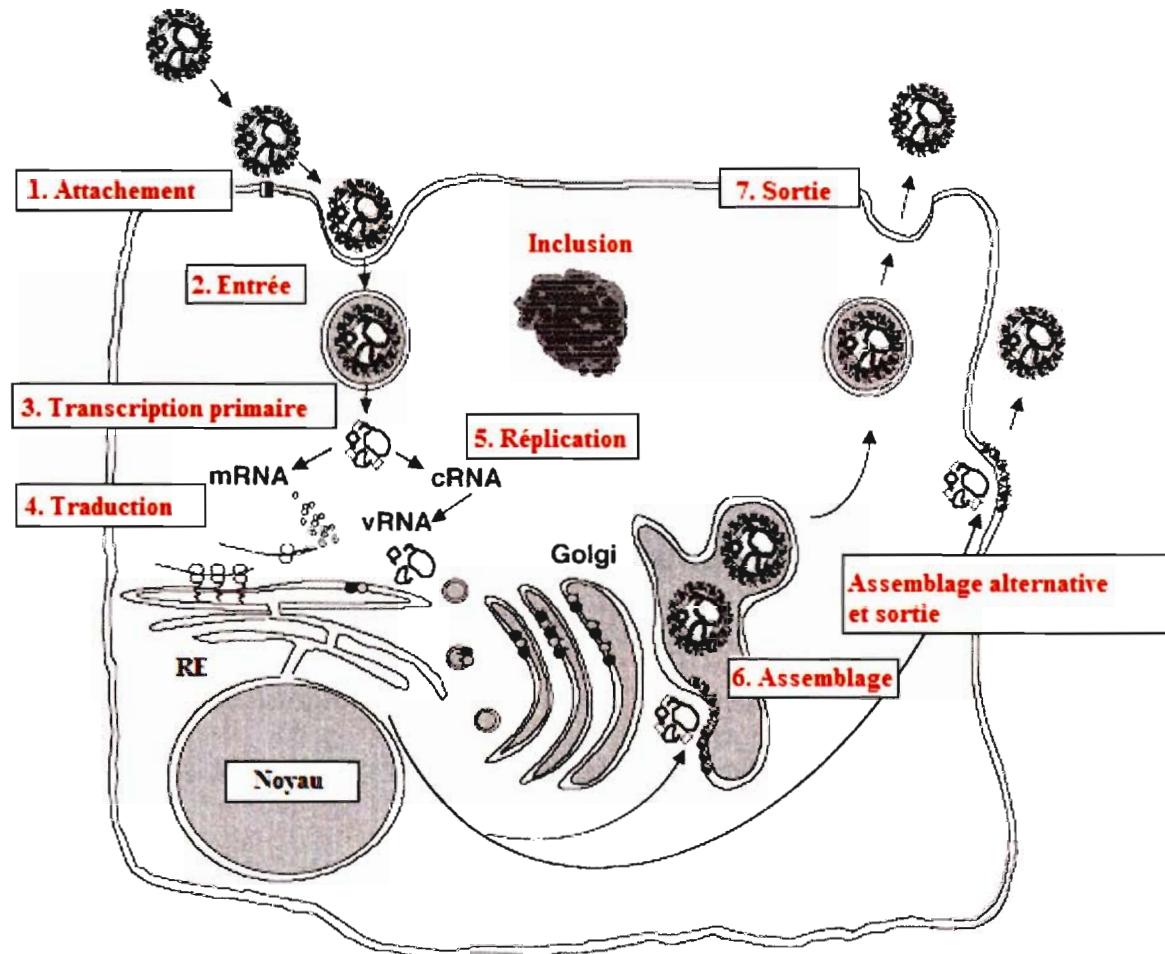


Figure n° 13. Cycle de réplication des *Orthobunyavirus*. (*Fields Virology* Volume 2, 4^e édition).

Comme pour tous les virus à ARN négatif, le cycle de synthèse des ARN viraux se déroule en deux étapes. La transcription primaire qui permet la synthèse des ARNm grâce à la protéine L associée aux particules infectantes, et la transcription secondaire au cours de laquelle les matrices de réplication sont synthétisées. Les mécanismes de transcription-réplication des *Orthobunyavirus* ont de grandes similitudes avec ceux des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* : la transcriptase amorce la synthèse des ARNm

par un mécanisme de capture de coiffe. Les ARNm possèdent en effet de courtes séquences additionnelles non virales à l'extrémité 5', qui correspondent à l'amorce cellulaire utilisée pour débiter la transcription. De plus, les messagers ne sont pas des copies complètes du génome : il manque une partie de la séquence virale à l'extrémité 3', car la transcriptase reconnaît un site de terminaison situé à une courte distance (60-120 nucléotides) avant la fin de la matrice. Le signal de terminaison ne semble pas contenir de séquence consensus, ni de structure secondaire particulière. Les ARNm ne sont pas polyadénylés à l'extrémité 3'.

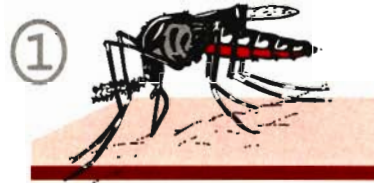
D'une façon générale, chaque segment contient une phase ouverte de lecture exprimée à partir d'un ARNm monocistronique, sauf le segment S qui code deux protéines (N et NSs). L' ARNm transcrit du segment S est bicistronique, les deux protéines N et NSs étant traduites dans des cadres de lecture différents. Dans un deuxième temps (transcription secondaire), le génome est copié en une molécule strictement complémentaire, l'antigénome, qui sert de matrice pour la synthèse de l'ARN génomique. Cette étape est régulée par la nucléoprotéine qui s'associe à l'ARN néo-synthétisé pour former des RNP.

Les glycoprotéines associées à l'enveloppe sont clivées de façon co-translationnelle. Les particules virales se forment par bourgeonnement et sont libérées dans la lumière des vésicules de Golgi. Celles-ci migrent à la surface et libèrent les particules virales dans le milieu extracellulaire.

1.3.4 PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS

L'infection de l'homme par les virus California encephalitis, La Crosse ou Jamestown Canyon débute par la piqûre d'un moustique infecté lors d'un repas sanguin (Figure n° 14). Le virus se réplique d'abord à proximité du point d'inoculation, dans le muscle squelettique qui est le principal site de réplication. Il diffuse dans le plasma sans doute par la voie lymphatique, gagne le myocarde au sein duquel il se réplique. Le virus gagne le système nerveux central (SNC) par voie sanguine et il se multiplie dans les neurones et les cellules gliales. Les cellules nerveuses sont détruites et la mort survient dans les 3 à 4 jours qui suivent l'infection.

1. **Contamination:**
salive du moustique



2. **Replication:**
organes cibles

②

3. **Infection:**
cellules
mononuclées
et tissus
lymphatiques



4. **Virémie:**
libération de
virus et
circulation dans
le sang

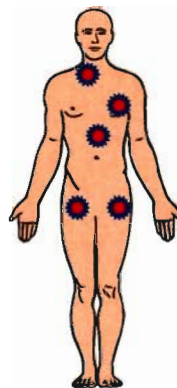


Figure n° 14 : Physiopathologie des infections à *Orthobunyavirus*.

L'infection expérimentale de moustiques avec les virus du **sérogroupe California** a été étudiée en détail (Beaty *et al.*, 1982 ; Tesh, 1983 ; Thompson et Beaty, 1978). Le moustique s'infecte en absorbant le sang d'une personne en phase virémique. Le virus est entraîné avec le sang ingéré vers l'œsophage aboutissant dans l'estomac où il résiste aux sucs digestifs du moustique. Les particules virales franchissent la paroi du tube digestif, pour rentrer dans une phase intense de réplication dans les cellules de l'épithélium intestinal. Au bout d'une à deux semaines, le virus gagne les cellules des glandes salivaires et le moustique devient infectieux. Lors d'une nouvelle piqûre, la femelle injecte systématiquement de la salive qui joue à la fois un rôle d'anesthésiant, de lubrifiant des pièces buccales mobiles, d'anticoagulant et de produit de digestion qui contient le virus. L'infection des ovaires serait nécessaire pour assurer le maintien du virus dans la population de moustiques par transmission transovarienne et infection des œufs (Watts *et al.*, 1973).

1.3.5 CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET TRAITEMENT

Les virus du séro groupe California, La Crosse, Jamestown Canyon et California encephalitis, sont responsables d'encéphalites chez l'homme (Rust *et al.*, 1999). Du fait des réactions sérologiques croisées, un grand nombre des premiers cas de maladies attribués au California encephalitis seraient probablement dus aux Jamestown Canyon ou La Crosse puisqu'on sait maintenant que le California encephalitis est peu fréquent en Amérique (Campbell *et al.*, 1992 ; Deibel *et al.*, 1983 ; Srihongse *et al.*, 1984).

La période d'incubation varie entre 3 et 7 jours. La plupart des patients rapportent un brusque début de fièvre, suivi d'une raideur du cou, de maux de tête, nausées et vomissements, puis, les symptômes disparaissent vers le 7^e jour. Plus de la moitié des patients (60 %) présentent une méningite d'emblée, avec à la fois des cellules mononuclées et des polynucléaires polymorphes dans le liquide céphalorachidien (LCR). Des symptômes neurologiques modérés non persistants sont souvent présents à la libération des patients. La séquelle la plus importante est l'épilepsie qui est observée chez environ 10 % à 15 % des enfants, souvent des patients qui ont eu des attaques au cours de la phase aiguë de la maladie.

En dehors des infections à virus Lassa et Crimée-Congo, pour lesquelles un traitement par la ribavirine est efficace, à condition de l'initier le plus tôt possible, il n'existe pas, à ce jour, de traitement spécifique de ces infections. Le traitement est surtout symptomatique : surveillances des paramètres vitaux et neurologiques, nutrition parentérale et ventilation assistée si nécessaire, administration d'antiépileptiques.

1.3.6 DIAGNOSTIC

Une grande variété de tests sérologiques a été utilisée pour le diagnostic des infections à *Orthobunyavirus*, y compris les réactions de fixation du complément (FC), d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), de neutralisation (NT), immunoenzymatique recherchant les IgM, *Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou ELISA (Calisher et Bailey, 1981 ; Charles, 1994 ; Dykers, 1985 ; Grimstad *et al.*, 1987 ; Kuno *et al.*, 1996; Sexton *et al.*, 1997).

Le diagnostic de l'infection par les virus du groupe California est principalement basé sur les méthodes sérologiques parce que ces virus sont généralement absents du sang ou des sécrétions au cours de la phase d'invasion du système nerveux central (SNC). Le test d'IHA est plus sensible pour le diagnostic de ces virus que la FC. Cependant, le test de neutralisation et la RT-PCR sont nécessaires pour l'identification des sérotypes et la confirmation des virus. L'immunocapture des IgM permet le diagnostic de la plupart des infections par les *Orthobunyavirus* mais est peu utilisée faute d'anticorps monoclonaux disponibles (Seymour *et al.*, 1983 ; Duchin, 1994).

L'isolement des *Orthobunyavirus* est obtenu soit par inoculation par voie intracérébrale de souriceaux nouveau-nés, soit en culture cellulaire en utilisant des cellules sensibles comme le clone E6 de cellules Vero (cellules de rein de singe). Une recherche directe dans les prélèvements par amplification génique est également possible.

1.3.7 LUTTE ET PREVENTION

La lutte contre les moustiques vecteurs de virus des sérogroupes California et Bunyamwera est difficile du fait de leur présence importante dans l'environnement. La maladie de l'homme et du bétail survient de manière le plus souvent sporadique ce qui rend difficile l'évaluation de l'importance du vecteur. La large utilisation des insecticides pour contrôler la population de moustique est abandonnée pour des raisons écologiques. L'utilisation de moustiquaires imprégnées et de répulsifs contenant du diéthyltoluamide (DEET) est hautement recommandée dans les régions où le risque de piqûre par un moustique infecté est élevé.

CHAPITRE 2
MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIELS

2.1.1 Souches virales

Les arbovirus isolés à l'Institut Pasteur de Bangui (IPB) de 1965 à 1995 par inoculation intracérébrale de souriceaux nouveaux-nés (SNN) ou culture cellulaire, ont été identifiés dans un premier temps. Ensuite, ils ont été adressés au CRORA (Centre de Référence OMS de Recherche pour les Arbovirus), sis à l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal), pour des tests complémentaires de confirmation et de classification par des méthodes sérologiques. Environ 241 souches ont été identifiées et classées dans le genre *Orthobunyavirus*. Plus de la moitié (133 isolats) ont été isolées à l'IPB en RCA. Parmi celles-ci, 12 appartenant aux principaux sérogroupes du genre *Orthobunyavirus* qui circulent dans le pays ont été incluses dans cette étude. Six appartiennent au séro groupe Bunyamwera, 1 au séro groupe Simbu, 1 au séro groupe Turlock, 1 au séro groupe Bakau, 1 au séro groupe Nyando, 1 au séro groupe Bwamba, et 1 au séro groupe Tete (Tableau VIII).

Tableau VIII : Les souches virales étudiées.

Référence	Virus	Année	Origine	Lieu de capture	Sérogroupe
ArB28215	Bunyamwera	1991	<i>Ae. (S) africanus</i>	Bozo	<i>Bunyamwera</i>
ArB 29051	Bunyamwera	1994	<i>Mansonia uniformis</i>	Kolongo	<i>Bunyamwera</i>
ArB 2198	Birao	1969	<i>An. pharoensis</i>	Birao	<i>Bunyamwera</i>
ArB 13529	Bozo	1979	<i>Ae. (S) opok</i>	Bozo	<i>Bunyamwera</i>
ArB 16282	Ilesha	1980	<i>Anopheles gambiae</i>	Bouboui	<i>Bunyamwera</i>
HB 80P125	Ilesha	1980	<i>Homme</i>	Bangui	<i>Bunyamwera</i>
AnB 2633d	Ingwavuma	1971	<i>Estrilda melpoda</i>	Bangui	<i>Simbu</i>
ArB 365	M'Poko	1965	<i>Culex sp</i>	M'Poko	<i>Turlock</i>
ArB 2882	Nola	1970	<i>Culex perfuscus</i>	Barya-Nola	<i>Bakau</i>
ArB 16055	Nyando	1980	<i>Anopheles funestus</i>	Bozo	<i>Nyando</i>
ArB 28851	Pongola	1994	<i>Ae. circumluteolus</i>	Bangui	<i>Bwamba</i>
AnB 1292	Batama	1970	<i>Euplectes afra</i>	La Landjia	<i>Tete</i>

2.1.2 Produits chimiques et tampons

- Trousse d'extraction, QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (50), QIAGEN,
- Trousse de purification, QIAquick[®] Gel Extraction Kit (50), QIAGEN,
- Trousse de séquençage *BigDye[®] Terminator v1.1* de *Applied Biosystems*, ABI
PRISM[®] 3100-Avant,
- SuperScript[™] II *reverse transcriptase* (EC 2.7.7.45) Invitrogen, Life
technologies,
- SuperScript[™] II RT, *5X First-Strand Buffer with 250,0 mM Tris-HCl ;*
15,0 mM MgCl₂ pH = 8,3 (Invitrogen, Life technologies),
- *Expand Long Template PCR System* (Roche),
- Tampon *Expand Long Template 10X with 17,5 mM MgCl₂* pH = 8,3 (Roche),
- Dithiothreitol (DTT) 0,1 mM (Invitrogen, Life technologies),
- *RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor* 40,0 U/μL (Invitrogen, Life
technologies),
- [dATP, dTTP, dCTP, dGTP] PCR Grade (Roche),
- Tampon Borate-EDTA pH = 8,0 (CHU NANCY, Laboratoire Central de
Biochimie),
- Ethidium Tris-Acetate 125 mM (CHU NANCY, Laboratoire Central de
Biochimie),
- Agarose LM-MP : *Multi purpose agarose, low melting point* (Roche),
- BET : *LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche),
- Bleu de dépôt : *Gel loading Buffer, 10X Bleu Juice[™]* (Invitrogen),
- Acétate de sodium 3 M, pH = 5,6 (CHU NANCY, Laboratoire Central de
Biochimie),
- Ethanol 70 % et 95 % (Merck).

2.1.3 Equipement

- Thermocycleur : 2720 *THERMAL CYCLER* (Applied Biosystems),
- Centrifugeuse réfrigérée : CL-ALLEGRA™ 64R (Beckman),
- Micro-onde : MICRO-CHEF FM 2935, 900w (Moulinex),
- Générateur à électrophorèse : *POWER PAC 3000* (Bio-Rad),
- Spectrophotomètre UV : *BIOBLOCK Scientific* (67403 Illkirch Cedex),
- Photographie de gels : *High Performance CCD Imaging System™* (Appligene),
- Pompe à vide : *DNA Speed VAC*, DNA 110 (Savant),
- Etuve : *CO₂ Incubator* (Sanyo),
- Microscope optique inversé : OLYMPUS CKX41 (OLYMPUS),
- Séquenceur : ABI PRISM 3100 *Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

2.1.4 Petit matériel

- Flacons de culture cellulaire de 25 et 75 mL Falcon® (Becton Dickinson, Drogheda, Ireland),
- Pipettes 1, 2, 5, 10 et 25 mL Falcon® (Becton Dickinson, le Pont De Claix, France),
- Tubes de PCR : MicroAmp® (Applied Biosystems),
- Tubes polypropylène fond conique 15 mL BLEU MAX® Jr. (Becton Dickinson, Drogheda, Ireland),
- Tubes polypropylène fond conique 50 mL BLEU MAX® (Becton Dickinson, Drogheda, Ireland),
- Tubes eppendorf 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne).

2.1.5 Milieu de culture cellulaire

Le milieu essentiel minimum (MEM) est enrichi avec sels de Earle et GlutaMAXTM (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France), NaHCO₃ (2,2 g/L), avec 10,0 % (v/v) de veau fœtal (Eurobio, Les Ullis, France) pour le milieu de croissance, ou avec 2,0 % (v/v) pour l'entretien des lignées de cellules Vero E6. Un g/L d'une solution d'antibiotiques est ajoutée : amikacine dosée à 8,0 mg/mL (Merck, Lyon, France), amoxicilline à 64,0 mg/mL (Clamoxyl[®], GlaxoSmithkline, Marly-le-Roi, France) et un antifongique à raison de 0,05 % (v/v) d'amphotéricine B dosée à 2,5 mg/mL (Fungizone[®], Bristol-Myers Squibb, Puteaux, France).

2.1.6 Amorces pour la RT-PCR

Les séquences d'oligonucléotides ont été choisies dans les régions qui présentent une forte similitude, après alignement de la séquence complète des segments S et M de la souche de référence Bunyamwera NC_001927 (GenBank, Bethesda, États Unis) avec d'autres séquences d'*Orthobunyavirus* extraites de GenBank. Les oligonucléotides synthétisés et purifiés par le Service Commun de Biologie Moléculaire du CHU de Brabois sont repris dans de l'eau sans RNase à une concentration de 25,0 pmol/μL. Les séquences sont celles définies par Bowen *et al.*, (2001), ainsi que celles que nous avons définies nous même par (i) la méthode de marche sur le génome et (ii) à partir des séquences de génomes d'*Orthobunyavirus* disponibles (Tableau IX).

Tableau IX : Amorces définies dans notre laboratoire et publiées par Bowen *et al.* (2001).

	Amorce	Séquence des bases (5' à 3')	Position (nt)	Région amplifiée
Couple d'amorces (S)				
Bowen <i>et al.</i> , 2001	BUNS274C	CTTAACYTTGGGGGCTGGA	272-290	320-540
	BUNS957R	CCCCIACCACCCACCC	874-889	
	BUNYA1	GTCACAGTAGTGTACTCCAC	5-20	20-750
	BUNYA2	CTGACAGTAGTGTGCTCCAC	946-961	
Définies dans notre laboratoire	BUNS1	AGTAGTGTACTCCACACTACAACT	1-25	1-300
	BUNS3	TCGTCAGGAAGTGGGTGTTCGG	325-348	
	BUNS1	AGTAGTGTACTCCACACTACAACT	1-25	106-380
	BUNS9	AGGAATCCACTGAGGCGGTGGAGG	358-381	
	BUNS4	CTGGCAACCGGAACAACCCAGTT	319-341	401-750
	BUNS5	GAGACAACCTGTCAGTGCAGACTGAA	687-711	
	BUNS10	TCAGTCTGCACTGACAGTTGTCTC	688-711	730-961
BUNS2	AGTAGTGTGCTCCACCTAAACTTA	937-961		
Couple d'amorces (M)				
Bowen <i>et al.</i> , 2001	M14C	CGGAATTCAGTAGTGTACTACC	141-162	4-617
	M619R	GACATATGYTGATTGAAGCAAGCATG	556-590	
Définies dans notre laboratoire	BunM1	AGTAGTGTACTACCGATACATCACA	1-25	1-401/700
	BunM619R	GACATATGYTGATTGAAGCAAGCATG	556-590	
	BunM3	TAAGTCTAAAGCATCTGTACTCT	497-520	2228-2400
	BunM4	TAGGGTAGTTGTGAGAGTCCCTT	1045-1068	
	BunM5	AAGGGACTCTCACAACCTACCCTA	1045-1068	830-1190
	BunM2	AGTAGTGTGCTACCGATAACAAAAC	4434-4458	
	BunM6	ATGCTGAAAATGTGGAGATATTGG	1633-1656	4128-4476
BunM2	AGTAGTGTGCTACCGATAACAAAAC	4432-4458		

2.2 METHODES

2.2.1 Culture virale

Les souches virales lyophilisées ont été reconstituées avec de l'eau d'élution (10 mM Tris-HCl, pH = 8,5) sans RNase et remises en culture sur le clone E6 de cellules Vero (rein de singe) dans du milieu d'entretien. Les cultures ont été observées une à deux fois par jour. Dès l'apparition de 50 % à 75 % d'effet cytopathogène soit 1 à 3 jours selon les souches, le mélange tapis cellulaire et surnageant de culture a été soumis à une série de congélations-décongélations. Les suspensions obtenues ont été utilisées pour l'extraction de l'ARN viral.

2.2.2 Extraction d'ARN viral

L'extraction de l'ARN viral a été réalisée avec *QIAamp[®] RNA Mini Kit* (50), Qiagen. La suspension de cellules infectées est traitée par du tampon AL reconstitué avec de l'éthanol 100 % en présence de protéinase K (EC 3.4.99.45). Les lysats sont ensuite déposés dans la colonne contenant un gel de silice. Après centrifugation, la colonne est lavée avec 2 tampons (AW1 et AW2). L'ARN est élué avec du tampon AE ou de l'eau distillée et conservé à -80°C.

2.2.3 Amplification génique

Synthèse de l'ADNc

Le mélange composé de 1,0 µg d'ARN, de 25,0 pM de chaque amorce sens (BUNS274C, BUNYA1, BUNS1, BUNS4, BUNS10) pour l'amplification du segment S ou (BUNM614C, BUNM1, BUNM3, BUNM5, BUNM7) pour le segment M et 9,0 µL d'eau a été porté à 65°C pendant 10 min, puis refroidi rapidement dans la glace fondante pendant 5 min. Un second mélange constitué de : 50 U de SuperScript™ transcriptase inverse (EC 2.7.7.45, Roche), 10,0 mM de DTT, 5X de tampon RT, 20 U d'inhibiteur de RNase (EC 2.7.7.17), 10,0 mM de chaque dNTP pour un volume final de 20,0 µL, est ajouté au premier. La synthèse de l'ADNc a été réalisée en portant successivement le mélange final à 25°C pendant 10 min, 42°C pendant 50 min et 72°C pendant 15 min.

Après la synthèse d'ADNc l'amplification génique a été réalisée dans un volume réactionnel final de 50,0 µL constitué de :

- 0,2 mM de dNTPs,
- 25,0 pM d'amorces sens et antisens (Tableau IX),
- 2,6 U de (*Expand high fidelity™*) Taq polymérase (EC 2.7.7.7, Roche),
- 10X de tampon (*Expand Long Template* plus 17,5 mM MgCl₂),
- 2,0 µL de l'ADNc,
- eau distillée stérile, pH = 8,3.

L'ensemble a été soumis à différents cycles de dénaturation, hybridation et élongation dans un thermocycleur (2720 *Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*) :

- | | | |
|-----------------------|--------|-------------|
| - dénaturation à 95°C | 10 min | 1 cycle |
| - dénaturation à 95°C | 1 min | } 35 cycles |
| - hybridation à 55°C | 1 min | |
| - élongation à 72°C | 2 min | |
| - élongation à 72°C | 10 min | 1 cycle |

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (*Low MeltingTM*) 0,8 % en tampon TBE, pH = 8,3 contenant du bromure d'éthidium (BET : *LC-FastStart DNA Master Hybridization Probe*, Roche). Les brins d'ADN d'environ 500 à 700 pb sont détectés aux UV.

2.2.4 Séquençage de l'ADN

L'ADNc amplifié est extrait du gel avec la trousse QIAquick[®] Gel Extraction (50) (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La trousse *BigDye[®] Terminator v1.1* de *Applied Biosystems*, ABI PRISM[®] 3100- a été utilisée pour déterminer les séquences sens et antisens des ADN purifiés. Le milieu réactionnel contenait : 2,0 µL de *Ready Reaction Premix 2,5X* ; 1,0 µL tampon sequencing 5X (*BigDye Terminator V1.1/V3.1*) ; 3,2 pmol d'amorce, 30 ng de matrice et d'eau bi distillée. Ce mélange a été soumis à 25 cycles d'amplification de 96°C, 10 sec (dénaturation) ; 50°C, 5 sec (hybridation) et 72°C, 4 min (élongation) dans un thermocycleur (*GeneAmp PCR System 2400*, Applied Biosystems). Le produit amplifié a été purifié par précipitation avec acétate de sodium 3,0 M ; EDTA 125,0 mM, pH = 5,6 et éthanol 95 % (v/v), puis le reste de tampon évaporé à l'aide d'une centrifugation à vide (*Speed VACTM*). Les séquences nucléotidiques ont ensuite été déterminées avec le séquenceur ABI PRISM 3100 *Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

2.2.5. Analyse des séquences obtenues

2.2.5.1 Alignement multiple

Les séquences nucléotidiques obtenues à l'aide de chaque couple d'amorces, soit une séquence avec l'amorce sens et l'autre avec l'amorce antisens, ont été alignées pour comparaison avec le logiciel MultAlin après inversion de la séquence antisens sous (INVCOMP disponible sur l'ancien site d'INFOBIOGEN) afin de vérifier leur complémentarité et spécificité. Toutes les séquences nucléotidiques obtenues à l'aide des différents couples d'amorces ont été alignées entre elles (pour chaque virus étudié), puis comparées à celles de la souche de référence Bunyamwera (NC_001927, GenBank) pour le segment S et Bunyamwera (NC_001926, GenBank) pour le segment M. Les séquences alignées ont été corrigées et il en a résulté une séquence consensus qui correspond à la séquence nucléotidique de la souche étudiée. De cet alignement multiple nous avons pu déduire le pourcentage de similitude, d'identité ou de divergence entre différentes souches.

2.2.5.2 Analyse phylogénétique

Les séquences nucléiques des isolats de RCA ont été complétées avec celles de 19 autres virus (isolés en Amérique, Europe et Asie) du genre *Orthobunyavirus*, tirées de GenBank. Toutes ces séquences ont été traduites au format Fasta puis alignées avec le logiciel CLUSTALW EBI (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>). Les régions des séquences mal alignées ou présentant une ambiguïté ont été éliminées avec le logiciel GBLOCKS (http://molevol.ibmb.csic.es/Gblocks_server) afin d'avoir des séquences homologues devant permettre de reconstruire les relations évolutives entre les virus. Ces relations

évolutives peuvent être représentées par des arbres phylogénétiques. Un arbre phylogénétique est un graphique composé de nœuds et branches ou une seule branche connecte deux nœuds adjacents. Les nœuds représentent des unités taxonomiques et les branches définissent les relations de parenté entre les unités taxonomiques.

La méthode de maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood : ML*) a été appliquée pour la construction de l'arbre phylogénétique. C'est une méthode qui estime la probabilité d'observer les données étant donné un arbre et un modèle d'évolution. Il utilise toutes les informations du jeu de données et tous les arbres possibles, tient en compte un modèle explicite d'évolution et produit des hypothèses sur l'évolution des caractères. Le ML est recherché avec le programme PHYML (Guindon et Gascuel, 2003) selon le modèle dit *General time-reversible* (GTR). Les valeurs statistiques placées sur les nœuds sont calculées par le *bootstrap*, ce qui correspond à l'estimation de la robustesse de l'arbre et des branches, en comparant cent fois la séquence de chaque souche à celles des autres. Si un arbre est robuste, c'est-à-dire fortement soutenu par les données, alors sa variabilité sera faible. Par contre si un arbre est peu robuste il aura une grande variabilité. Ainsi, une valeur de *bootstrap* de 100 % est équivalente à un nœud vrai ou robuste.

CHAPITRE 3
RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 ANALYSE DU SEGMENT S

3.1.1 Séquençage

Toutes les souches virales lyophilisées ont été reconstituées en eau distillée, filtrées sur filtre Nalgène 0,22µm, puis 200 µL de filtrats ont été ajoutées sur une monocouche de cellules Vero E6 en culture. La lecture quotidienne des boîtes ensemencées a été faite au microscope inversé pour rechercher des modifications morphologiques de cellules, ou effets cytopathogènes (ECP). Après 72 heures d'observation, environ 75 % des cellules infectées ont présenté un ECP (Tableau X). La souche M'Poko ArB365 avait donné 100 % d'ECP au bout de 24 heures d'incubation. Les anomalies suivantes ont été observées : réfringence des cellules, attaque uniforme du tapis cellulaire et rétraction du cytoplasme induisant un maillage du tapis cellulaire donnant un aspect en "filet de pêche."

Tableau X : Délai d'apparition des effets cytopathogènes.

Virus	75 % d'ECP
ArB28214 Bunyamwera	4 jours
ArB29051 Bunyamwera	3 jours
ArB2198 Birao	2 jours
ArB2882 Nola	4 jours
ArB13529 Bozo	3 jours
ArB16282 Ilesha	3 jours
HB80P125 Ilesha	3 jours
ArB2633d Ingwavuma	4 jours
ArB365 M'Poko	1 jour (100 % d'ECP)
ArB16055 Nyando	3 jours
ArB28851 Pongola	5 jours
AnB1292 Batama	4 jours

Trois méthodes d'extraction de l'ARN viral ont été testées : l'extraction au Trizol^{TR}, phénol-chloroforme et par la trousse *QIAamp*[®] *RNA Mini Kit* (50). Les rendements étant comparables, la méthode d'extraction au Qiagen, simple à mettre en oeuvre, rapide (environ 15 minutes) et moins coûteuse a été retenue. Après extraction des ARN viraux, plusieurs optimisations ont été effectuées sur le protocole d'amplification décrit par Bowen et *al.* (2001) ce qui a permis d'obtenir un amplicon de la taille attendue. La réaction de transcription inverse a été optimisée au thermocycleur par la séquence : 25 °C / 10 min, 42 °C / 50 min, 72 °C / 15 min au lieu de 42 °C / 1 h selon le protocole décrit par Bowen et *al.* (2001). La température d'hybridation a également été portée à 55 °C au lieu de 42 °C afin de réduire les bandes non spécifiques.

Le couple d'amorces BUNYA1 / BUNYA2 (segment S), décrits par Bowen et *al.* (2001), est spécifique des virus des sérogroupes California et Bunyamwera, tandis que le couple d'amorces BUNS274C/BUNS957R est spécifique des régions fortement conservées du segment S des virus du séro groupe Bunyamwera. Ces amorces ont été utilisées en première intention dans une réaction de RT-PCR, afin de vérifier l'identification des souches isolées en RCA. Cette réaction d'amplification génique avait permis d'obtenir un segment d'ADN de taille attendue (500-700 pb) pour le segment S comme le montre un exemple de 6 souches sur 12 (Figure n° 15). En réalité, nous avons pu ainsi amplifier 10 souches sur les 12 sélectionnées au départ. Les souches Batama et Pongola ne pouvant pas être amplifiées par ces amorces.

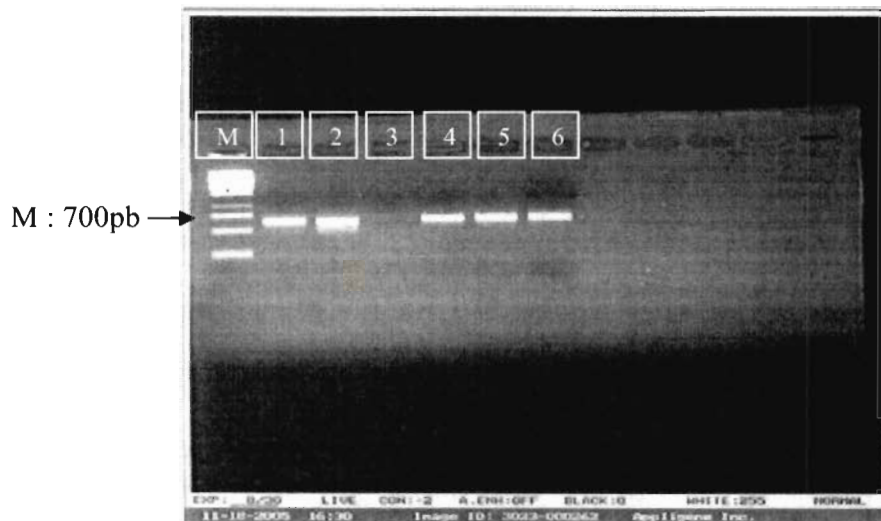


Figure n° 15 : Contrôle de purification d'amplicons de différentes souches, obtenus à l'aide du couple d'amorce BUNS274C/BUNS957R.
 Ligne 1 : Bunyamwera ArB28215 ; 2 : Birao ArB 2198 ; 3 : Pongola ArB28851 ; 4 : Bozo ArB13529 ; 5 : Bunyamwera ArB29051 ; 6 : Ilesha HB80P125 ; M : marqueur de taille.

Après une purification des amplicons à l'aide de QIAquick® Gel Extraction Kit (50), une première réaction de séquençage a été réalisée avec les amorce sens (BUNS274C) et antisens (BUN957R). Il a ainsi été obtenu une séquence nucléotidique partielle du segment S des souches de RCA. L'utilisation des couples d'amorces définis dans notre laboratoire, dont BUNS1/BUNS3, a également permis de compléter la séquence de ce segment S (Figures n° 16a, et n° 16b).

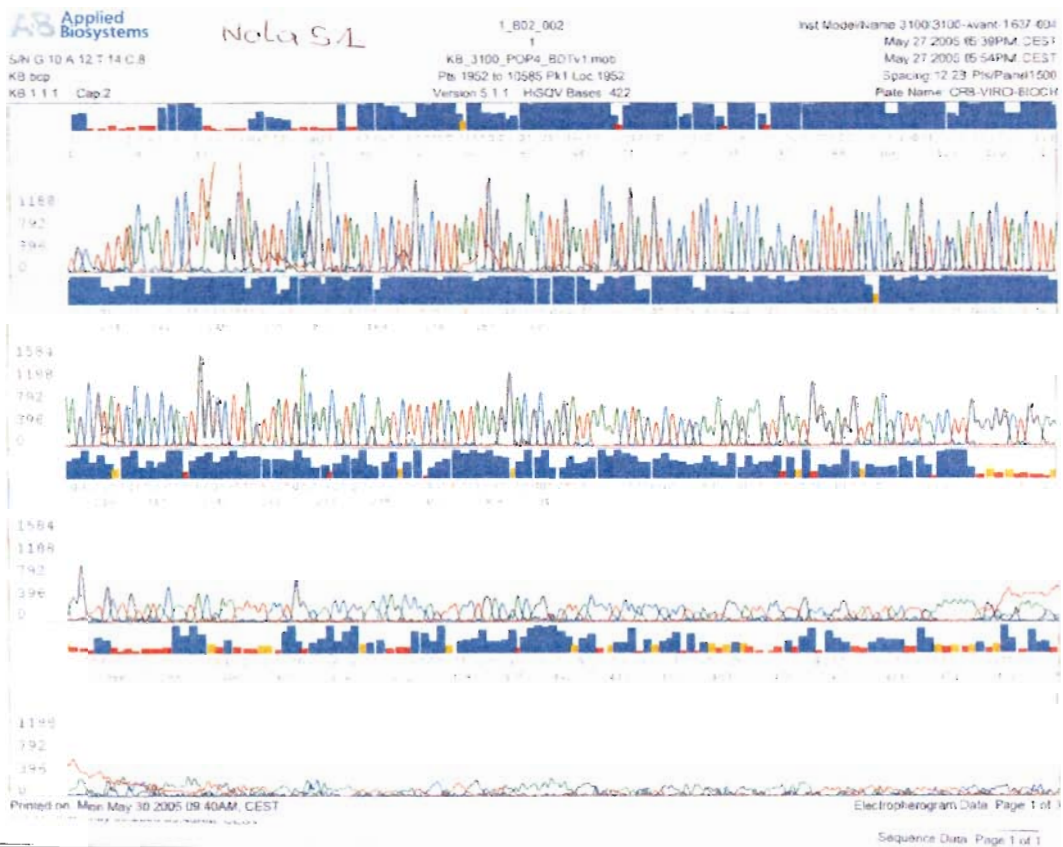
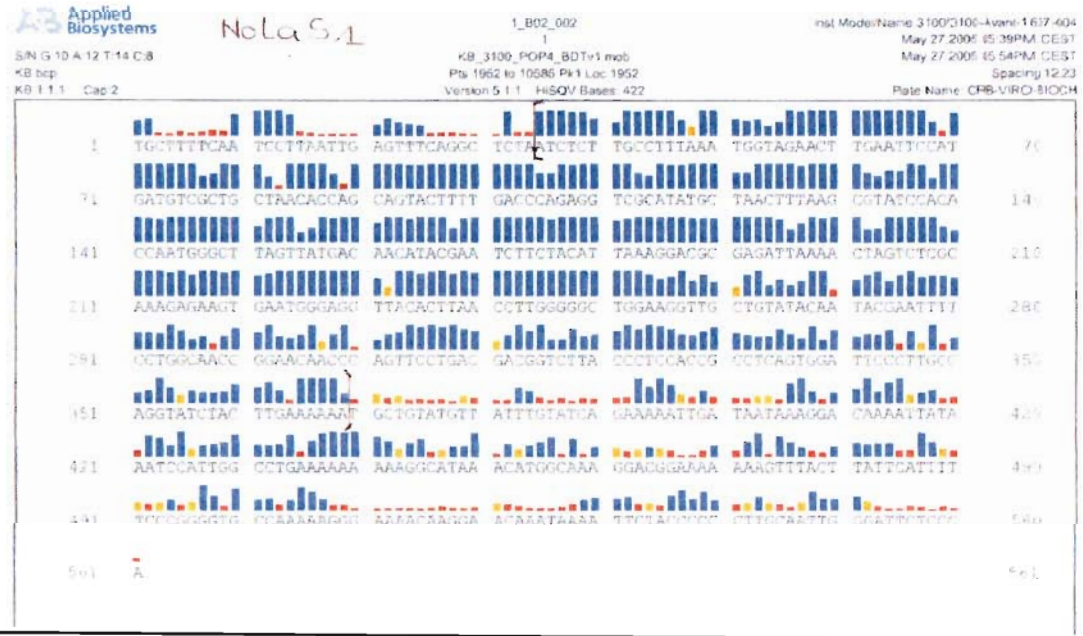


Figure n° 16a : Résultat de séquençage du segment S de la souche Nola ArB2882, réalisé avec l'amorce sens BUNS1 (séquence nucléotidique et chromatogramme).

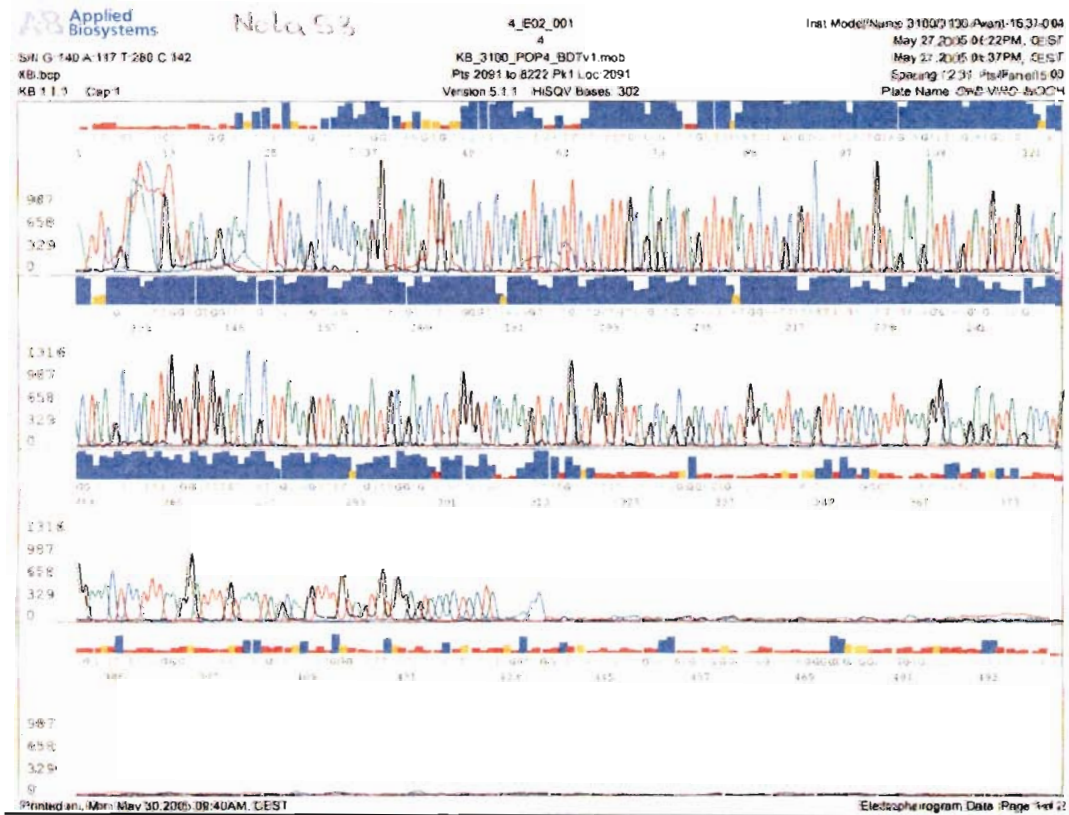
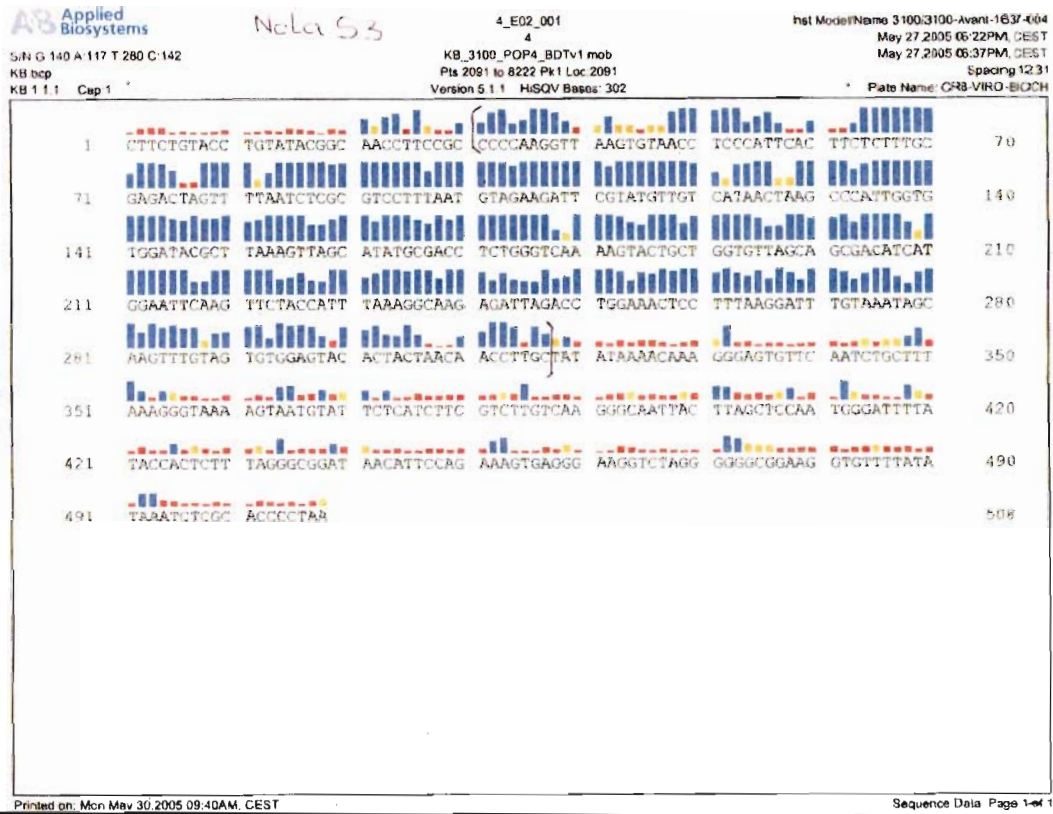


Figure n° 16b : Résultat de séquençage du segment S de la souche Nola ArB2882, réalisé avec l'amorce antisens BUNS3 (séquence nucléotidique et chromatogramme).

Les séquences nucléotidiques obtenues à l'aide des amorces sens et antisens ont été alignées entre elles (Figure n° 17).

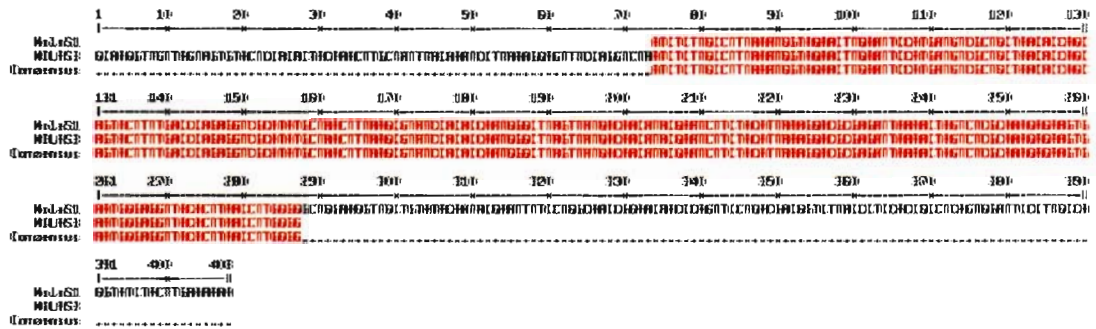


Figure n° 17 : Comparaison sur MultAlin de séquences nucléotidiques de la souche Nola ArB2882, après inversion de la séquence antisens (NolaS1 : séquence sens ; NolaS3 séquence antisens inversée).

Après vérification de la qualité des séquences nucléotidiques de chaque souche, celles-ci ont été alignées avec la séquence complète du segment S de la souche de référence Bunyamwera NC_001927 afin de déterminer leur similitude et la longueur du segment amplifiée. Cette comparaison avait permis de montrer que les séquences nucléotidiques de chacun des virus étudiés avaient une grande homologie avec celle du virus Bunyamwera NC_001927, virus prototype du genre *Orthobunyavirus* (Figure n° 18).

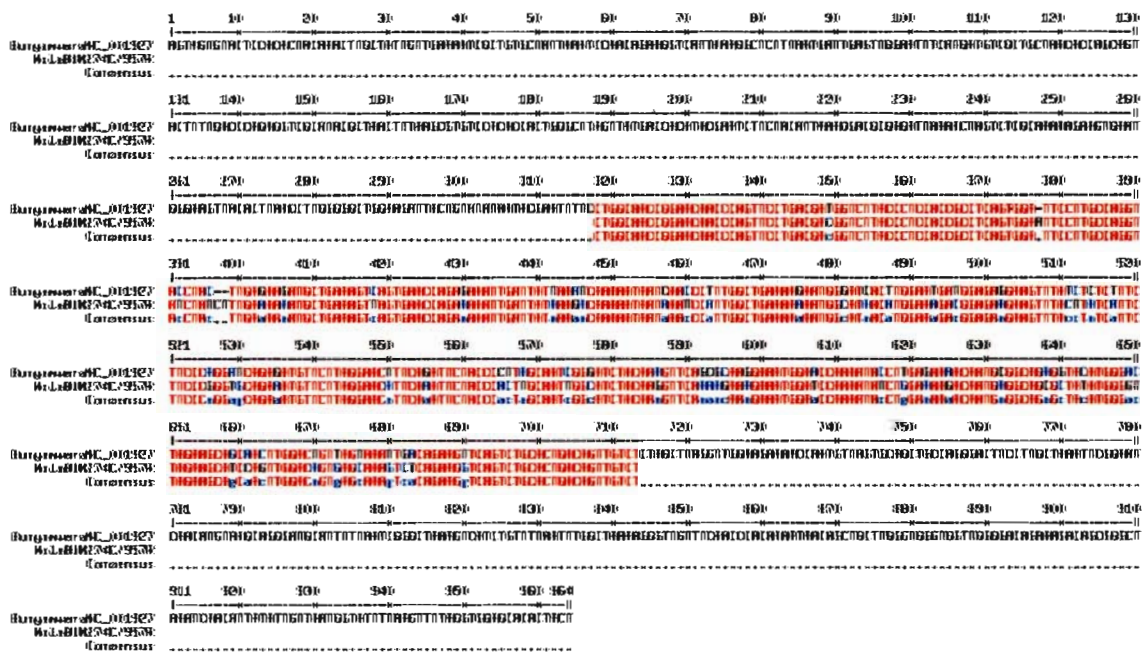


Figure n° 18 : Comparaison de la séquence partielle de Nola ArB2882 (amorce BUNS274C/BUNS957R) à celle de la souche de référence Bunyamwera NC_001927 (GenBank).

Les *Orthobunyavirus* isolés en RCA n’avaient jamais été séquencés, et les amorces décrites par Bowen *et al.* 2001 (BUN274C/957R) n’ont permis d’obtenir qu’une séquence nucléotidique partielle du segment S de ces souches. Par conséquent, plus de 275 réactions de séquençage ont été réalisées avec les jeux d’amorces définis au laboratoire, à raison de 18 à 25 séquençages par virus. Puis un alignement multiple des différentes séquences nucléotidiques partielles a été réalisé avec le programme MultAlin. Les éventuels artéfacts d’insertion ou de délétion des bases liés au logiciel de l’ABI PrismTM ont été corrigés à l’aide d’une 3^e, voire 4^e séquence sens ou antisens de la zone intéressée. Cette combinaison des séquences nucléotidiques partielles corrigées a finalement permis d’obtenir une séquence complète du segment S de dix virus sur douze étudiés (Tableau XI).

Les virus Pongola ArB28851 et Batama AnB1292 isolés à l'Institut Pasteur de Bangui (RCA) et classés par les méthodes sérologiques dans les sérogroupe Bwamba et Tete respectivement n'ont pu être amplifiés avec ces différents jeux d'amorces. Des séquences terminales conservées d'environ 11 nucléotides (spécifiques des *Orthobunyavirus*) ont également été utilisées pour tenter d'amplifier ces deux dernières souches (Pongola ArB28851 et Batama AnB1292). Une bande visible sur gel d'agarose d'environ 250 pb a été observée. Malheureusement, après purification, celle-ci s'est révélée résulter d'un « tricotage des amorces ». Ces virus sont néanmoins en cours de séquençage avec les amorces décrites et suggérées par Kuno *et al.*, (1996 et communication personnelle).

L'analyse de l'alignement de toutes les séquences (Figure n° 19), a permis de connaître pour chaque position la variabilité en bases. Cet alignement servira aussi à produire une séquence consensus et une table de fréquence des éléments constitutifs de la séquence.

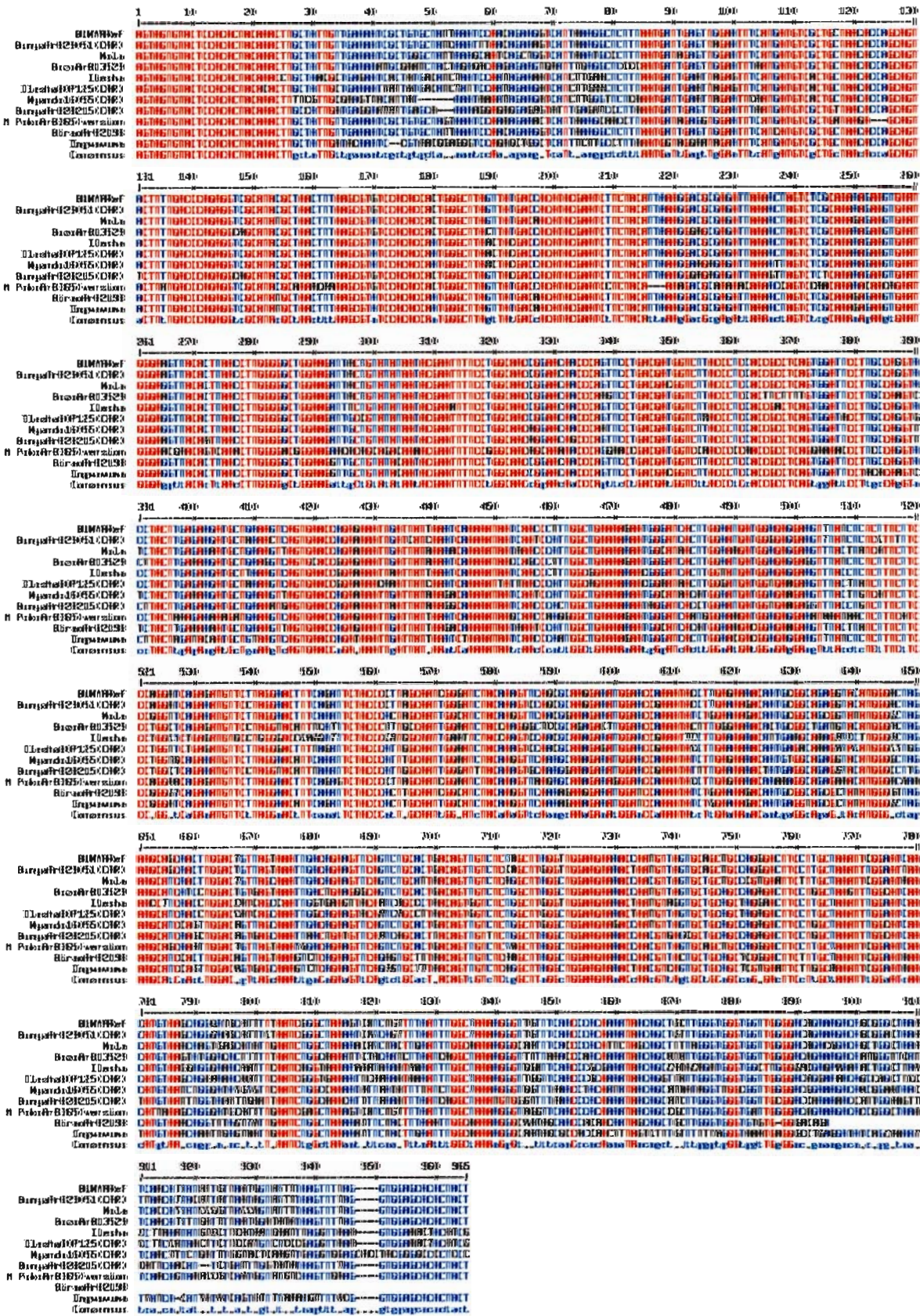


Figure n° 19 : Alignement de différentes séquences nucléotidiques complètes du segment des isolats de RCA et de la souche référence NC_001927 pour recherche de similitude.

3.1.2 Caractéristiques du segment S

La taille du segment S des dix isolats de RCA varie entre 894 et 961 bases (Tableau XI). L'organisation du segment S de ces souches est comparable à celle des virus de sérogroupes Bunyamwera, California et Simbu, autrement dit, des virus du genre *Orthobunyavirus* comme l'avait décrit Elliott (1989 et 1990) avec ses deux cadres ouverts de lecture (ORF : *Open Reading Frame*) chevauchant qui codent les protéines N et Ns. Le plus grand ORF correspond à la protéine N et mesure environ 648 à 723 bases (Tableau XI). Cette protéine N débute aux positions 80 à 86 en 5', et se termine en position 785 à 808 en 3' selon les virus. La séquence correspondante d'acides aminés de la protéine N de toutes les souches est caractérisée par la présence d'une seule méthionine initiale (Figure n° 20).

L'ORF de la protéine NSs mesure de 252 à 306 nucléotides. Quelle que la souche, il débute en 5' au nt 105 et se termine en 3' entre les nt 356 et 440. Le début de toutes les séquences correspondantes d'acides aminés est caractérisé par la présence de deux méthionines à l'exception de celle de la souche Birao ArB2198 (Fig. n° 21). La région codante est flanquée de deux régions non codantes ou NCR « *Non Coding Region* » de 79 à 85 bases en 5' et 150 à 181 bases en 3' (Tableau XI). Elles contiennent des séquences complémentaires inversées comme cela avait été décrit par Dunn *et al.*, (1994).

Tableau XI : Composition en bases et acides aminés du segment S de l'ARN des *Orthobunyavirus* isolés en RCA.

Sérogroupe	Virus	Année	Origine	Séquences de bases du segment S						Séquences d'acides aminés	
				Longueur			A+U (%)	Protéine N (% identité / Pr)	Protéine NSs (% identité / Pr)	Protéine N (% identité / Pr)	Protéine NSs (% identité / Pr)
				Total	5'NCR	3'NCR					
Bunyamwera	Bunyamwera NC_001927	1991	<i>Ae. (S) africanus</i>	961	85	174	58.17	702	306	233	101
	Bunyamwera ArB28215	1994	<i>Ae. (S) africanus</i>	956	82	172	59.83	702 (84.4)	306 (92.9)	233 (91.8)	101 (93.1)
	Bunyamwera ArB29051	1969	<i>Mansonia uniformis</i>	961	85	174	59.00	702 (94.6)	306 (99.7)	233 (99.6)	101 (100.0)
	Birao ArB2198	1979	<i>An. pharoensis</i>	894	85	107	58.95	702 (86.8)	303 (94.2)	233 (93.1)	100 (91.1)
	Bozo ArB13529	1980	<i>Ae. (S) opok</i>	961	85	174	57.96	702 (88.2)	306 (93.3)	233 (87.1)	101 (91.1)
	Ilesha ArB16282	1980	<i>Anopheles gambiae</i>	961	85	174	58.79	702 (84.9)	330 (94.6)	233 (87.6)	109 (86.2)
	Ilesha HB80P125	1971	Human	961	85	174	58.79	702 (83.2)	252 (94.9)	233 (94.4)	83 (77.2)
Bakau	Nola ArB2882	1965	<i>Culex perfuscus</i>	961	85	174	58.69	702 (89.0)	306 (96.4)	233 (96.1)	101 (94.1)
Turlock	M'Poko ArB365	1970	<i>Culex sp.</i>	955	85	147	58.17	723 (81.9)	288 (75.7)	240 (71.1)	95 (60.4)
Simbu	Ingwavuma ArB2633d	1980	<i>Estrilda melpoda</i>	958	83	227	59.19	702 (59.9)	294 (92.6)	233 (89.1)	97 (86.1)
Nyando	Nyando ArB16055	1994	<i>An. funestus</i>	959	79	178	59.54	702 (86.4)	306 (93.1)	233 (92.3)	101 (92.1)
Bwamba	Pongola ArB28851	1970	<i>Ae. circumluteolus</i>	Non amplifiées							
Tete	Batama AnB1292	1991	Euplectes afra								

NCR : région non codante (*non coding region*); Pr : prototype; Protéine N : protéine de la nucléocapside; Protéine NSs : protéine non structurale.

La comparaison des séquences nucléotidiques complètes du segment S des souches de RCA avec celle de la souche de référence Bunyamwera NC_001927 montre une différence variant de 5 % à 15 % entre les bases de la souche de référence et celles des souches de RCA étudiées.

3.1.3 Protéine de la nucléocapside

La comparaison des séquences d'acides aminés de la protéine N des souches de RCA et de la souche de référence NC_001927, montre une divergence qui varie de 0,4 % à 29,0 % selon les virus (Tableau XII, première ligne / moitié supérieure). La protéine N de la souche M'Poko a le taux de substitution d'acides aminés le plus élevé soit 29 % de substitution (Figure n° 20). Les divergences obtenues entre les séquences de cette souche et celles des autres souches de RCA varient de 29,0 % à 43,0 % (Tableau XII, moitié supérieure, colonne 10). Cependant, des petites régions fortement homologues correspondent aux codons 77-80, 202-209, 211-218 et 220-232 (Figure n° 20). Par contre la comparaison des 9 autres souches entre elles montre une grande similitude (Figure n° 21).

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

Bunyamwera NC_001927 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 Notah-B2882 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 Btraohr-B2198 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 IleshaH880P125 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 BunyamweraHr-B2633 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 IngwavumaHr-B2625 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 IleshaHr-B16282 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 Bozohr-B13529 MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 H Pokohr-B365 MIEVEFHDV-HDKSSTYDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN
 Consensus MIELEFHDVHNTSSTFDPEVRYANFKRVIHTGLSDVDIRIFVYKGRKIKTSLAKRSEMEVTLNLGGKITYVYNTLFFGKNNPVPDDELTHRLSGFLRRLLEKMLKVSPEKLIKTIINPLREKN

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 242

Bunyamwera NC_001927 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 BunyamweraHr-B29051 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 Notah-B2882 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 Btraohr-B2198 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 IleshaH880P125 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 BunyamweraHr-B2825 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 IngwavumaHr-B2633 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 IleshaHr-B16282 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 Bozohr-B13529 GITMNDGEEVYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 H Pokohr-B365 GIMKDGEEIIMNSFIPGITEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN
 Consensus GITLW.DGEEIYLSFFPGEMLGTRFYPLRIGIYKVRKEMEPKYLEKTRQRVMGLERHTVTSKLTENVNSALTVVSSLGGKKTNVAAARDFLRKFGLIN

■ AA identiques
 ■ 1 AA majoritaire
 ■ 2 AA possibles

Figure n° 20 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine N des isolats de RCA avec celle de la souche Bunyamwera NC_001927.

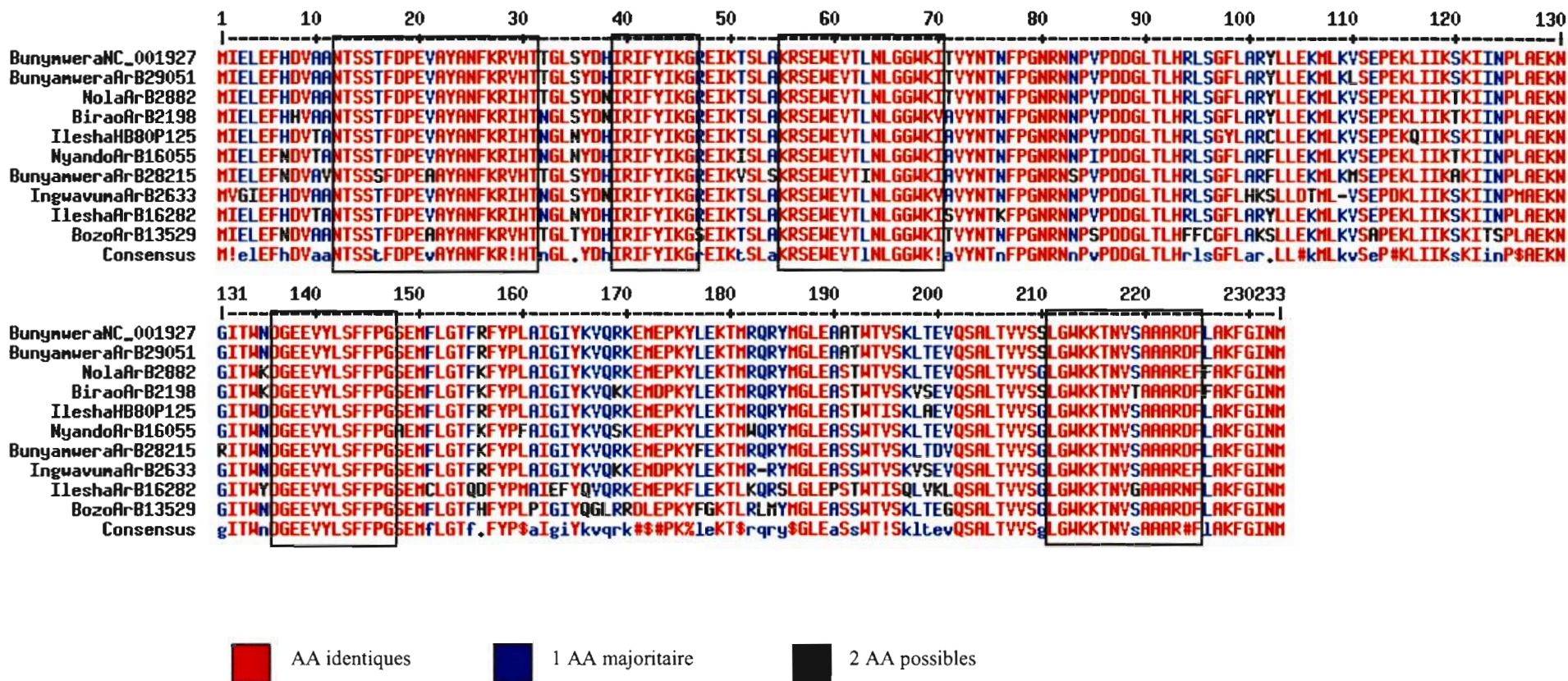


Figure n° 21 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine N des *Orthobunyavirus* de RCA avec celle de la souche Bunyamwera NC_001927 sans la séquence de la souche M'Poko ArB365 montrant de grandes similitudes.

L'alignement d'un court fragment permet de déduire qu'au cours de l'évolution des substitutions se sont produites entre les résidus glutamate (E) et glycine (G) du codon 3 ; alanine (A) et thréonine (T) au codon 10 ; thréonine (T) et sérine (S) du codon 16 ; valine (V) et alanine (A) au codon 21, et finalement qu'il s'est produit une délétion du codon 10 de la souche M'Poko (Figure n° 20).

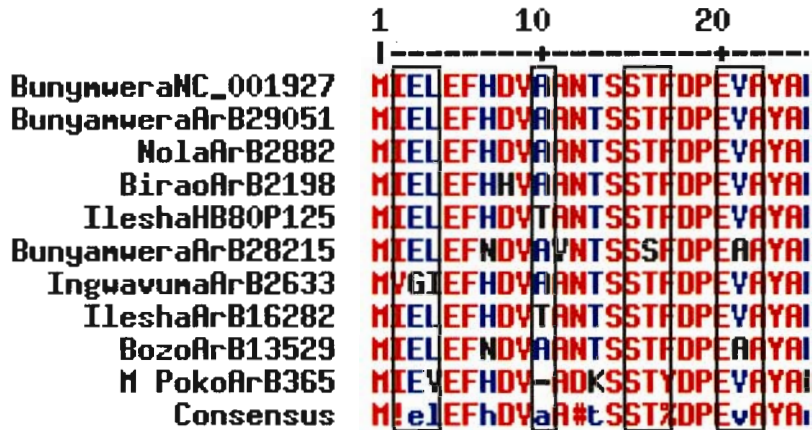


Figure n° 20 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine N des isolats de RCA avec celle de la souche Bunyamwera NC_001927.

Par ailleurs, d'un point de vue stérique et physicochimique, pour les codons 11 et 21 la valine est proche de l'alanine, et pour le codon 16 la thréonine a les mêmes propriétés que la sérine. En conséquence, la substitution d'une valine par une alanine ou d'une thréonine par une sérine n'a généralement aucune incidence sur la fonction de la protéine. De telles substitutions sont dites conservatives et sont relativement fréquentes au cours de l'évolution car elles modifient peu le phénotype protéique et offrent donc peu de prise à la sélection naturelle.

Plusieurs résidus sont hautement conservés comme par exemple, les résidus 5 à 6, 14 à 24, 27 à 31 etc. Y aurait-il une relation entre ces résidus et les épitopes correspondant aux sites de fixation du complément responsables des réactions croisées que l'on observe au cours des tests sérologiques pour les différents virus du genre *Orthobunyavirus*? La détermination des structures tertiaires de ces épitopes par analyse *in silicio* et leur synthèse devraient permettre de vérifier cette assertion.

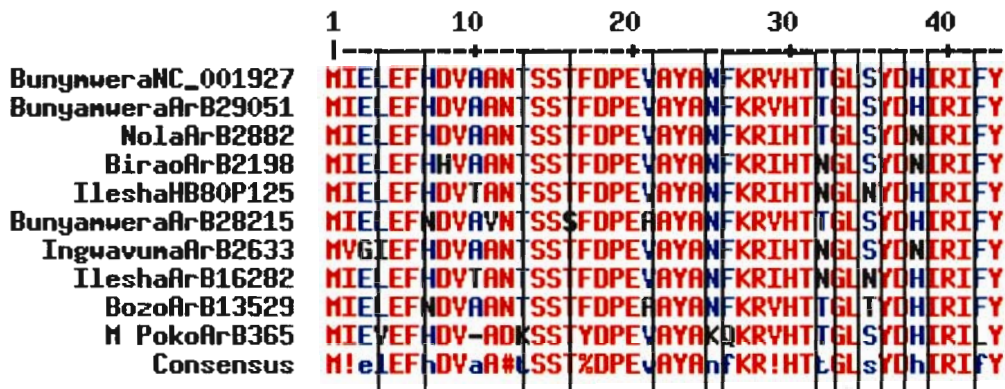


Figure n° 20 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine N des isolats de RCA avec celle de la souche Bunyanwera NC_001927. Encadrés, les résidus hautement conservés.

3.1.4 Protéine non structurale

La comparaison des séquences de la protéine NSs des différentes souches à celle de la référence montre également des substitutions ou différences entre les séquences d'acides aminés de 6 % à 40 % (Tableau XII, moitié inférieure, Figure n° 22). Le plus fort taux de substitution d'acides aminés a été observé avec la séquence de la souche M'Poko (40 %). Cette divergence a été d'autant plus importante (40 % à 49 %) lorsque la séquence de la souche M'Poko a été comparée à celle des 9 autres souches (Figure n° 22). Il est d'ailleurs remarquable de souligner que la souche M'Poko possède outre (i) une délétion pour la protéine N, (ii) cette variabilité importante de la protéine non structurale et (iii) la capacité à induire l'ECP en 24 heures sur les cellules Vero. Ces constatations sont peut-être liées et devraient être étudiées plus en détail car elles confèrent un avantage prolifératif et évolutif à M'Poko.

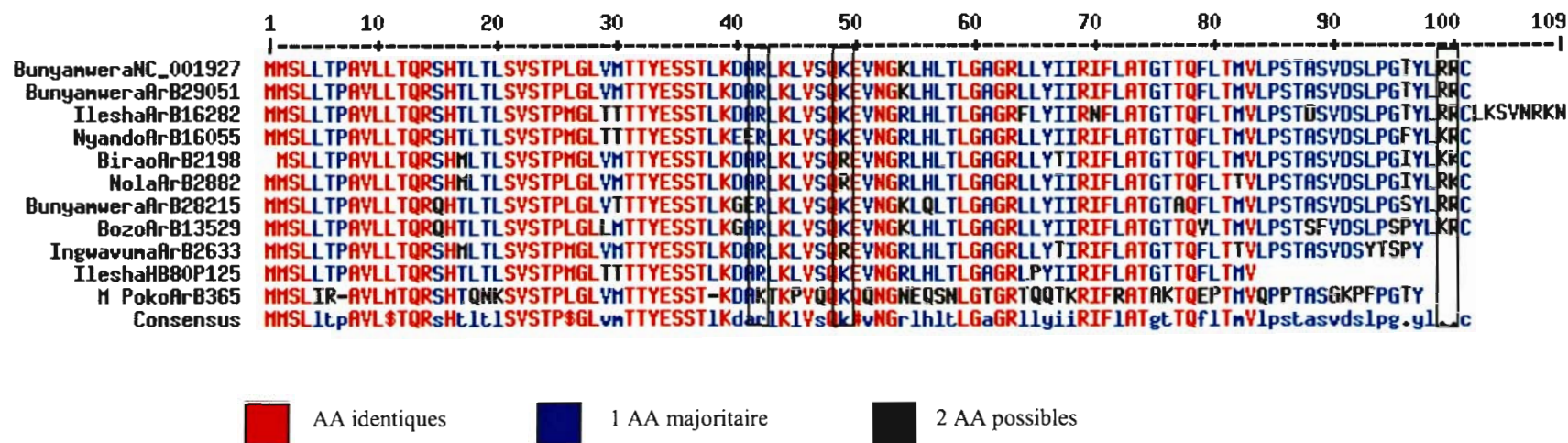


Figure n° 22 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine NSs des isolats de RCA avec celle de la souche Bunyamwera NC_001927. Substitution entre deux acides aminés basiques (Arginine = R en Lysine = K) sans conséquence majeure (codons : 42, 49, 99, 100).

Malgré toutes ces divergences de séquences en acides aminés de la protéine NSs, la plupart des substitutions d'acides aminés observées entre les séquences de la protéine NSs de différentes souches étudiées sont conservatives notamment aux codons 5, 42, 45, 49, 56, 61, 75, 77, 80, 90 etc. (Figure n° 22). D'autre part, la séquence d'acides aminés de la protéine NSs de la souche Bunyamwera ArB29051 est identique (100 % d'identité) à celle de la souche de référence NC_001927 (Tableau XII, colonne 1).

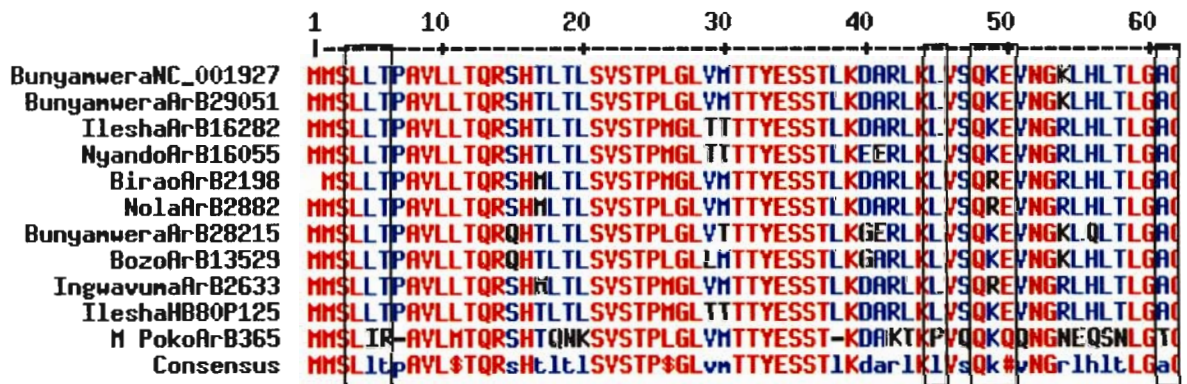


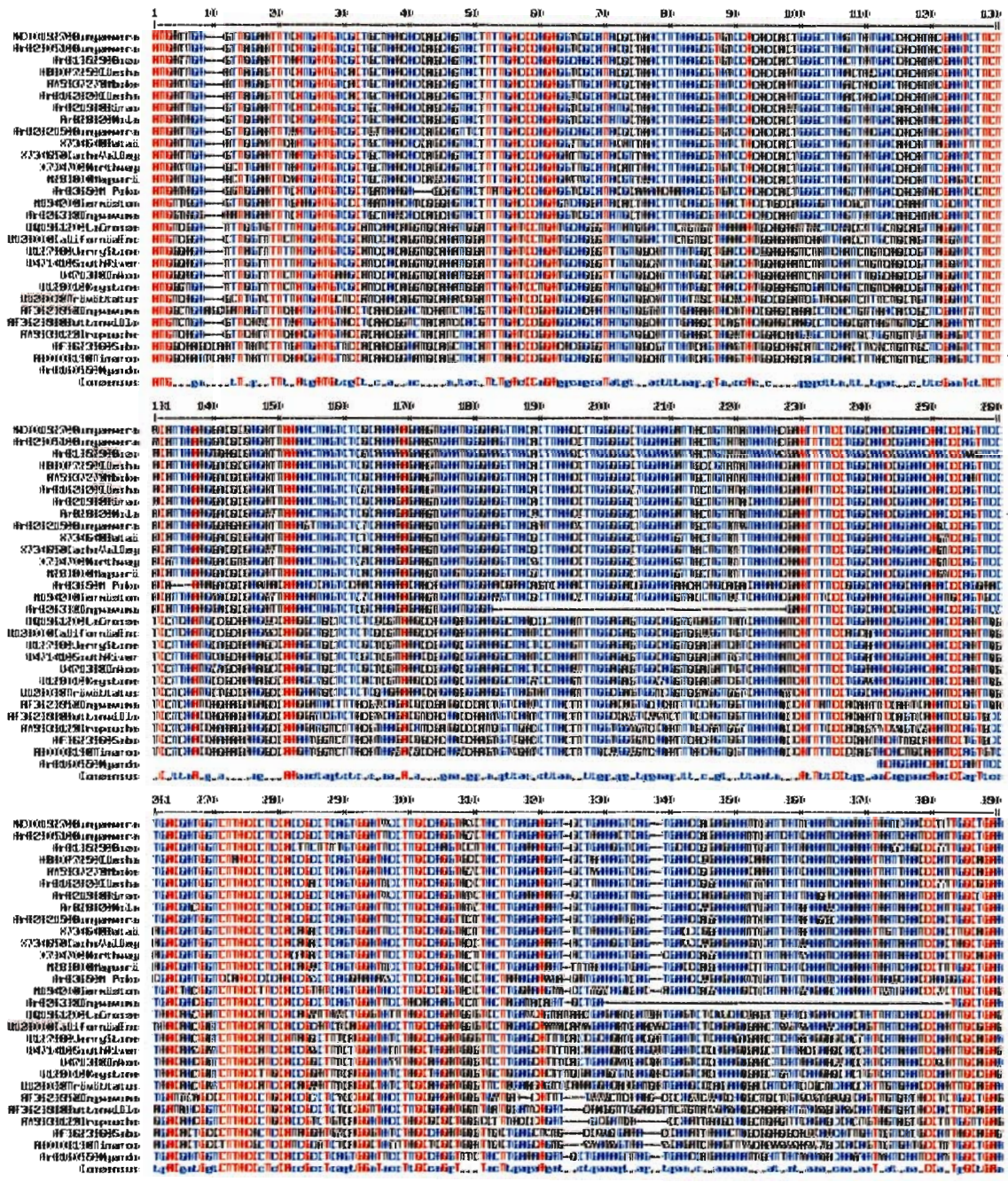
Figure n° 22 : Alignement des séquences d'acides aminés de la protéine NSs des isolats de RCA avec celle de la souche Bunyamwera NC_001927.
 Substitution entre deux acides aminés sans conséquence majeure : Arginine = R en Lysine = K : codon 49 ;
 Leucine en Isoleucine : codon 5.

Tableau XII : Pourcentage d'identité entre les séquences de la protéine N (moitié supérieure du tableau) et NSs (moitié inférieure) des isolats de RCA et la souche NC_001927.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	NC_001926	Bunyamwera ArB28215	Bunyamwera ArB29051	Birao ArB2198	Bozo ArB13259	Nola ArB2882	Ilesha HB80P125	Ilesha ArB16282	Nyando ArB16055	M'Poko ArB365	Ingwavuma ArB2633d
NC_001926		91.8	99.6	93.1	87.1	96.1	94.4	87.6	92.3	71.1	89.3
ArB28215	93.1		91.8	88.0	85.0	91.0	89.3	82.4	91.0	64.9	85.0
ArB29051	100.0	93.1		92.7	86.7	95.7	94.0	87.1	91.8	70.7	88.1
ArB2198	91.1	85.1	91.1		81.5	95.3	91.8	85.4	91.0	66.5	91.0
ArB13259	91.1	89.1	91.1	85.1		85.4	84.1	79.4	84.5	61.6	81.1
ArB2882	94.1	88.1	94.1	95.0	86.1		93.6	87.6	92.7	68.2	89.7
HB80P125	77.2	73.3	77.2	75.2	74.3	75.2		89.3	93.1	66.9	88.8
ArB16282	86.2	81.7	86.2	81.7	79.8	86.2	73.4		86.7	60.7	81.5
ArB16055	92.1	91.1	92.1	90.1	88.1	89.1	79.2	86.2		66.1	87.6
ArB365	60.4	55.4	60.4	56.0	53.5	56.4	51.5	51.4	54.5		64.5
ArB2633d	86.1	80.2	86.1	90.1	82.2	90.1	78.4	77.1	84.2	56.7	

3.1.5 Analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques de la protéine N des dix isolats des RCA ainsi que 19 autres extraits de GenBank, ont été alignées sur le programme CLUSTALw. Les régions présentant une ambiguïté ont été supprimées à l'aide du programme GBLOCKS (cf. matériel et méthodes). Les séquences corrigées ont servi à la construction de l'arbre phylogénétique (Figure n° 23).



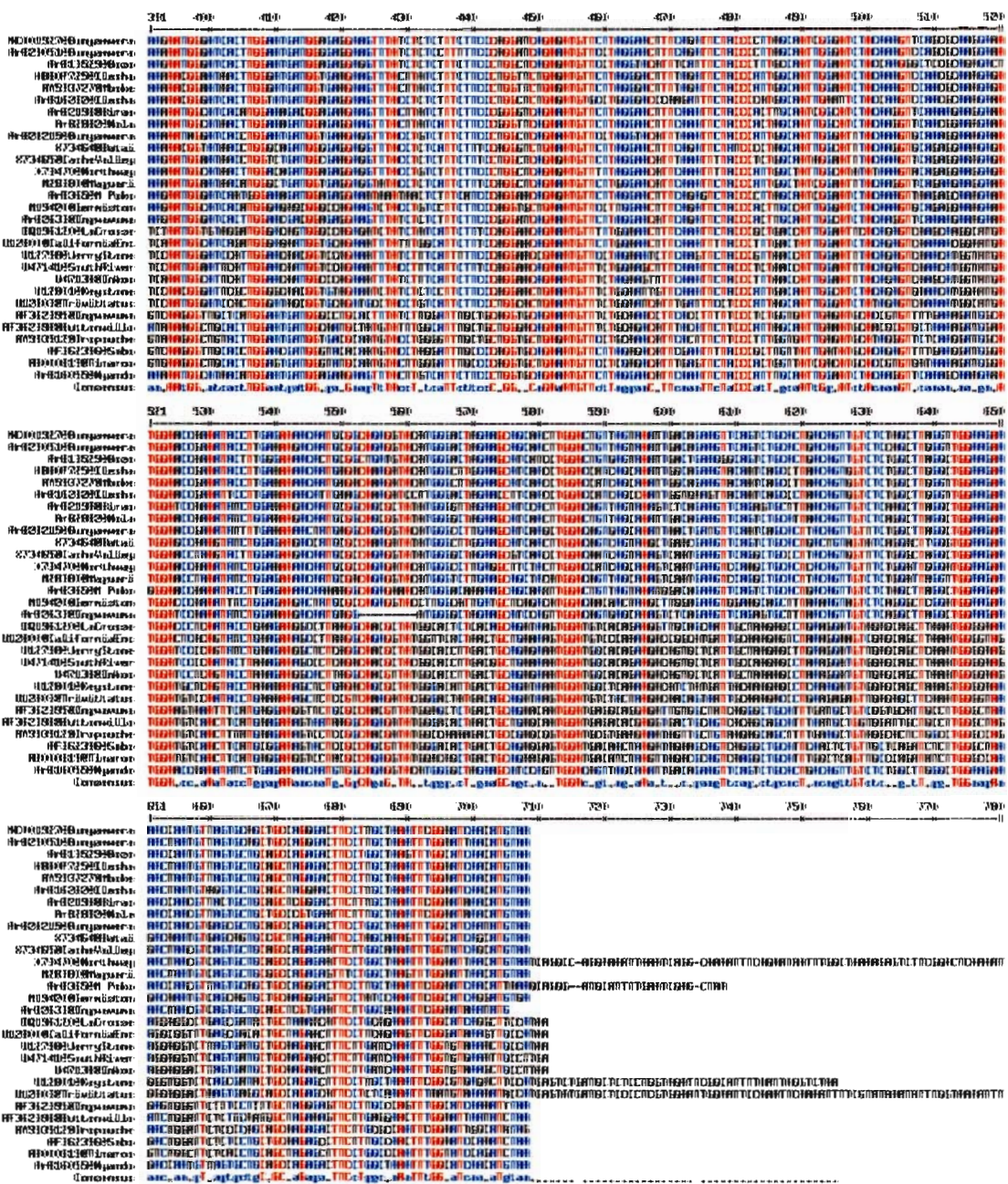


Figure n° 23 : Alignement des séquences nucléotidiques de la protéine N des *Orthobunyavirus* de RCA et d'autres extraits de *GenBank*.

Après construction de l'arbre phylogénétique avec les séquences nucléiques du gène N (Figure n° 24), trois groupes de séquences peuvent être individualisés:

- (i) le groupe de séquences ou séro groupe Bunyamwera contenant la souche prototype Bunyamwera NC_001927 et les souches apparentées,
- (ii) le séro groupe California,
- (iii) le séro groupe Simbu.

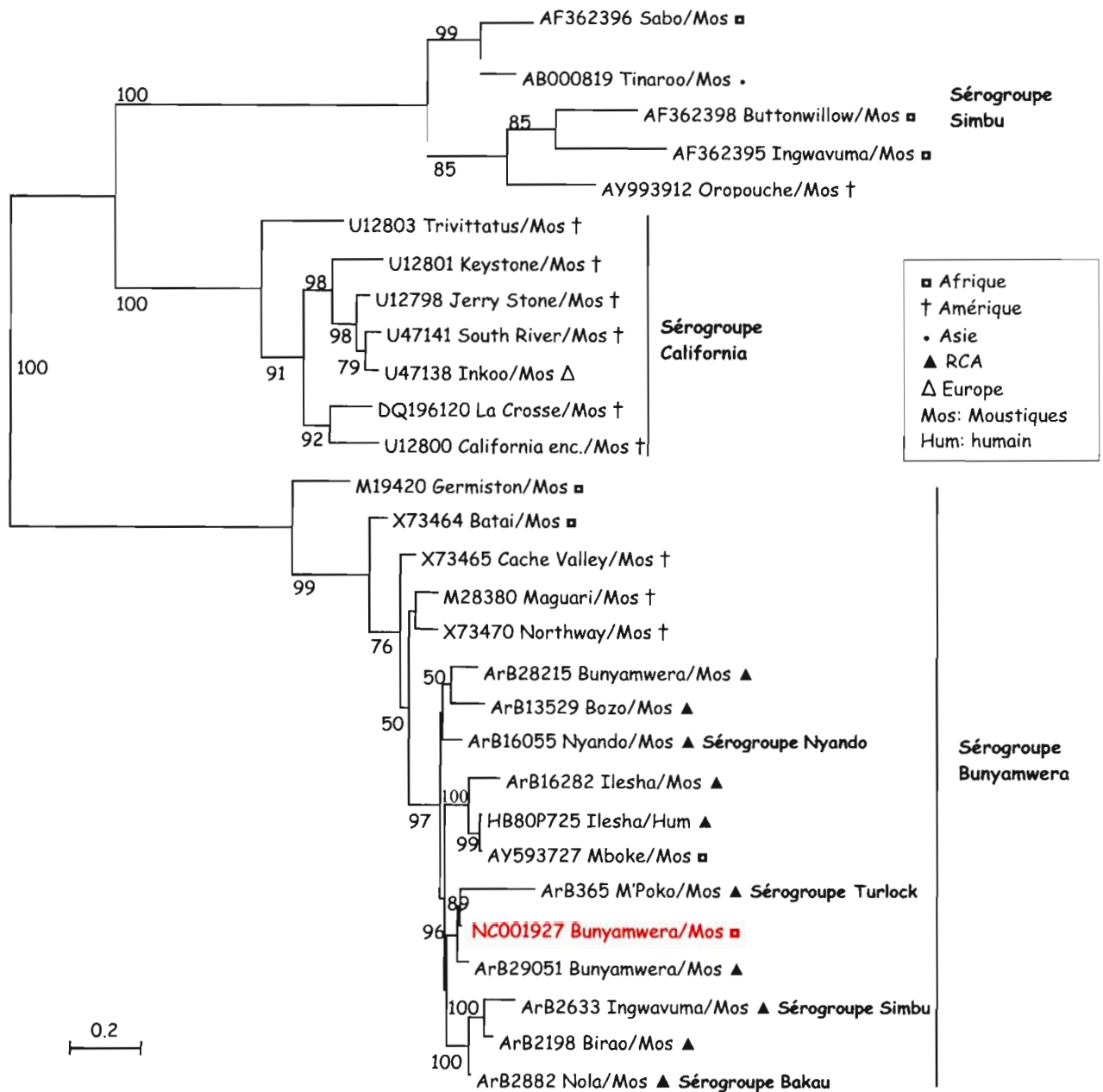


Figure n° 24 : Arbre phylogénétique non enraciné obtenu à l'aide des séquences nucléotidiques de la protéine N par la méthode du maximum de vraisemblance. L'échelle des barres représente le pourcentage de substitution par site. Les nombres sur les nœuds sont les valeurs de Bootstrap et les valeurs inférieures à 50 % ont été supprimées. La leur longueur des branches traduit la vitesse évolutive entre espèces.

Les dix isolats de RCA sont regroupés à l'intérieur du cluster I formé par les virus membres du séro groupe Bunyamwera (Figure n° 24). Ce cluster est bien séparé des deux autres constitués de virus des sérogroupe California et Simbu. Ce résultat est robuste avec une valeur de bootstrap de 100 %. Bien qu'à l'intérieur du séro groupe Bunyamwera, les valeurs du bootstrap entre les différents nœuds ne soient pas toutes élevées (ex. 50 % entre ArB28215 Bunyamwera et ArB13529 Bozo), ce groupe forme un clade (ensemble regroupant probablement des espèces issues d'un ancêtre commun) qui exclut le virus Nyando. Cependant ce groupe est fortement relié (valeur de bootstrap 97 %) aux trois sous-unités taxonomiques formées au bas du clade formé par les virus Ilesha 80P125, Ilesha 16282 et Mboke AY593727, nœud soutenu par un bootstrap de 100 %, M'Poko ArB365, NC_001927 et Bunyamwera ArB29051, nœud soutenu par un bootstrap de 96 %, et enfin, Ingwavuma AnB2633d, Birao ArB2198 et Nola ArB2882, nœud soutenu par un bootstrap 100 %.

La présence du virus Ingwavuma ArB2633d dans le Cluster I formé par les virus du séro groupe Bunyamwera est surprenante. Cette souche était classée à l'IPB et confirmée au CRORA par les méthodes sérologiques dans le séro groupe Simbu. Les caractéristiques moléculaires du segment S des virus Ingwavuma ArB2633d et Birao ArB2198 du séro groupe Bunyamwera démontrent une forte relation (valeur de bootstrap 100 %) et excluent le virus Nola ArB2882 (séro groupe Bakau). Le virus Ingwavuma ArB2633d isolé en RCA se trouve très éloigné des autres virus du groupe Simbu regroupés dans le cluster III. Cette remarque est valable pour les virus classés initialement dans les sérogroupe Turlock (M'Poko ArB365), Bakau (Nola ArB2882) et Nyando (Nyando ArB16055). Ceux-ci sont aussi fortement reliés aux virus du séro groupe Bunyamwera (valeur de bootstrap de 97 %).

Les deux autres clusters formés par les virus membres des sérogroupe California et Simbu sont également séparés avec un haut degré de confiance traduite par une valeur élevée de bootstrap (100 %) preuve de la solidité du phylogramme. La formation des clusters recoupe parfaitement le sérogroupe quelle que soit l'origine géographique des différentes souches. Cet arbre est donc monophylétique.

3.2 ANALYSE DU SEGMENT M

3.2.1 Séquençage

La séquence nucléotidique du segment M de la souche de référence Bunyamwera NC_001926, GenBank mesure 4458 bases. La détermination des séquences nucléotidiques du segment M des isolats de RCA a été réalisée sur le même principe que celui utilisé pour la détermination des séquences nucléotidiques du segment S. Le couple d'amorces M14C/M619R décrit par Bowen et *al.* (2001) a été utilisé en première intention et a permis d'obtenir un segment d'ADN ayant la taille attendue de 600 à 700 pb (Figure n° 25).

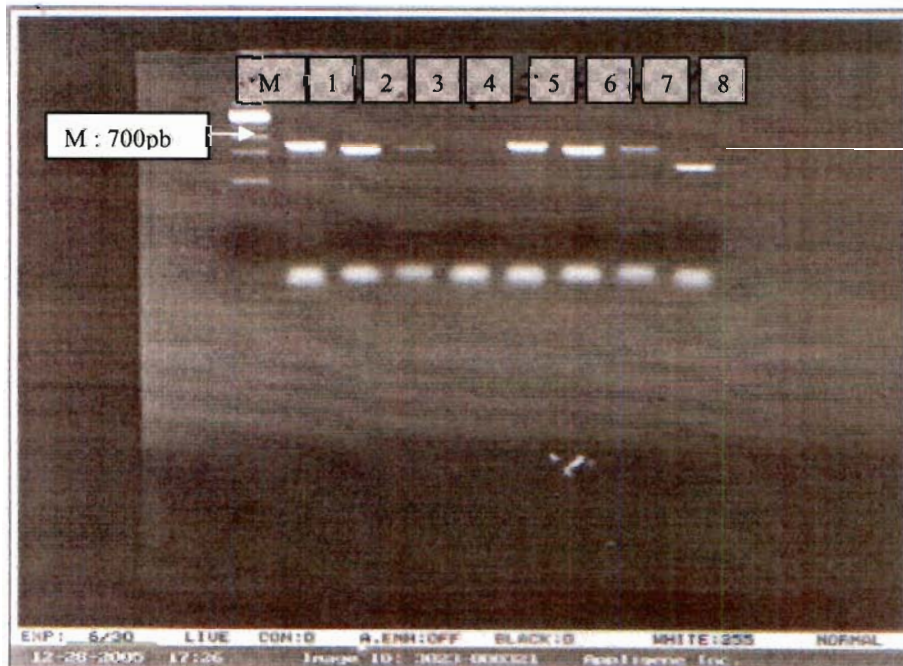


Figure n° 25 : électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de produits d'amplification du segment M des souches de RCA.

(M) : marqueur de poids moléculaire ; (1 à 4) : Bunyamwera ArB29051 [1: M14C/M619R, 2: M1/M619R, 3: M3/M4, 4: M6/M2] ; (5 à 8) : Bunyamwera ArB28215 [5: M14C/M619R, 6: M1/M619R, 7: M3/M4, 8: M6/M2]

Un amplicon d'environ 500 pb visible sur gel d'agarose a également été obtenu avec la souche Pongola ArB28851, alors qu'au niveau du segment S l'ARN de cette souche n'a pu être amplifiée. Le séquençage a été réalisé avec les couples d'amorces spécifiques du segment M définis au cours de cette étude (M1/M619R ; M3/M4 ; M5/M2 ; M6/M2). Des séquences nucléotidiques d'environ 300 à 600 pb ont été obtenues avec chaque couple d'amorces. Il a ainsi été possible de déterminer les séquences d'acides aminés d'une partie de la protéine M. Ce travail n'a cependant pas encore fait l'objet d'une publication.

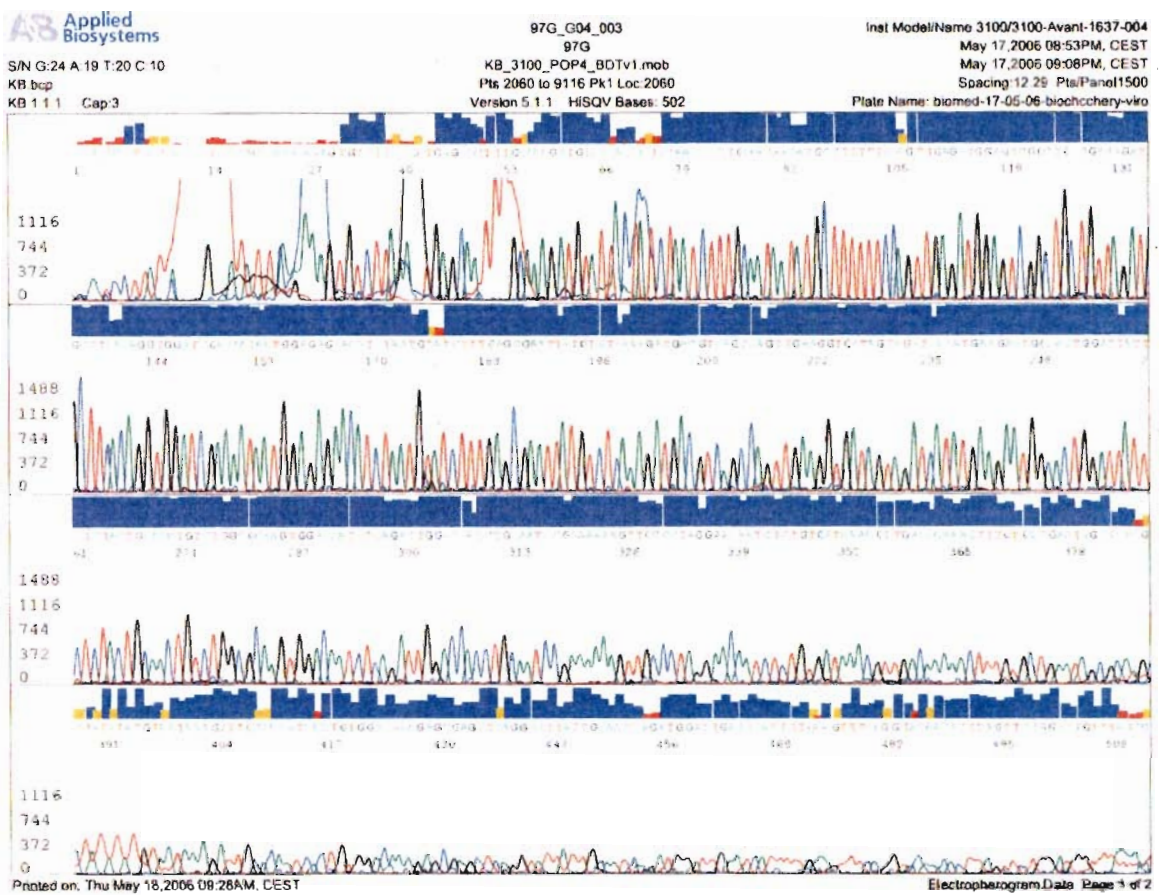
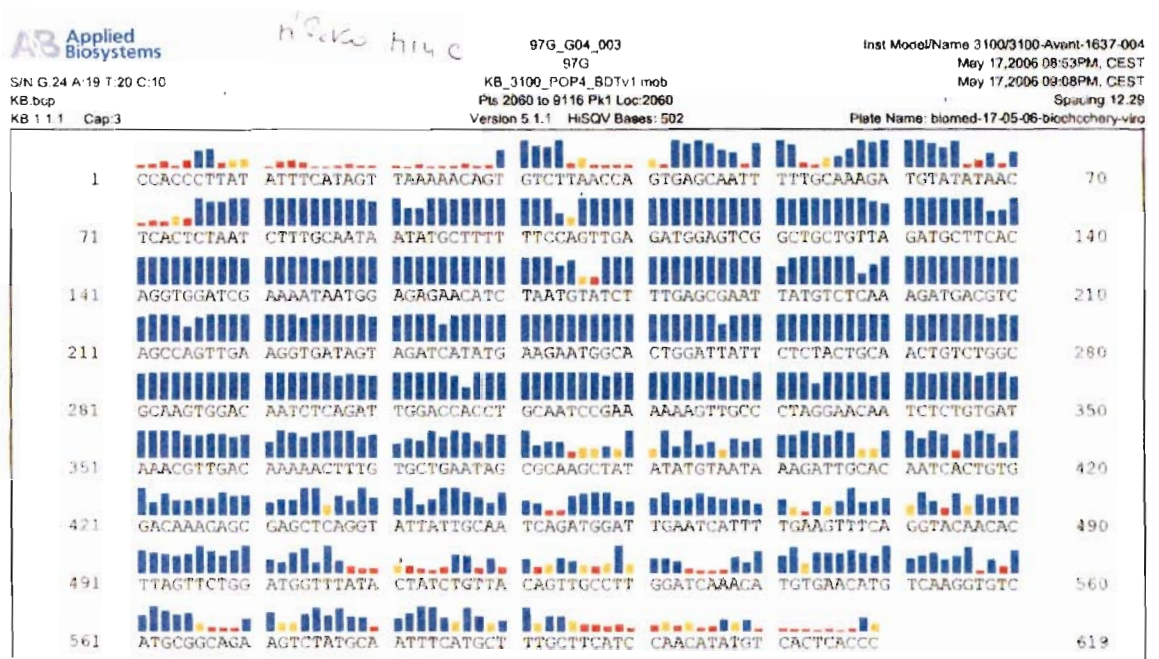


Figure 26 A : Séquence sens (amorce M14C) et chromatogramme de la souche M'Poko ArB365.

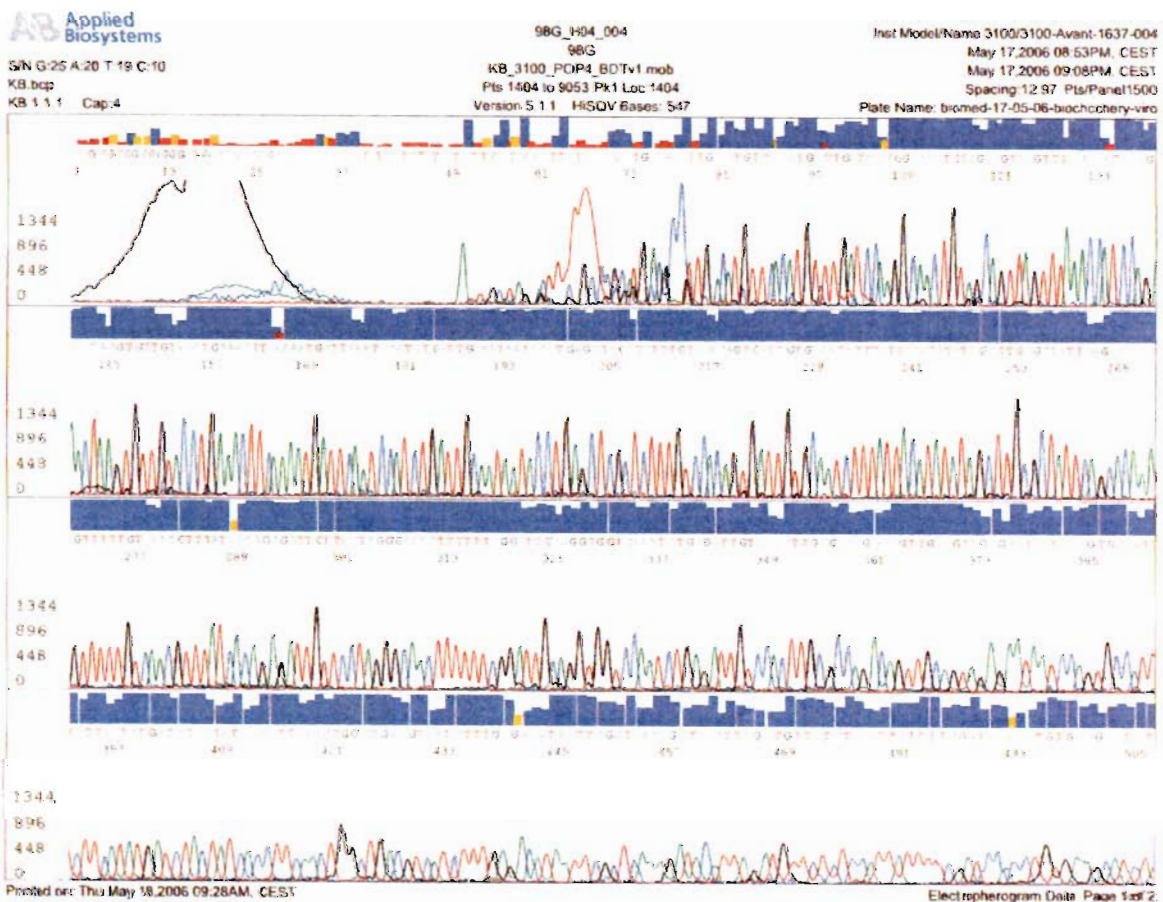
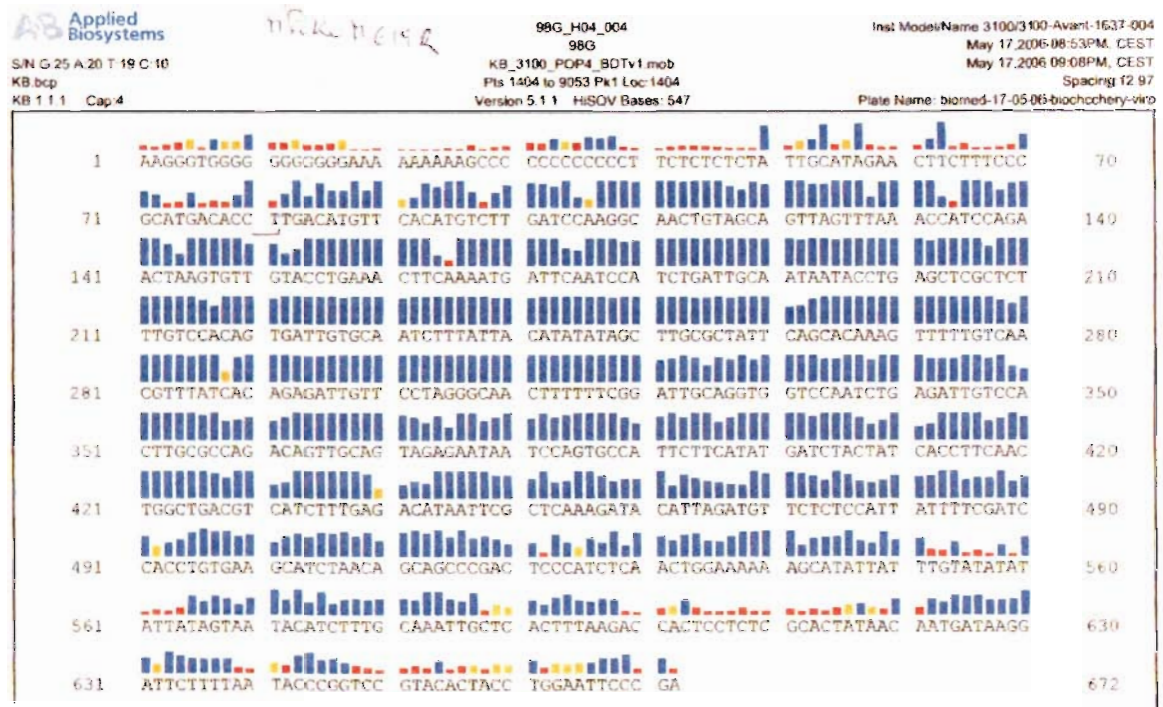


Figure 26 B : séquence antisens (amorce M619R) et chromatogramme de la souche M'Poko.

Les séquences nucléotidiques obtenues à l'aide des amorces sens et antisens ont été alignées (Fig. n° 27).

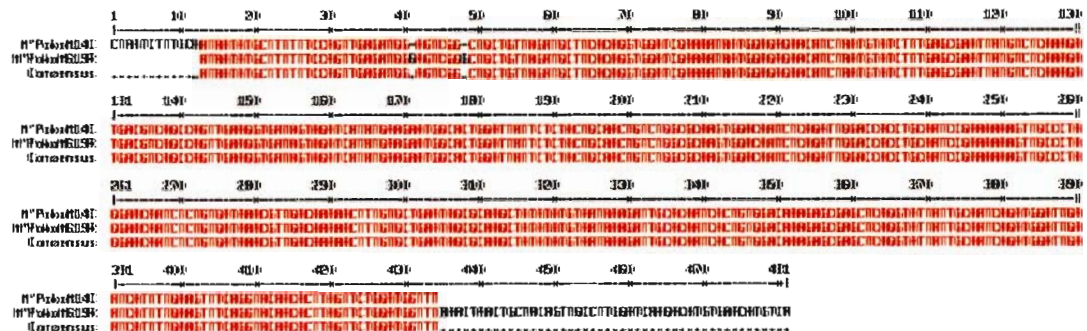


Figure n° 27 : Comparaison sur MultAlin de séquences nucléotidiques de la souche M'Poko ArB365, après inversion de la séquence antisens. M'PokoM14C : séquence sens, M'PokoM619R séquence antisens inversée.

La combinaison des séquences obtenues a permis d'obtenir la séquence nucléotidique complète du gène de la glycoprotéine Gn et une séquence nucléotidique partielle de la protéine non structurale (NSm) des souches ArB28215 Bunyamwera, ArB29051 Bunyamwera, ArB2198 Birao, ArB13529 Bozo, ArB2882 Nola, ArB16282 Ilesha, HB80P125 Ilesha, ArB2633d Ingwavuma et ArB16055 Nyando. Une séquence nucléotidique partielle du gène de la protéine Gc située entre les bases 1431 à 4358 a également été obtenue pour huit d'entre elles (Tableau XIII).

Tableau XIII : Longueur des séquences nucléotidiques obtenues du segment M des souches de RCA et de la souche de référence.

Sérogroupe	Virus	Total	5'NCR	3'NCR	Protéine Gn		Protéine NSm		Protéine Gc	
					Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin
	Bunyamwera NC_001927	4458	56	103	57	1037	1038	1430	1431	4358
	Bunyamwera ArB28215	4461	56		57	815	816	925	1410	1688
	Bunyamwera ArB29051	1247	56		57	554	623	670	NS	NS
	Birao ArB2198	4012	56		57	638	NS	NS	2233	2602
									2735	2952
Bunyamwera	Bozo ArB13529	2248	56		57	698	NS	NS	NS	NS
	Ilesha ArB16282	3724	56		57	740	860	943	NS	NS
	Ilesha HB80P125	2512	56		57	722	NS	NS	1554	2126
Bakau	Nola ArB2882	2719	56		57	634	1199	1289	1798	1891
									2021	2042
Turlock	M'Poko ArB365	2075	85		86	631	NS	NS	1457	1616
Simbu	Ingwavuma ArB2633d	2536	203		204	641	906	1176	1935	2266
Nyando	Nyando ArB16055	2147	56		57	701	NS	NS	1457	1616
Bwamba	Pongola ArB28851	}			Non séquencés					
Tete	Batama AnB1292									

Seule une séquence nucléotidique partielle de la protéine Gn de M'Poko, longue de 546 bases s'étendant des nucléotides 86 à 631 a été obtenue à l'aide du couple d'amorces M14C/M619R. Par ailleurs, les couples d'amorces définis au cours de cette étude n'ont permis d'obtenir qu'une séquence nucléotidique partielle du gène de la protéine Gc correspondant à 159 bases (nt 1457 à 1616). En outre, une séquence nucléique d'environ 480 bases a été obtenue pour la souche ArB28851 Pongola dont le segment S n'a pu être amplifié. Cependant, la traduction en acides aminés de la séquence nucléotidique de la souche Pongola ArB28851 a révélé qu'elle ne correspondait à aucune protéine structurale ou non structurale connue. Par contre, l'ARN du segment M de la souche Batama AnB1292, n'a pu être amplifié avec aucun des couples d'amorces testés.

3.2.2 Caractéristiques des segments M

Le gène codant la polyprotéine du segment M de la souche de référence NC_001926 débute à l'extrémité 5' par le gène Gn (nt 57 à 1037) suivi de la protéine NSm (nt 1038 à 1430) et fini par le gène Gc (nt 1431 à 4358, Tableau XIV). Puisque la séquence nucléotidique complète de segment M de souches étudiées n'a pas été obtenue, seules les 1040 premières bases en 5' ont été considérées pour l'analyse phylogénétique.

Tableau XIV : Caractéristiques des séquences nucléotidiques du gène Gn du segment M des souches isolées en RCA.

Sérogroupe	Virus	Séquence nucléotidique				Séquence AA
		Longueur (% identité/Prototype)				Gn
		Total	5'NCR	3'NCR	Gn	
Bunyamwera	Bunyamwera NC_001927	4458	56	103	57 à 1037 = 961	328
	Bunyamwera ArB28215	4461	56		57 à 815 = 759 (91.6%)	253 (88.4%)
	Bunyamwera ArB29051	1247	56		57 à 554 = 498 (95.8%)	166 (96.4%)
	Birao ArB2198	4012	56		57 à 638 = 582 (96.7%)	194 (96.9%)
	Bozo ArB13529	2248	56		57 à 698 = 642 (96.7%)	214 (96.7%)
	Ilesha ArB16282	3724	56		57 à 740 = 684 (97.7%)	228 (96.5%)
	Ilesha HB80P125	2512	56		57 à 722 = 666 (95.5%)	222 (92.3%)
Bakau	Nola ArB2882	2719	56		57 à 634 = 578 (95.6%)	146 (91.9%)
Turlock	M'Poko ArB365	2075	85		86 à 631 = 546 (60.4%)	183 (58.1%)
Simbu	Ingwavuma ArB2633d	2536	203		204 à 641 = 438 (90.0%)	146 (91.9%)
Nyando	Nyando ArB16055	2147	56		57 à 701 = 645 (88.3%)	215 (87.7%)
Bwamba	Pongola ArB28851	}			Non séquencées	
Tete	Batama AnB1292					

RNC : régions non codantes.

3.2.3 Gène Gn

Les séquences nucléotidiques des souches d'*Orthobunyavirus* de RCA présentent une différence de 3,3 % à 42,2 % par rapport à la souche de référence (Tableau XV). Comme pour le segment S, la séquence nucléotidique de la souche ArB365 M'Poko est la plus divergente (42,2 % de différence). La séquence nucléotidique du gène Gn de la souche ArB2882 Nola débute par le nucléotide 57 en 5' et celle de la souche ArB2633d Ingwavuma le nucléotide 204 en 5'. Les séquences nucléotidiques de ces deux souches montrent une divergence de 15 %, mais les séquences correspondantes d'acides aminés sont identiques. Il en est de même pour les souches ArB28215 Bunyamwera et ArB29051 Bunyamwera.

Tableau XV : Comparaison des séquences nucléotidiques (moitié supérieure du tableau) et d'acides aminés (moitié inférieure du tableau) du gène Gn des différentes souches étudiées.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	10
	NC_001926	Bunyamwera ArB28215	Bunyamwera ArB29051	Birao ArB2198	Bozo ArB13259	Nola ArB2882	Ilesha HB80P125	Ilesha ArB16282	Nyando ArB16055	Ingwavuma ArB2633d	M'Poko ArB365
NC_001926		88.1	93.9	95.6	96.1	93.1	93.7	96.7	86.2	84.9	57.8
ArB28215	88.1		99.6	93.3	92.2	96.4	91.1	92.4	86.4	84.5	58.1
ArB29051	96.4	100.0		95.7	94.5	99.0	96.6	95.6	97.8	87.8	57.5
ArB2198	96.4	95.3	97.6		95.3	92.9	95.9	94.9	89.4	85.0	59.0
ArB13259	96.7	92.9	96.4	96.4		93.3	93.9	94.3	85.9	85.4	58.7
ArB2882	88.0	89.4	94.0	88.1	88.0		94.2	94.4	91.2	85.0	58.4
HB80P125	92.4	89.2	97.0	95.9	93.8	88.8		94.4	86.4	85.0	58.7
ArB16282	96.1	91.3	95.8	94.9	95.2	88.7	91.9		86.9	85.1	57.9
ArB16055	86.6	84.3	97.6	91.8	86.1	88.1	85.1	83.0		80.0	56.9
ArB2633d	88.0	89.4	94.0	88.1	88.0	100.0	88.8	88.7	88.1		59.9
ArB365	52.7	54.3	53.8	53.2	53.7	59.9	53.2	53.2	53.3	64.5	

Les séquences nucléotidiques du segment M des souches sont proches de celle de la souche de référence sauf celle qui concerne la souche M'Poko (Figure n° 28). Pour les autres souches, la plupart de substitutions d'acides aminés observés sur ce dernier alignement sont conservatives.

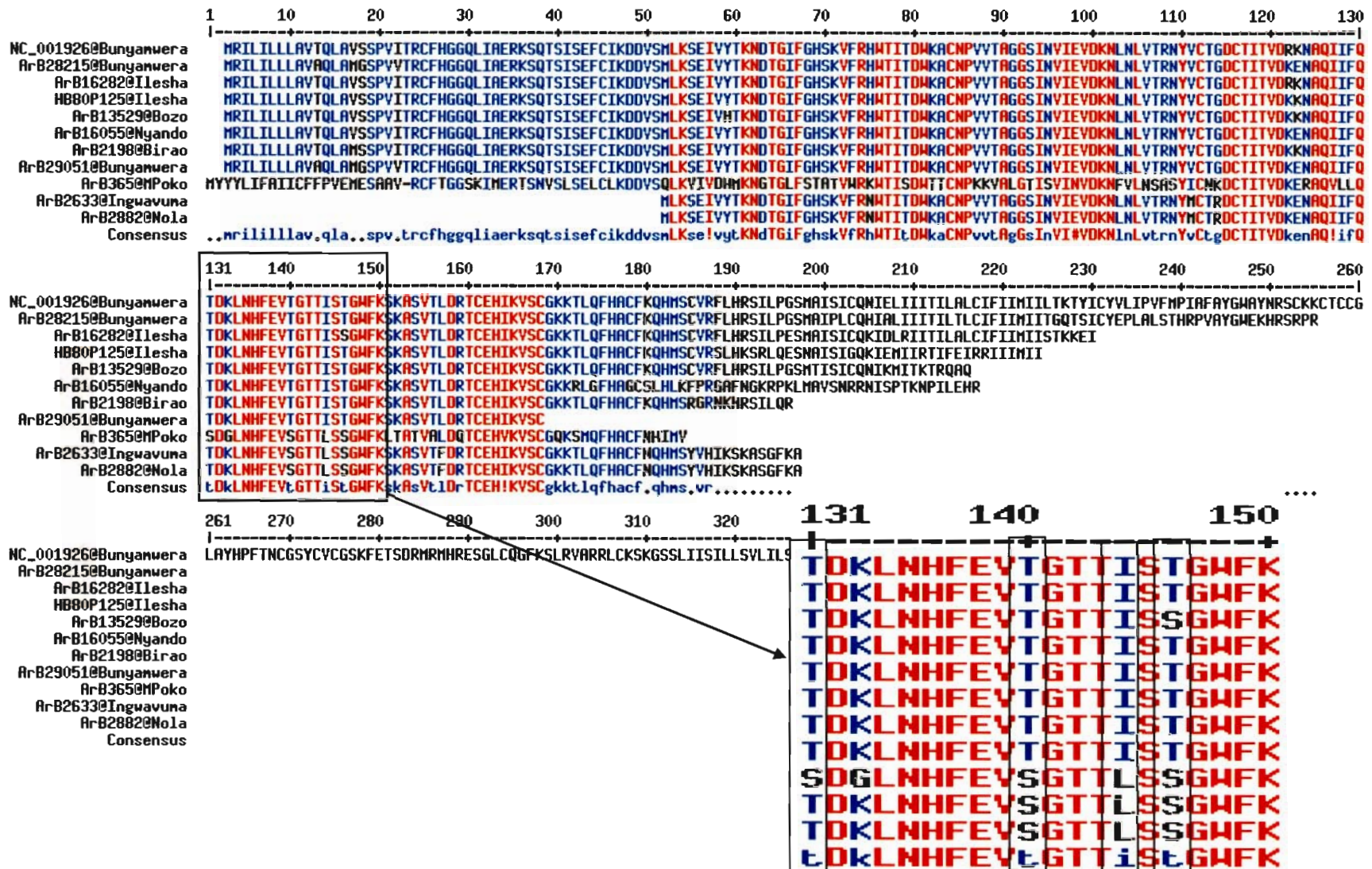


Figure n° 28 : Alignement des séquences du gène Gn des souches de RCA et celle de la souche de référence NC_001926, GenBank. Exemple de substitutions conservatives la sérine et la thréonine (codons 131, 140, 144, 146).

3.2.4 Analyse phylogénétique du segment M

Sur l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de souches d'*Orthobunyavirus* disponibles, trois groupes sont individualisés (figure n° 29) :

- (i) sérogroupe Bunyamwera ou cluster I,
- (ii) sérogroupe Simbu ou cluster II,
- (iii) sérogroupe California ou cluster III.

Toutes les souches de RCA sont regroupées dans le cluster I contenant la souche de référence NC_001926 avec un haut degré de confiance (valeur de *bootstrap* 100 %). La souche M'Poko quant à elle, se trouve fortement rattachée (valeur de *bootstrap* 100 %) au sérogroupe California. Cependant, tout en étant solidement liée au cluster III (sérogroupe California), elle se détache et forme une branche distincte à la base de celui-ci.

Les virus Oropouche NC_005775 et Guaroa AY380581, appartenant au sérogroupe Simbu (cluster II) ont été rattachés au virus Bozo AY593739 et Germiston M21951 du sérogroupe Bunyamwera. Le rattachement du cluster II (sérogroupe Simbu) au cluster I (sérogroupe Bunyamwera) est un artéfact de construction de l'arbre dû à la longueur de la branche ainsi qu'à la grande divergence de la souche M'Poko ArB365. Cet artéfact rend l'arbre phylogénétique non monophylétique puisque le cluster I, qui regroupe les virus du sérogroupe Bunyamwera, inclut le cluster II formé par les virus du sérogroupe Simbu (Figure n° 29). L'élimination de la séquence de M'Poko restitue la monophylie des trois clusters (Figure n° 30) et est comparable à celui qui a été déterminé pour le segment S (page 77).

Le virus Ingwavuma ArB2633d (séro groupe Simbu) se détache du sous-groupe des virus isolés en RCA (Ia). Toutefois, ce virus reste éloigné du cluster II qui regroupe les virus du séro groupe Simbu. Les autres virus membres du séro groupe Bunyamwera isolés en Afrique et en Amérique forment le sous groupe (Ib, Figure 29). Le regroupement des virus ArB2633d Ingwavuma, ArB16055 Nyando et ArB2882 Nola isolés en RCA dans le séro groupe Bunyamwera confirme les résultats obtenus avec le segment S. Ceci renforce l'hypothèse d'une erreur de classification par les méthodes sérologiques. Des études complémentaires sont indispensables pour clarifier ce point, notamment le séquençage complet du segment M. Les virus du séro groupe California forment un cluster bien individualisé (cluster III). Il convient de noter que les deux arbres phylogénétiques construits à l'aide des séquences nucléotidiques de la protéine N (Fig. n° 24) et Gn (Fig. n° 29) ne sont pas congruents du fait de l'absence de monophylie de l'arbre construit avec la séquence du gène Gn.

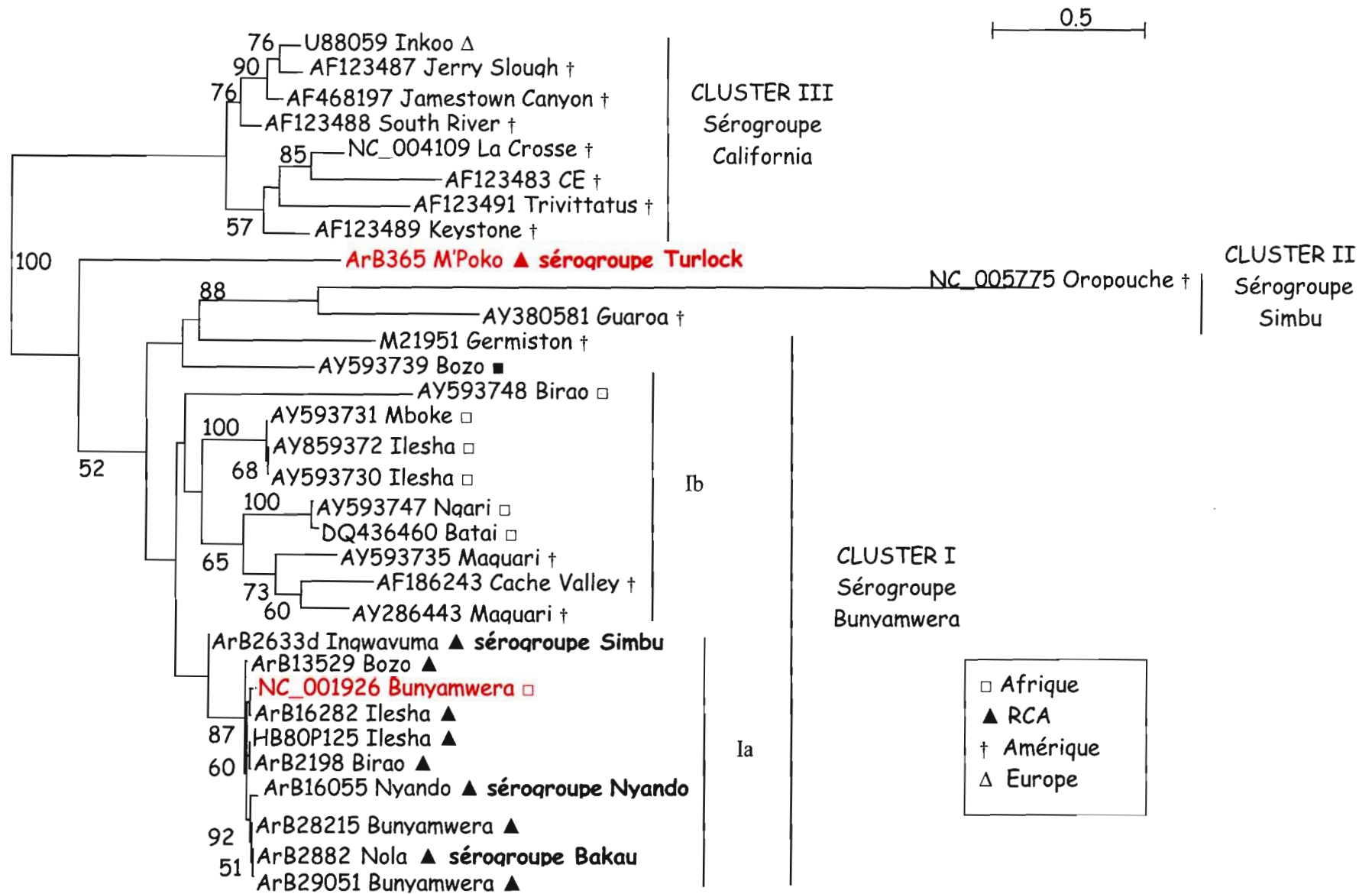


Figure n° 29 : Arbre phylogénétique non enraciné de séquences du gène Gn du segment M. Valeur de *bootstrap* > 50 % supprimées.

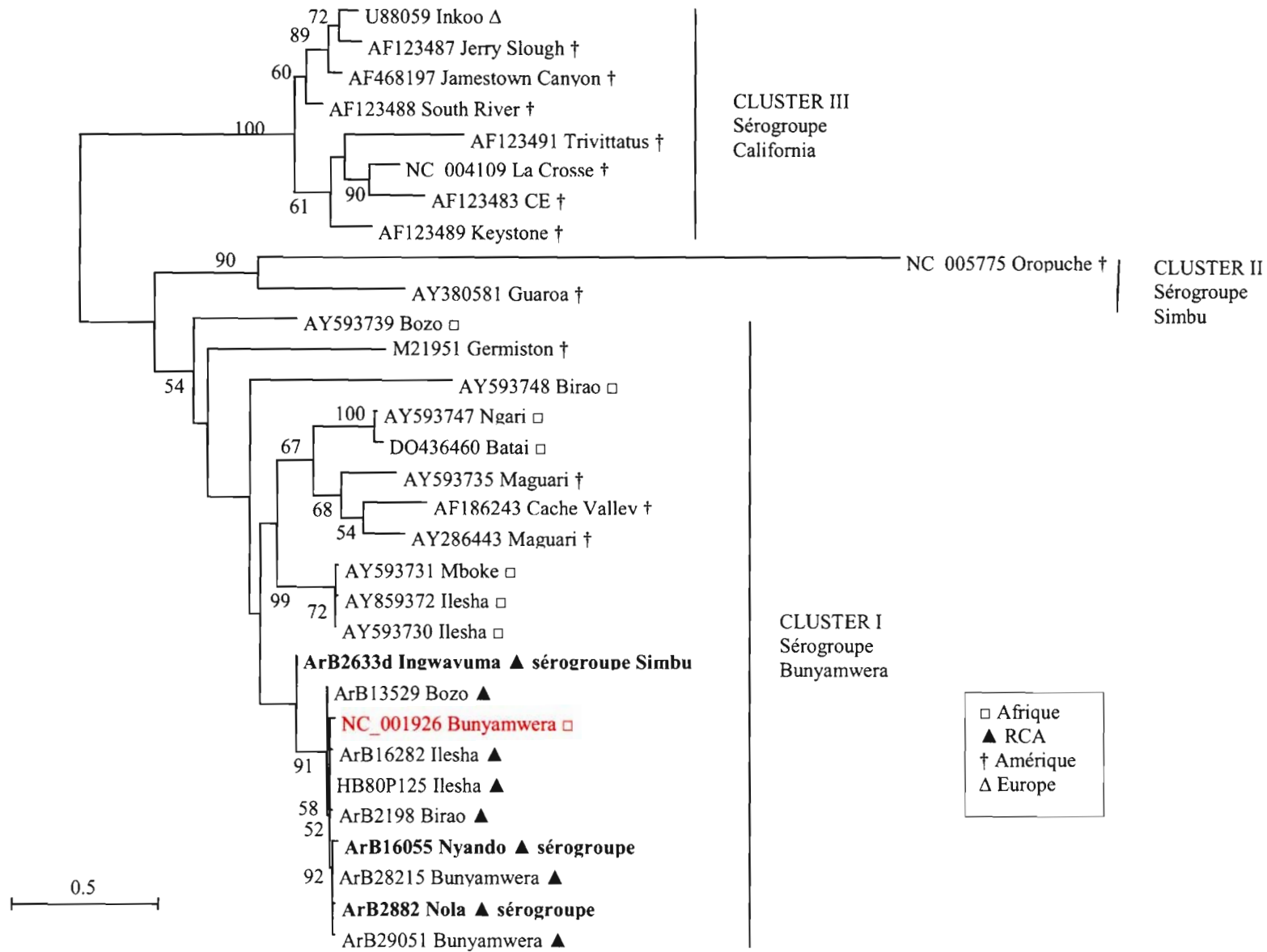


Figure n° 30 : Arbre phylogénétique non enraciné de séquences du gène Gn sans la séquence de M’Poko. Valeurs de *bootstrap* > 50 % supprimées. Sans la séquence de M’Poko, l’arbre est monophylétique et congruent avec celui des séquences de la protéine N.

3.3 APPLICATIONS BIBLIOMETRIQUES

L'analyse bibliométrique, une nécessité de l'ère post-génomique, se définit comme l'extraction automatique de données de la littérature biomédicale. Elle permet l'exploitation statistique des publications, descripteurs, images Cette analyse permet de rendre compte de l'activité des producteurs (chercheur, laboratoire, institut...) ou des diffuseurs (périodique, éditeur...) de l'information scientifique, tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Les publications, pour une grande part, sont référencées dans des bases de données bibliographiques, aujourd'hui **informatisées**, ce qui permet des **recherches rapides**, selon des **critères multiples**, sur **d'importants volumes** de références.

Un outil, appelée **DILIB**[®] pour *Documentation Information LIBrary* et fruit d'une coopération entre INIST (Institut de l'Information Scientifique et Technique) et le LORIA (Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications) permet l'analyse bibliométrique automatique en connectant les bases de données disponibles sur Internet et la création de serveurs d'investigation. DILIB représente un ensemble de logiciels en langage C, qui permet la récupération et la conversion de documents au format XML. Il autorise (i) la génération des index et l'analyse statistique des associations et des clusters de descripteurs, (ii) l'élaboration de serveurs pour la navigation hypertexte et (iii), *in fine*, la génération d'une bibliothèque électronique.

Les bases interrogées sont *Medline*, *Genbank*, *Gene Ontology*, *KEGG* ou autres. Durant cette étude, un serveur « *BIBLIO GENE Bibliographic Mining in Genomics* » a été développé et amélioré par nous-même sous l'égide d'Alain Zasadzinski (INIST) et du Pr. Bertrand Rihn (UHP). Cette base de donnée permet la recherche multivariée

d'informations sur les *Bunyaviridae*. Les références qui y sont regroupées sont sélectionnées selon des critères variables, en fonction des buts visés et des publics auxquels elles sont destinées. Ainsi les 1269 notices *Medline* au 7 janvier 2006, les 1769 notices de *Genbank* et les 710 notices *Swissprot* concernant tous les Bunyavirus décrits dans ces 3 bases de données ont été rassemblées dans ce serveur à l'adresse URL (<http://veille-srv.inist.fr/%7Egenomique/bunyavirus/Server/EN.Bunyavirus.index.html>). Outre les termes du MeSH (*Medical Subject Headings*), les titres, les résumés, les *Registry Numbers* (RN), comme les numéros CAS des produits chimiques et E.C. des enzymes peuvent être accessibles et recherchés dans la littérature sur les *Bunyaviridae*. Par exemple l'utilisation de ribavirine peut être recherchée en même temps que la séquence de la souche de Bunyavirus sur laquelle elle a été testée... Mais d'autres champs peuvent être utilisés avec profit : *Organisms, Diseases, Biochemicals and Drugs, Biological Phenomena*. Ceci permet par exemple de déterminer si une souche de Bunyavirus a été impliquée dans un phénomène d'apoptose touchant des cellules Vero. En quelque sorte l'information est mise en forme pour une meilleure accessibilité pour le chercheur qui peut se poser tout problème biologique et voir si une réponse a déjà été apportée ou si le concept débouche sur un champ de recherche vierge. La Figure 1 montre la page de garde et tous les champs de *Medline, Genbank* et *Swissprot* relevant de l'étude des Bunyavirus. La Figure 2 montre les fréquences des références concernant les « phénomènes génétiques et les entités » où il est loisible de constater qu'il existe 12 publications traitant des régions non transcrites des Bunyavirus. En cliquant sur ces références, il est même possible de connaître directement (avec le lien GenBank automatique) les séquences de ces régions.

Finalemment le concept de **bibliomique** (Rihn et al., 2003) a été appliqué aux *Bunyaviridae*, ce qui correspond à :




- une analyse d'un grand nombre de documents,
- un classement et la comparaison de corpus de descripteurs,
- la mise en relations entre les descripteurs pour aboutir à des concepts,
- l'apport d'une plus-value biologique et l'orientation de la recherche qui devrait en être facilitée dans le domaine des *Bunyaviridae*...

Bunyavirus - Mozilla Firefox

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

file:///G:/buny/Bunyavirus.htm

Débuter avec Firefox À la une


CNRS CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 
BIBLIO GENE Bibliographic Mining in Genomics
 
inist Institut de l'Information Scientifique et Technique

Bunyavirus

Number of documents: 1269

Authors

Bibliometric Index	Desc.	Docs
Authors	2815	1260
Affiliation Countries	53	866
Publication Years	33	1269
Journals Names	232	1268
Journals Categories	53	1255
Editors Countries	33	1269
Publication Types	17	1269

Medline Keywords (with all Headings)	Desc.	Docs
Organisms AH	360	1253
Anatomy AH	198	474
Biological Phenomena and Physiology AH	141	336
Molecular Genetic Phenomena and Entities AH	213	679
Diseases AH	310	607
Proteins AH	322	676
Biochemicals, Chemicals and Drugs AH	423	329
Technicals and Equipments AH	339	885
Miscellaneous AH	376	575

Medline Keywords (with SubHeadings)	Desc.	Docs
Organisms SH	807	1253
Anatomy SH	249	474
Biological Phenomena and Physiology SH	102	336
Molecular Genetic Phenomena and Entities SH	261	679
Diseases SH	671	607
Proteins SH	430	676
Biochemical, Chemicals and Drugs SH	268	329
Technicals and Equipments SH	258	885
Miscellaneous SH	365	575

Additional Medline Informations	Desc.	Docs
MeSH SubHeadings	61	1252
CAS Numbers	108	157
EC Numbers	63	109

Linked Data	Desc.	Docs
GenBank Records	1769	292
GenBank Identifiers	1769	292
UniProt Records	125	34
UniProt Accession Numbers	125	34

Figure n°31 : Page d'accueil du serveur Bunyavirus.

virus/Molecular_Genetic_Phenomena_and_Entities/indexHead - Microsoft Internet Explorer

1 Affichage Favoris Outils ?

Rechercher Favoris Historique

3unya/indexHead.genomique.cgi?applis/veille/home/apache/users/genomique/bunyavirus/Server/EN.Bunyavirus.Molecular_Genetic_Phenomena_and_Entities.wsh

Bunyavirus

Bunyavirus

Molecular_Genetic_Phenomena_and_Entities

Browsing head

number of keywords 213

Summary

- [Most frequent keywords](#)
- [Selecting term by regular expression](#)

RNA, Untranslated	14
Genetic Vectors	14
Untranslated Regions	12
Templates, Genetic	12
Regulatory Elements, Transcriptional	12
Conserved Sequence	12
Promoter Regions (Genetics)	11
Evolution, Molecular	11
Codon	11
RNA Probes	10
Protein Structure, Secondary	10

Figure n° 32 : Phénomènes génétiques et entités du serveur Bunyavirus

3.4 DISCUSSION

Le génome des virus du genre *Orthobunyavirus* isolés en Centrafrique n'a jamais été étudié, et les données sur les *Orthobunyavirus* isolés en Afrique sont très parcellaires. Ce mémoire présente la première contribution à la caractérisation moléculaire des isolats de la RCA. Les souches isolées et lyophilisées au cours des années 1965 à 1994 ont facilement pu être remises en culture sur monocouche de cellules Vero E6 malgré le temps de conservation. Bien que la lyophilisation ne soit plus considérée comme classique, elle est donc un bon moyen de conservation en Afrique de souches virales enveloppées, donc fragiles.

Le séquençage a montré la variabilité des séquences nucléotidiques des segments S et M du génome des *Orthobunyavirus* isolés en RCA qui n'est pas surprenante pour des virus à ARN. La présence de régions conservées permet l'amplification des segments S et M de la majorité des souches étudiées qui appartiennent à la famille des *Bunyaviridae* et la plupart au séro groupe Bunyamwera. Les souches Ingwavuma ArB2633d (séro groupe Simbu), M'Poko ArB365 (séro groupe Turlock), Nola ArB2882 (séro groupe Bakau) et Nyando ArB16055 (séro groupe Nyando) sont apparentées mais distinctes des virus des séro groupes Bunyamwera et California, cependant elles ont été amplifiées par les amorces spécifiques des virus des deux séro groupes. Par contre, les deux souches Pongola ArB28851 et Batama AnB1292, qui n'ont pu être caractérisées au cours de cette étude méritent des études complémentaires pour préciser leur place dans la taxonomie. Ceci a son importance si on veut mener une étude des arbovirus circulant en RCA. Suite à une communication personnelle de Mr Kuno du Center of Disease Control, le génome de ces deux souches sera amplifié et étudié avec les amorces déterminées par Kuno *et al.*, (1996).

La détermination des séquences par la méthode de marche sur le génome a été privilégiée dans le but de transférer la technologie facilement réalisable dans les pays en voie de développement. Cette méthode évitant le clonage, a permis de déterminer la séquence complète du segment S et une séquence partielle du segment M (gène Gn) des souches étudiées. En effet, le plateau technique des laboratoires de nombreux pays d'Afrique, ne leur permet pas aujourd'hui d'envisager le développement des techniques de clonage, plus complexes et délicats à mettre en œuvre pour déterminer les génomes viraux.

Les méthodes de caractérisation sérologiques et génomiques mesurent des propriétés différentes, il est donc évident que les résultats de ces deux méthodes sont utilisables. Toutefois, il serait plus raisonnable de privilégier la méthode moléculaire dans la classification des virus afin de contourner le problème de réactions croisées fréquemment rencontrées dans les tests sérologiques qui rendent difficile la différenciation des virus d'un même genre. Si l'on s'en tient uniquement aux résultats obtenus de cette étude, nous pourrions émettre l'hypothèse que les virus Nola ArB2882, Ingwavuma ArB2633d et Nyando ArB16055 seraient probablement d'autres espèces de virus Bunyamwera classées par erreur dans les sérogroupes *Bakau*, *Simbu* et *Nyando* respectivement. Dans ce cas, la caractérisation moléculaire pourrait entraîner la révision de la classification de ces virus. A ce jour, aucune séquence nucléique de virus des sérogroupes *Turlock*, *Bakau* et *Nyando* ne sont disponibles dans les banques de données des génomes. Il a donc été impossible de réaliser une comparaison afin de déterminer les variabilités respectives des souches M'Poko, Nola et Nyando.

Les protéine NSs des souches de RCA débutent toutes par deux méthionines à l'exception de celle de la souche ArB2198 Birao qui elle, débute par une seule. Cette particularité (présence d'une seule méthionine au début de séquence de protéine NSs) est également retrouvée en début de séquence de la protéine NSs d'autres *Orthobunyavirus*

tels que Germiston M19420, Buttonwillow AF362398, Oropouche AY993912 et Tinaroo AB000819, isolés en Amérique et Asie. Parmi les souches étudiées, la souche M'Poko ArB365 était apparue plus divergente par son infectivité (100 % d'ECP en 24 heures) ainsi que la distance avec les autres virus (fort taux de substitution des acides aminés constituant ses différentes protéines). Seul le couple d'amorces M14C/M619R (Bowen *et al.* 2001) a permis d'obtenir une séquence partielle du gène Gn de M'Poko. Les amorces que nous avons définies dans notre travail n'ont permis d'obtenir qu'une séquence partielle de la glycoprotéine Gc de la souche M'Poko. Ce virus pourrait donc être un recombinant, probablement une recombinaison génétique entre deux souches virales ayant co-infecté le moustique vecteur dans lequel le virus M'Poko a été isolé (Bowen *et al.*, 2001). Notons que la plupart des substitutions d'acides aminés observé sur les séquences des protéines N, NSs et Gn du virus M'Poko sont des substitutions entre acides aminés de propriétés différentes, ce qui renforce la thèse d'une souche très éloignée des autres.

Compte tenu de la distance observée sur l'arbre phylogénétique entre la souche Ingwavuma ArB2633d isolée en RCA et des autres virus du séro groupe Simbu, la séquence de la protéine N du virus ArB2633d Ingwavuma avait été comparée à celle du virus An4165 Ingwavuma (AF362395, GenBank). Cette comparaison avait montré une différence de 42 % entre les séquences d'acides aminés des deux souches. Cette différence serait en faveur de l'hypothèse d'une probable erreur de classification. Des études complémentaires telles que, le séquençage complet du segment M de Ingwavuma ArB2633d, la reprise de la détermination des caractéristiques par les méthodes sérologiques, la détermination des relations structurales avec des propriétés physicochimiques particulières seront nécessaires pour élucider l'éloignement de la

souche Ingwavuma ArB2633d des autres virus du séro groupe Simbu qui forment un cluster bien distinct.

Au vu des séquences homologues, il devrait être possible de reconstruire les relations évolutives entre séquences, par conséquent entre les organismes qui les portent. Toutes les divergences observées entre les souches devraient se traduire au niveau d'un arbre phylogénétique. Nous avons remarqué dans l'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences nucléotidiques du gène Gn que M'Poko émergeait à la base du séro groupe California et rendait l'arbre non congruent avec celui obtenu avec les séquences nucléotidiques du segment S. L'éloignement de la souche M'Poko dans l'arbre pourrait être le produit d'un artefact de construction induit par l'attraction de la longue branche, mais aussi au nombre de substitutions par site, mesure de distance génétique.

Les deux souches Pongola ArB28851 et Batama AnB1292 (séro groupe Bwamba et Tete respectivement) n'ont pu être amplifiées avec les différents jeux d'amorces spécifiques des. Cela confirme la spécificité de ces amorces pour les séro groupes California et Bunyamwera, en particulier celles décrites par Bowen *et al.*, (2001). En l'absence d'amplification de l'ARN de ces deux souches par les différentes amorces, il est impossible de définir des amorces consensus pour le diagnostic d'un plus grand nombre d'*Orthobunyavirus* qui circulent en RCA.

3.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré toutes les limites de cette étude, nous avons obtenu pour la première fois de séquences nucléotidiques complètes du segment S des *Orthobunyavirus* isolés en RCA, en particulier celles de virus M'Poko, Nola, Bozo et Nyando. Pour cette raison, les séquences des souches étudiées ont été déposées sur « EMBL Nucleotide Sequence Database UK » et enregistrées sous le numéro d'accès : Bunyamwera ArB28215 # AM711130 ; Birao ArB2198 # AM711131 ; Bozo ArB13529 # AM711132 ; M'Poko ArB365 # AM711133 ; Nola ArB2882 # AM711134 ; Bunyamwera ArB29051 # AM709778 ; Ilesha HB80P125 # AM709779 ; Ilesha ArB16282 # AM709780 ; Nyando ArB16055 # AM709781 ; Ingwavuma ArB2633d # AM709782 ; Bunyamwera ArB29051 # AM709778 ; Ilesha HB80P125 # AM709779 ; Ilesha ArB16282 # AM709780 ; Nyando ArB16055 # AM709781 et Ingwavuma ArB2633d # AM709782.

Les résultats de l'analyse phylogénétique ont relevé une discordance entre la classification des virus par les méthodes sérologiques et moléculaires. Les souches Nola ArB2882, Nyando ArB16055, Ingwavuma ArB2633d et M'Poko ArB365, initialement classées par les méthodes sérologiques dans le sérogroupes Bakau, Nyando, Simbu et Turlock respectivement, sont regroupées dans un cluster avec les virus du séro groupe Bunyamwera solidement reliées. D'où, l'important de continuer la caractérisation moléculaire du génome des virus isolés en RCA. Cette caractérisation moléculaire devra s'étendre à toutes les souches d'*Orthobunyavirus* disponibles à l'Institut Pasteur de Bangui, ainsi qu'aux virus des genres *Phlebovirus* et *Nairovirus* régulièrement isolés dans le pays qui, sous l'action de la déforestation pourraient représenter un réel problème de santé publique les années à venir.

Les souches Pongola (ArB28851) et Batama (AnB1292) initialement classés dans les sérogroupes Bwamba et Tete respectivement (genre *Orthobunyavirus*), dont le génome n'a pu être amplifié au cours de cette étude seront traitées en priorité en utilisant les amorces spécifiques de virus appartenant au séro groupe Bwamba tel que défini par Kuno (1996). Dans le cas où aucun amplicon n'aurait été obtenu, ces souches seront testées avec les amorces spécifiques de virus des genres *Phlebovirus* et *Nairovirus* afin de rechercher d'éventuelles erreurs de classification. En dernier ressort, des amorces plus dégénérées définies à partir des séquences déjà obtenues, des amorces internes de différents virus de la famille des *Bunyaviridae* devraient alors permettre d'amplifier le segment S et classer ainsi ces deux virus.

Les séquences nucléotidiques complètes du segment S et partielles du segment M du génome de la souche M'Poko ArB365 sont très divergentes par rapport à celles des autres *Orthobunyavirus* isolées en RCA. Puisque le segment M porte les glycoprotéines de surface, site d'interaction entre le virus et l'hôte vertébrés, structure en général très variable, la détermination de la séquence nucléotidique complète de ce segment (protéines Gn complète, non structurale et Gc) permettrait de mieux définir la position du virus M'Poko dans l'arbre phylogénétique, car la divergence de cette souche a produit une incongruence des arbres phylogénétiques. La séquence complète du segment M nous permettra peut-être, soit de conclure à une espèce d'*Orthobunyavirus* très divergente, soit de décider s'il s'agit d'un virus recombinant. Il est notoire que la faune de forêt et savane de la RCA est régulièrement infectée par des arbovirus (E. Nakouné, cas de fièvres jaunes, résultats non publiés). Puisque les amorces nouvellement définies ont permis d'amplifier le génome de certaines espèces d'*Orthobunyavirus*, la recherche et la caractérisation du génome des *Orthobunyavirus* vont s'étendre à différents animaux afin d'identifier le réservoir de ces virus.

REFERENCES

- Abu-Elyazeed R, el-Sharkawy S, Olson J, Botros B, Soliman A, Salib A, Cummings C, Arthur R. (1996).** Prevalence of anti-Rift-Valley-fever IgM antibody in abattoir workers in the Nile delta during the 1993 outbreak in Egypt. *Bull World Health Org* **74** : 155–158.
- Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken THG. (1961).** Oropouche virus: A new human disease from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* **10** : 574–578.
- Baisley KJ, Watts DM, Munstermann LE, Wilson ML. (1998).** Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. *Am J Trop Med Hyg* **59** : 710-716.
- Bartelloni PJ, Tesh RB. (1976).** Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). *Am J Trop Med Hyg* **25** : 456–462.
- Beatty BJ, Miller BR, Shope RE, Rozhon EJ, Bishop DH. (1982).** Molecular basis of bunyavirus per os infection of mosquitoes: Role of the middle-sized RNA segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** : 1295–1297.
- Bernshtein AD, Apekina NS, Mikhailova TV, Myasnikov YA, Khlyap LA, Korotkov YS, Gavrilovskaya IN. (1999).** Dynamics of Puumala Hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol* **144** : 2415–2428.
- Bork P, Koonin EV. (1994).** A P-loop-like motif in a widespread ATP pyrophosphatase domain: implications for the evolution of sequence motifs and enzyme activity. *Proteins*, **20** : 347-55.
- Bowen, M. D., Trappier, S. G., Sanchez, A. J., Meyer, R. F., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Dunster, L. M., Peters, C. J., Ksiazek, T. G., Nichol, S. T. & the RVF Task Force (2001).** A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology* **291** : 185-90.

Brittlebank CC. (1919). A new tomato disease: Spotted wilt. *J Agricult Vict* **27** : 231–235.

Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. (1994). Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect* **113** : 551–562.

Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. (1998). The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *J Virol Meth* **70** : 129–137.

Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman PA, Greer PW, Coffield LM, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Zaki SR. (1997). Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* **121** : 839–846.

Calisher CH, Bailey RE. (1981). Serodiagnosis of La Crosse virus infections in humans. *J Clin Microbiol* **13** : 344–350.

Campbell GL, Reeves WC, Hardy JL, Eldridge BF. (1992). Seroepidemiology of California and Bunyamwera serogroup bunyavirus infections in humans in California [Review]. *Am J Epidemiol* **136** : 308–319.

Capstick PB, Gosden D. (1962). Neutralizing antibody response of sheep to pantropic and neurotropic Rift Valley fever virus. *Nature* **195** : 583–584.

Casals J. (1963). New developments in the classification of arthropod-borne animal viruses. *Ann Microbiol* **11** : 13–34.

Chambers PG, Swanepoel R. (1980). Rift valley fever in abattoir workers. *Cent Afr J Med* **26** : 122–126.

Charles JA. (1994). Akabane virus [Review]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **10** : 525–546.

Chen HX, Luo ZZ, Zhang JJ. (1999). Study on epidemiologic efficacy and immunologic strategy of vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome [Chinese]. *Chin Publ Health* **15** : 561–568.

Chumakov M. (1963). Study of viral haemorrhagic fevers. *J Hyg Epidemiol* **7** : 125–140.

Coackley W, Pini A, Gosden D. (1967). The immunity induced in cattle and sheep by inoculation of neurotropic or pantropic Rift Valley fever viruses. *Res Vet Sci.* **8** : 406-14

Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. (1931). Enzootic hepatitis or Rift Valley fever: An undescribed virus disease of sheep cattle and man from East Africa. *J Path Bact* **34** : 545–579.

Deibel R, Srihongse S, Grayson MA, Grimstad PR, Mahdy MS, Artsob H, Calisher CH. (1983). Jamestown Canyon virus: The etiologic agent of an emerging human disease? *Prog Clin Biol Res* **123** : 313–325.

Dixon KE, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Llewellyn CH. (1981). Oropouche virus. II. Epidemiological observations during an epidemic in Santarem, Para, Brazil in 1975. *Am J Trop Med Hyg* **30** : 161–164.

Duchin JS, Koster FT, Peters CJ, Simpson GL, Tempest B, Zaki SR, Ksiazek TG, Rollin PE, Nichol S, Umland ET, et al. (1994). Hantavirus pulmonary syndrome: A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. The Hantavirus Study Group [see Comments]. *N Engl J Med* **330** : 949–955.

Dunn, E.F., Pritlove, D.C., & Elliott, R.M. (1994). The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway bunyaviruses: sequence determination and analysis. *JGV* **75** : 597-608.

Dykers TI, Brown KL, Gundersen CB, Beaty BJ. (1985). Rapid diagnosis of LaCrosse encephalitis: Detection of specific immunoglobulin M in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **22** : 740–744.

Edwards JF, Livingston CW, Chung SI, Collisson EC. (1989). Ovine arthrogryposis and central nervous system malformations associated with in utero Cache Valley virus infection: Spontaneous disease. *Vet Pathol* **26** : 33–39.

Eitrem R, Stylianou M, Niklasson B. (1991). High prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples, and Toscana) among Cypriots. *Epidemiol Infect* **107** : 685–691.

Elliott R.M. (1989). Nucleotide sequence analysis of the S RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *JGV* **70** : 1281-1285.

Elliott R.M. (1990). Molecular biology of Bunyaviridae. *JGV* **71**, 501-522.

Fenner R. (1975). The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **6** : 1–12.

Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, et al. (1995). Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet* **346** : 472–475.

Gavrilovskaya IN, Apekina NS, Bernshtein AD, et al. (1990). Pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome virus infection and mode of horizontal transmission of hantavirus in bank voles. *Arch Virol [Suppl 1]* : 57–62.

Glass GE, Johnson JS, Hodenbach GA, Disalvo CL, Peters CJ, Childs JE, Mills JN. (1997). Experimental evaluation of rodent exclusion methods to reduce hantavirus transmission to humans in rural housing. *Am J Trop Med Hyg* **56** : 359–364.

Gonzalez JP, Georges A-J. (1988). Bunyaviral fevers: Bunyamwera, Ilesha, Germiston, Bwamba, and Tataguine. In: Monath TP, ed. *The arboviruses: Epidemiology and ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 87–98.

Goverdhan MK, Dhanda V, Modi GB, Bhatt PN, Bhagwat RB, Dandawate CN, Pavri KM. (1976). Isolation of phlebotomus (sandfly) fever virus from sandflies and humans during the same season in Aurangabad District, Maharashtra State, India. *Indian J Med Res* **64** : 57–63.

Grimstad PR, Artsob H, Karabatsos N, Calisher CH. (1987). Production and use of a hemagglutinin for detecting antibody to Jamestown Canyon virus. *J Clin Microbiol* **25** : 1557–1559.

Guindon S. & Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Bio* **52** : 696-704.

Hammon WM, Reeves WC. (1952). California encephalitis virus, a newly described agent. I. Evidence of natural infection in man and other animals. *Calif Med* **77** : 303–309.

Hardy JL, Eldridge BF, Reeves WC, Schutz SJ, Presser SB. (1993). Isolations of Jamestown canyon virus (Bunyaviridae: California serogroup) from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the western United States, 1990– 1992. *J Med Entomol* **30** : 1053–1059.

Hoogstraal H. (1979). The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa [Review]. *J Med Entomol* **15** : 307–417.

Hooper JW, Li D. (2000). Vaccines against hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **256** : 171–191.

Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN, et al. (1991). Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* **164** : 1119–1127.

Huggins JW, Kim GR, Brand OM, McKee KT Jr. (1986). Ribavirin therapy for hantaan virus infection in suckling mice. *J Infect Dis* **153** : 489–497.

Inaba Y, Kurogi H, Omori T. (1975). Akabane disease: Epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis-hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus [Letter]. *Aust Vet J* **51** : 584–585.

Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST. (1997). Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* **238** : 115–127.

Johnson RT. (1983). Pathogenesis of La Crosse virus in mice. *Prog Clin Biol Res* **123** : 139–144.

Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG, Wasef S, Haddad YM, Sadek R, Ijaz K, Peters CJ, Ksiazek TG. (1997). An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994–1995. *Am J Trop Med Hyg* **57** : 519–525.

Kokernot RH, Heymann CS, Muspratt J, Wolstenholme B. (1957). Studies on arthropod-borne viruses of Tongaland. V. Isolation of Bunyamwera and Rift Valley fever viruses from mosquitos. *South Afr J Med Sci* **22** : 71–80.

Kormelink R, Storms M, Van Lent J, Peters D, Goldbach R. (1994). Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200** : 56–65.

Kuno G, Mitchell CJ, Chang GJ, Smith GC. (1996). Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J Clin Microbiol* **34** : 1184–1188.

LeDuc JW. (1987). Epidemiology of hantaan and related viruses. *Lab Anim Sci* **37** : 413–418.

Lee HW. (1989). Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Infect Dis* **11** : S864–S876.

Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. (1982). Isolation of hantaan virus, the etiologic agent of korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis* **146** : 638–644.

Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL. (1985). Rift valley fever virus (family Bunyaviridae, genus phlebovirus): Isolations from diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg* **95** : 197–209.

Lopez N, Padula P, Rossi C, Lazaro ME, Franze-Fernandez MT. (1996). Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology* **220** : 223–226.

Martin ML, Lindsey-Regnery H, Sasso DR, McCormick JB, Palmer E. (1985). Distinction between Bunyaviridae genera by surface structure and comparison with Hantaan virus using negative stain electron microscopy. *Arch Virol* **86** : 17–28.

Mathews REF. (1982). Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **17** : 1–200.

McConnell S, Livingston C Jr, Calisher CH, Crandell RA. (1987). Isolations of Cache Valley virus in Texas, 1981. *Vet Microbiol* **13** : 11–18.

Mercer DR, Castillo-Pizango MJ. (2005). Changes in relative species compositions of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and an outbreak of Oropouche virus in Iquitos, Peru. *J Med Entomol*, **42** : 554–8

Montgomery RE. (1917). On a tick-borne gastro-enteritis of sheep and goats occurring in British East Africa. *J Comp Pathol Ther* **30** : 28–57.

Morvan J, Rollin PE, Laventure S, Rakotoarivony I, Roux J. (1992). Rift Valley fever epizootic in the central highlands of Madagascar. *Res Virol* **143** : 407–415.

Murphy FA, Harrison AK, Whitfield SG. (1973). Bunyaviridae: Morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology* **1** : 297–316.

Nichol ST. (1999). Genetic analysis of hantaviruses and their host relationships. In: Saluzzo J-F, Dodet B, eds. Factors in the emergence and control of rodent-borne viral diseases. Paris: Elsevier, 99–109.

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness [see Comments]. *Science* **262** : 914–917.

Obijeski JF, Murphy FA. (1977). Bunyaviridae: Recent biochemical developments. *J Gen Virol* **37** : 1–14.

Papa A, Johnson AM, Stockton PC, Bowen MD, Spiropoulou CF, Alexiou-Daniel S, Ksiazek TG, Nichol ST, Antoniadis A. (1998). Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *J Med Virol* **55** : 321–327.

Peters CJ, Anderson GW Jr. (1981). Pathogenesis of Rift Valley fever. *Contrib Epidemiol Biostat* **3** : 21–41.

Pinheiro FP, Hoch AL, Gomes ML, Roberts DR. (1997). Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *Am J Trop Med Hyg* **30** : 172-176.

Prins M, Goldbach R. (1998). The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control [Review]. *Trends Microbiol* **6** : 31–35.

Resende Rde O, de Haan P, van de Vossen E, de Avila AC, Goldbach R, Peters D. (1992). Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. *J Gen Virol* **73** : 2509–2516.

Rihn BH, Vidal S, Nemurat C, Vachenc S, Mohr S, Mazur F, Houdry P, Grandjean F, Visvikis S, Ducloy J. (2003). From transcriptomics to bibliomics. *Med Sci Monit* **9** : MT89-95.

Rodriguez LL, Maupin GO, Ksiazek TG, Rollin PE, Khan AS, Schwarz TF, Lofts RS, Smith JF, Noor AM, Peters CJ, Nichol ST. (1997). Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg* **57** : 512–518.

Rosa AP, Rodrigues SG, Nunes MR, Magalhaes MT, Rosa JF, Vasconcelos PF. (1996). Outbreak of oropouche virus fever in Serra Pelada, municipality of Curionopolis, Para, 1994. *Rev Soc Bras Med Trop* **29** : 537–541.

Rust RS, Thompson WH, Matthews CG, Beaty BJ, Chun RW. (1999). La Crosse and other forms of California encephalitis [Review]. *J Child Neurol* **14** : 1–14.

Sabin AB. (1951). Experimental studies on *Phlebotomus* (Pappataci, Sandfly) fever during World War II. *Arch Ges Virusforsch* **4** : 367–410.

Sabin AB. (1955). Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *Am J Trop Med Hyg* **4** : 198–207.

Samuel G, Bald JG, Pittman HA. (1930). Investigations on spotted wilt of tomatoes. In: Bulletin no. 44. Commonwealth of Australia: Council for Scientific and Industrial Research.

Schmaljohn C, Hjelle B. (1997). Hantaviruses: A global disease problem [Review]. *Emerg Infect Dis* **3** : 95–104.

Sexton DJ, Rollin PE, Breitschwerdt EB, Corey GR, Myers SA, Dumais MR, Bowen MD, Goldsmith CS, Zaki SR, Nichol ST, Peters CJ, Ksiazek TG. (1997). Life-threatening Cache Valley virus infection. *N Engl J Med* **336** : 547–549.

Seymour C, Amundson TE, Yuill TM, Bishop DH. (1983). Experimental infection of chipmunks and snowshoe hares with La Crosse and snowshoe hare viruses and four of their reassortants. *Am J Trop Med Hyg* **32** : 1147–1153.

Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. (1987). Field and laboratory investigation of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (Nairovirus, family Bunyaviridae) infection in birds. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **81** : 1004–1007.

Simpson DI, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbren MP, Kibukamusoke JW. (1967). Congo virus: A hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations—clinical notes. *East Afr Med J* **44** : 86–92.

Smadel JE. (1959). Hemorrhagic fever. In: Rivers TM, Horsfall FL Jr, eds. *Viral and rickettsial diseases of man*. Philadelphia: JB Lippincott, 400–404.

Smithburn KC, Haddock AJ, Mahaffy AF. (1946). A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am J Trop Med Hyg* **26** : 189–208.

Smithburn KC, Mahaffy AF, Haddock AJ, et al. (1949). Rift Valley fever: Accidental infections among laboratory workers. *J Immunol* **62** : 213–227.

Srihongse S, Grayson MA, Deibel R. (1984). California serogroup viruses in New York State: The role of subtypes in human infections. *Am J Trop Med* **33** : 1218–1227.

Stevens MR, Scott SJ, Gergerich RC. (1992). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* **59** : 9.

Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, et al. (1987). Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg* **36** : 120–132.

Swanepoel R. (1994). Crimean-Congo haemorrhagic fever. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, eds. *Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa*. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 723–729.

Taylor WP, Mellor PS. (1994). The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol Infect* **113** : 175–185.

Tesh RB. (1988). The genus Phlebovirus and its vectors. *Ann Rev Entomol* **33** : 169–181.

Tesh RB, Beaty BJ. (1983). Localization of California serogroup viruses in mosquitoes. *Prog Clin Biol Res* **123** : 67–75.

Thompson WH. (1983). Vector-virus relationships. *Prog Clin Biol Res* **123** : 57–66.

Thompson WH, Beaty BJ. (1978). Venereal transmission of La Crosse virus from male to female *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* **27** : 187–196.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. (2000). 7th Report of the International Committee on Viruses Taxonomy. Academic Press, London 2000 : 1162 pp. Description of virus taxa 63-75.

Watts DM, Pantuwatana S, DeFoliart GR, Yuill TM, Thompson WH. (1973). Transovarial transmission of LaCrosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*. *Science* **182** : 1140–1141.

Watts DM, Thompson WH, Yuill TM, DeFoliart GR, Hanson RP. (1974). Overwintering of La Crosse virus in *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* **23** : 694–700.

Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N, Mills JN, Peters CJ, Segura EL. (1997). An unusual hantavirus outbreak in southern argentina: Person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis* **3** : 171–174.

Wijkamp I, van Lent J, Kormelink R, Goldbach R, Peters D. (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* **74** [Pt 3] : 341–349.

Williams RJ, Al-Busaidy S, Mehta FR, Maupin GO, Wagoner KD, Al-Awaidy S, Suleiman AJ, Khan AS, Peters CJ, Ksiazek TG. (2000). Crimean-Congo haemorrhagic fever: A seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman. *Trop Med Int Health* **5** : 99–106.

Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, *et al.* (1997). An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* **57** : 274–282.

Wilson ML, Chapman LE, Hall DB, Dykstra EA, Ba K, Zeller HG, Traore-Lamizana M, Hervy JP, Linthicum KJ, Peters CJ. (1994). Rift Valley fever in rural northern senegal: Human risk factors and potential vectors. *Am J Trop Med Hyg* **50** : 663–675.

Woodall JP, Williams MC, Simpson DI. (1967). Congo virus: A hitherto undescribed virus occurring in Africa. II. Identification studies. *East Afr Med J* **44** : 93–98.

ANNEXES 1
PUBLICATIONS

Short Communication

Molecular characterization of African orthobunyaviruses

E. Nakouné Yandoko,^{1,2,3,4} S. Gribaldo,⁵ C. Finance,^{2,3} A. Le Faou¹
and B. H. Rihn^{3,4}

Correspondence
B. H. Rihn
b.rihn@chu-nancy.fr

¹Laboratoire de Virologie, Unité des Arbovirus et Fièvres Hémorragiques Virales, Institut Pasteur de Bangui, Central African Republic

²GEVSM-SRSMC, UMR 7565 CNRS Nancy-University, France

³CHU de Nancy Brabois, Nancy-University, France

⁴INSERM U525, Nancy-University, France

⁵Unité de Biologie Moléculaire chez les Extremophiles (BMGE), Institut Pasteur, Paris, France

The genus *Orthobunyavirus* is composed of segmented, negative-sense RNA viruses that are responsible for mild to severe human diseases. To date, no molecular studies of bunyaviruses in the genus *Orthobunyavirus* from central Africa have been reported, and their classification relies on serological testing. Four new primer pairs for RT-PCR amplification and sequencing of the complete genomic small (S) RNA segments of 10 orthobunyaviruses isolated from the Central African Republic and pertaining to five different serogroups have been designed and evaluated. Phylogenetic analysis showed that these 10 viruses belong to the Bunyamwera serogroup. The S segment sequences differ from those of the Bunyamwera virus reference strain by 5–15% at the nucleotide level, and both overlapping reading frames, encoding the nucleocapsid (N) and non-structural (NS) proteins, were evident in sequenced genomes. This study should improve diagnosis and surveillance of African bunyaviruses.

Received 13 October 2006
Accepted 12 February 2007

The genus *Orthobunyavirus* is composed of segmented, negative-sense, single-stranded RNA viruses that are responsible for mild to severe human diseases. Their genome is composed of three segments [small (S), medium (M) and large (L), encoding the nucleocapsid (N) and the non-structural (NSs) proteins, the virion surface glycoproteins G1 and G2 and the non-structural protein NSm, and the replicase/transcriptase L protein, respectively]. The genus *Orthobunyavirus* includes 18 serogroups (Soldan & González-Scarano, 2005). One of the largest is the Bunyamwera serogroup, named after the prototype member of the family *Bunyaviridae*, isolated from mosquitoes collected in Uganda in 1943 (Smithburn *et al.*, 1946). Most viruses belonging to this serogroup have been isolated from arthropods, such as mosquitoes and culicoid midges, as well as from vertebrate hosts. The classification of the Bunyamwera serogroup is based upon antigenic relationships, determined by plaque-reduction neutralization, haemagglutination-inhibition, complement-fixation and radial-immunodiffusion tests (Shope & Causey, 1962; Calisher & Karabatsos, 1988). Although serological immunoassays are available for antigen detection of a few viruses, cross-reactions are common and may impair their identification (Artsob *et al.*, 1984; Hildreth *et al.*, 1982). Molecular diagnosis of orthobunyavirus species would facilitate surveillance of vectors and reservoirs, as

well as laboratory diagnosis. Positive samples can be submitted to further investigations to identify species and subtypes.

Until now, orthobunyaviruses from the Central African Republic (CAR) have been exclusively classified serologically, and molecular characterization of circulating viruses is lacking. Developing specific molecular tools for African viruses is thus essential for improving virological surveillance in arthropod populations in endemic areas, as well as for clinical diagnosis. For this purpose, it would be of interest to have primers that allow detection of all circulating viruses, using as few separate reaction mixtures as possible. Here, we have isolated 133 strains of orthobunyavirus that have been classified by using serological assays: complement-fixation, haemagglutination-inhibition and neutralization tests in the Centre de Référence OMS de Recherche pour les Arbovirus (Dakar, Senegal) from samples obtained in CAR from mosquitoes and/or blood of symptomatic forest workers (Shope & Causey, 1962; Calisher & Karabatsos, 1988). Twelve of these strains were selected for determination of their complete S segment sequences. The purpose of this study was to determine whether it is possible to design specific primers for the detection of most African orthobunyavirus strains from samples or after cell culture.

Twelve strains of orthobunyavirus from the 133 strains of the collection of the Institut Pasteur de Bangui (CAR), classified as belonging to the Bunyamwera, Bakau, Turlock, Simbu and Nyando serogroups, were selected. They were grown on VeroE6 (green monkey kidney) cells in Eagle's minimum essential medium (Sigma) supplemented with 2% fetal bovine serum (Gibco-BRL) and antibiotics (penicillin/streptomycin; Sigma-Aldrich). To prevent any cross-contamination, each virus was grown individually. Cell layers and supernatants were harvested when approximately 75% of cells were exhibiting cytopathic effect (CPE) and centrifuged at 880 g (Heraeus Megafuge 1.0R, rotor BS4402/A). RNA was extracted from the supernatant by using a QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Using the obtained purified RNA extracts, the S segment was amplified by using primers specific for the Bunyamwera and California virus serogroups: BUNYA1, 5'-GTCA-CAGTAGTGTACTCCAC-3', and BUNYA2, 5'-CTGACA-GTAGTGTGCTCCAC-3'; and primers corresponding to the highly conserved terminal sequences of the S segment of Bunyamwera virus (GenBank accession no. NC_001927): BUNS274C, 5'-CTTAACYTTGGGGGCTGGA-3', and BUNS957R, 5'-CCCCIACCACCCACCC-3' (Dunn *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 2001).

As only partial sequences of the S segment could be obtained with the above sets of primers, four new set of primers (A, B, C and D) were designed on the basis of the GenBank NC_001927 S RNA segment, as follows: set A, BUNS1 (5'-AGTAGTGTACTCCACACTACAAACT-3') and BUNS3 (5'-TCGTCAGGAAGTGGGTTGTTCCGG-3'); set B, BUNS1 (5'-AGTAGTGTACTCCACACTACAAACT-3') and BUNS9 (5'-AGGAATCCAAGTGGGCGGTGGAGG-3'); set C, BUNS4 (5'-CTGGCAACCGGAACAACCCAGTT-3') and BUNS5 (5'-GAGACAAGTGTGAGTGCAGACTGAA-3'); set D, BUNS10 (5'-TCAGTCTGCACTGACAGTTGTCTC-3') and BUNS2 (5'-AGTAGTGTGCTCCACCTAAACTTA-3').

Complete S segment sequencing was performed by genome walking. Reverse transcription was performed by incubation (65 °C, 10 min) of the RNA extract (1.0 µl) in the presence of 25 pmol of the appropriate forward primers (BUNS274C and BUNYA1) in RNA-free H₂O in a total volume of 10.5 µl. The mixture was quenched immediately in an ice-water bath to prevent the reannealing of the RNA with the forward primer. Reverse transcription mix (9.5 µl), composed of 5 × First-Strand buffer, 10 mM dithiothreitol, 10 mM each dNTP, 20 U RNasin and 50 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), was added to the first components. cDNA was synthesized at 25 °C for 10 min, 42 °C for 50 min and 72 °C for 15 min. The amplification mix was composed of 2.0 µl cDNA, 5.0 µl 10 × Expand Long Template buffer (1.75 mM MgCl₂), 0.2 mM each dNTP, 25 pmol each primer and 2.5 U Expand Long Template buffer (Expand Long Template PCR System; Roche) in a total volume of 50.0 µl in autoclaved distilled water. Amplification was carried out by

using a cycle of melting at 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles of melting at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min. The thermal cycling was terminated by a final extension step at 72 °C for 10 min.

Amplified products were detected by staining with ethidium bromide following electrophoresis in a 1% agarose gel in Tris/borate/EDTA buffer (pH 8.0). DNA bands of the expected size were located by UV transillumination, sliced from the gel and purified by using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The sequences of amplified products were determined by using ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing ready reaction kits with AmpliTaq DNA Polymerase FS (Applied Biosystems), 3.2 pmol each primer and 30 ng amplified cDNA. Nucleic acid sequences were obtained by using an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Each sequence was determined twice to demonstrate reproducibility.

To examine the phylogeny of orthobunyaviruses, N open reading frame (ORF) nucleotide sequences of CAR strains were aligned with the corresponding ones from the Bunyamwera strain (GenBank accession no. NC_001927) and from 18 additional viruses of the Bunyamwera, California and Simbu serogroups that were retrieved from GenBank by using CLUSTAL_W at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Unfortunately, sequences from the Bakau, Turlock and Nyando serogroups were not available at the time of testing. From the resulting alignment, 689 unambiguously aligned positions were selected and a maximum-likelihood (ML) tree was constructed by using PHYML (Guindon & Gascuel, 2003), using the general time-reversible model including an estimation of base frequencies and a correction for rate heterogeneity among sites (four rate categories and an estimation of the alpha parameter describing the gamma distribution of rates). Statistical support at nodes was calculated by bootstrap from 100 resamplings of the original dataset.

CPE was observed at 3 days after inoculation on average with orthobunyavirus strains, except for M'Poko virus, for which 100% CPE was observed after 24 h. The primers designed for the California and Bunyamwera serogroups (Bowen *et al.*, 2001) allowed amplification of the genome of 10 of the 12 strains selected. These primers allowed the amplification of part of the S RNA sequences corresponding to approximately nt 320–800 of the Bunyamwera prototype genome (GenBank accession no. NC_001927). Combination of the published and designed primers allowed determination of complete S segment sequences of 10 of the 12 selected orthobunyaviruses (Table 1), but was unsuccessful for Pongola (Bwamba) and Batama (Tete) viruses. Moreover, attempted amplification using the terminal conserved 11 nt sequence generated only faint bands of approximately 250 bp as seen in agarose gel (data not shown).

The size of the amplified S segments ranged from 894 to 961 nt (Table 1). Their organization was identical to that of

Table 1. Characteristics of the S segments of 10 CAR orthobunyaviruses compared with the Bunyamwera prototype strain (GenBank accession no. NC_001927)

Abbreviations: NCR, non-coding region; NA, not amplified.

Serogroup/virus	Nucleotide sequence						Amino acid sequence	
	Length (nt)			A + U content (mol%)	N ORF*	NSs ORF*	N protein†	NSs protein†
	Total	5' NCR	3' NCR					
Bunyamwera								
Bunyamwera prototype NC_001927	961	85	174	58.17	702	306	233	101
Bunyamwera ArB28215	956	82	172	59.83	702 (84.4)	306 (92.9)	233 (91.8)	101 (93.1)
Bunyamwera ArB29051	961	85	174	59.00	702 (94.6)	306 (99.7)	233 (99.6)	101 (100.0)
Birao ArB2198	894	85	107	58.95	702 (86.8)	303 (94.2)	233 (93.1)	100 (91.1)
Bozo ArB13529	961	85	174	57.96	702 (88.2)	306 (93.3)	233 (87.1)	101 (91.1)
Ilesha ArB16282	961	85	174	58.79	702 (84.9)	330 (94.6)	233 (87.6)	109 (86.2)
Ilesha HB80P125	961	85	174	58.79	702 (83.2)	252 (94.9)	233 (94.4)	83 (77.2)
Bakau								
Nola ArB2882	961	85	174	58.69	702 (89.0)	306 (96.4)	233 (96.1)	101 (94.1)
Turlock								
M'Poko ArB365	955	85	147	58.17	723 (81.9)	288 (75.7)	240 (71.1)	95 (60.4)
Simbu								
Ingwavuma ArB2633d	958	83	227	59.19	648 (59.9)	294 (92.6)	213 (89.1)	97 (86.1)
Nyando								
Nyando ArB16055	959	79	178	59.54	702 (86.4)	306 (93.1)	233 (92.3)	101 (92.1)
Bwamba								
Pongola ArB28851	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–	–
Tete								
Batama AnB1292	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–	–

*Values are lengths in nt (percentage identity with prototype sequence).

†Values are lengths in aa (percentage identity with prototype sequence).

viruses of the Bunyamwera, California and Simbu serogroups of the genus *Orthobunyavirus* (Elliott, 1989, 1990) with two overlapping ORFs, predicted to encode the N and NSs proteins, respectively (Dunn *et al.*, 1994). The larger ORFs, encoding the N protein, consisted of 648–723 nt (nt 80/86–785/808) and were initiated by a methionine codon, whilst the smaller ORFs, encoding the NSs protein, consisted of 252–330 nt (nt 105–357/435) and began with two methionine codons, except for the Birao strain, which had only one. The coding regions were flanked by terminal non-coding regions (designated 5' and 3' NCRs) of 79–85 nt at the 5' end and of 107–227 nt at the 3' end (Table 1) with complementary sequences. The S segment showed 5–15% difference at the nucleotide level from the Bunyamwera virus sequence (GenBank accession no. NC_001927).

Alignment of the amino acid sequences of the N protein (213–240 aa) from 10 CAR viruses (Fig. 1a) showed sequence divergence of 4–27% with respect to the Bunyamwera virus prototype. However, a number of conservative amino acid substitutions were observed that replace an amino acid with another amino acid of similar properties and structure, and may have no effect on protein

function (Fig. 1a). Several regions were highly conserved and may contain the complement-fixation site that cross-reacted in serological tests within viruses of the genus *Orthobunyavirus*. The N protein of the M'Poko ArB365 strain was the most divergent when compared with the Bunyamwera strain (GenBank accession no. NC_001927; 26% amino acid variation). Similarly, the NSs sequence of the M'Poko ArB365 strain appeared highly divergent (37–43% dissimilarity) compared with other analysed viruses, but some conservative substitutions could be seen.

On the unrooted ML tree, three groups of sequences could be distinguished: (i) the Bunyamwera prototype virus and related strains; (ii) the California serogroup; and (iii) the Simbu serogroup (Fig. 2). The ten CAR viruses (indicated by ▲) grouped within the Bunyamwera cluster with high statistical confidence (100% bootstrap value). The two other groups, corresponding to the Simbu and California serogroups, were also each supported by a 100% bootstrap value. Although not all nodes within the Bunyamwera group are supported strongly, the ten CAR strains clustered at a bootstrap-support level of 97% with the Bunyamwera and Mboke viruses (GenBank accession nos NC_001927

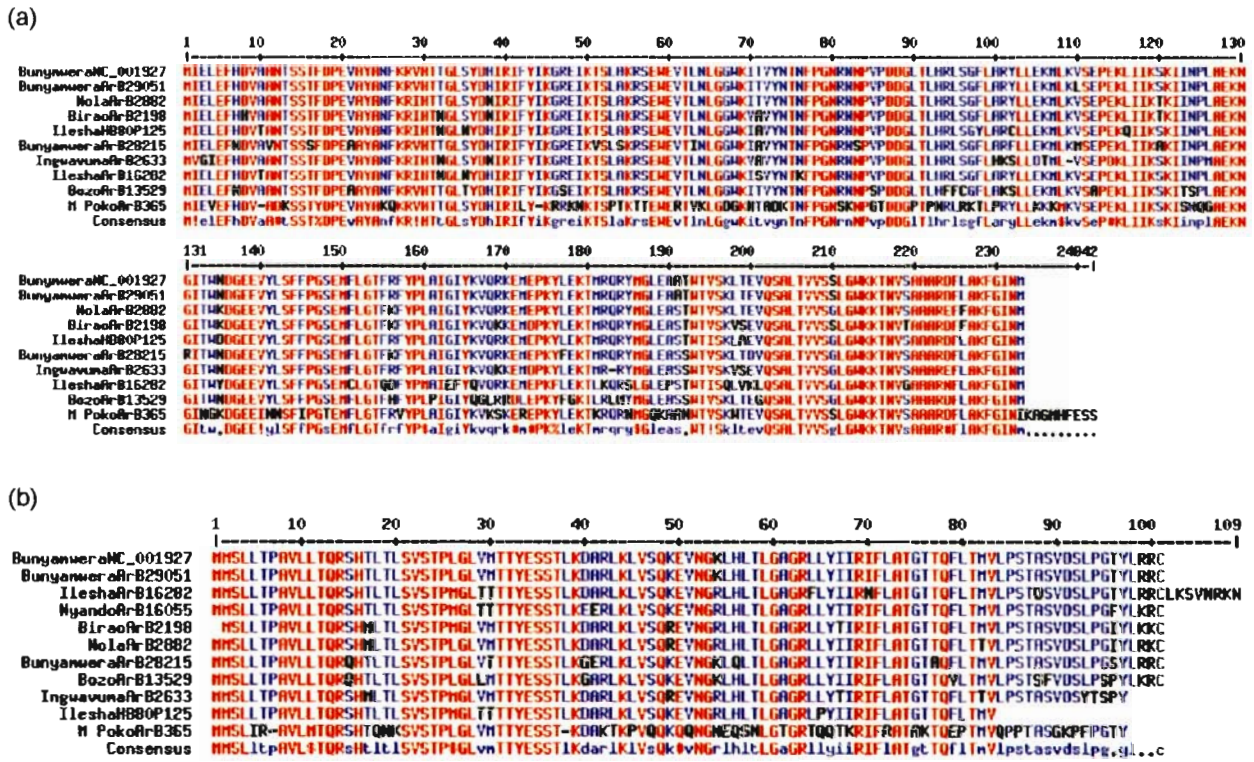


Fig. 1. Alignment of (a) N and (b) NSs amino acid sequences from the 10 CAR viruses and from the prototype strain of Bunyamwera virus.

and AY593727, respectively). Surprisingly, the ArB2633 Ingwavuma strain, which was classified in the Simbu serogroup by serological methods, clustered confidently with two Bunyamwera serogroup viruses and stood far from the other Simbu serogroup sequences. Alignment of the amino acid sequence of the N protein from the Ingwavuma ArB2633 strain showed sequence divergence of 42% with respect to the published Ingwavuma strain An4165 (GenBank accession no. AF362395). Similarly, the strains assigned to the Turlock (ArB365), Bakau (ArB2882) and Nyando (ArB16055) serogroups clustered confidently within the Bunyamwera group (Fig. 2).

African orthobunyavirus strains have seldom been studied and this paper represents the first contribution to molecular characterization of the S segment of CAR strains. Despite their classification within the Bunyamwera serogroup, attempts to amplify the S segments of two CAR strains, Bwamba (Pongola virus) and Tete (Batama virus), using either the previously described set of primers or the ones that we designed, were unsuccessful. Either these strains may have been misclassified, or the variability of orthobunyaviruses is greater than expected. Further studies will be attempted to clarify this point. Sequencing of the genomes of orthobunyavirus strains that were initially grouped by serological methods in the Simbu (ArB2633d

Ingwavuma), Turlock (ArB365 M'Poko), Bakau (ArB2882 Nola) and Nyando (ArB16055 Nyando) serogroups (Table 1) confirms the fact that they belong to the genus *Orthobunyavirus*. However, it remains to be determined which method (serological or molecular) is more appropriate for definition of the different groups of orthobunyaviruses. In fact, serogrouping based on serological analysis and genome sequencing produced very different results, making their comparison difficult. In addition, no S RNA segment nucleotide sequences of the Turlock (M'Poko virus), Bakau (Nola virus) and Nyando (Nyando virus) serogroups were available in GenBank and their exact taxonomic positions remain to be determined. Regarding the amino acid sequence variation between the two Ingwavuma strains, it would be interesting to determine whether the Ingwavuma ArB2633 strain from CAR was initially misclassified in the Simbu serogroup.

The presence of two successive AUG codons at the beginning of the NSs ORF is a characteristic of viruses belonging to the California and Bunyamwera serogroups (Bowen *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996). The presence of a unique AUG codon in the NSs ORF solely in the Birao strain is not surprising, as this characteristic is present in other strains (Germiston, GenBank accession no. M19420; Button-willow, accession no. AF362398; Oropouche, accession

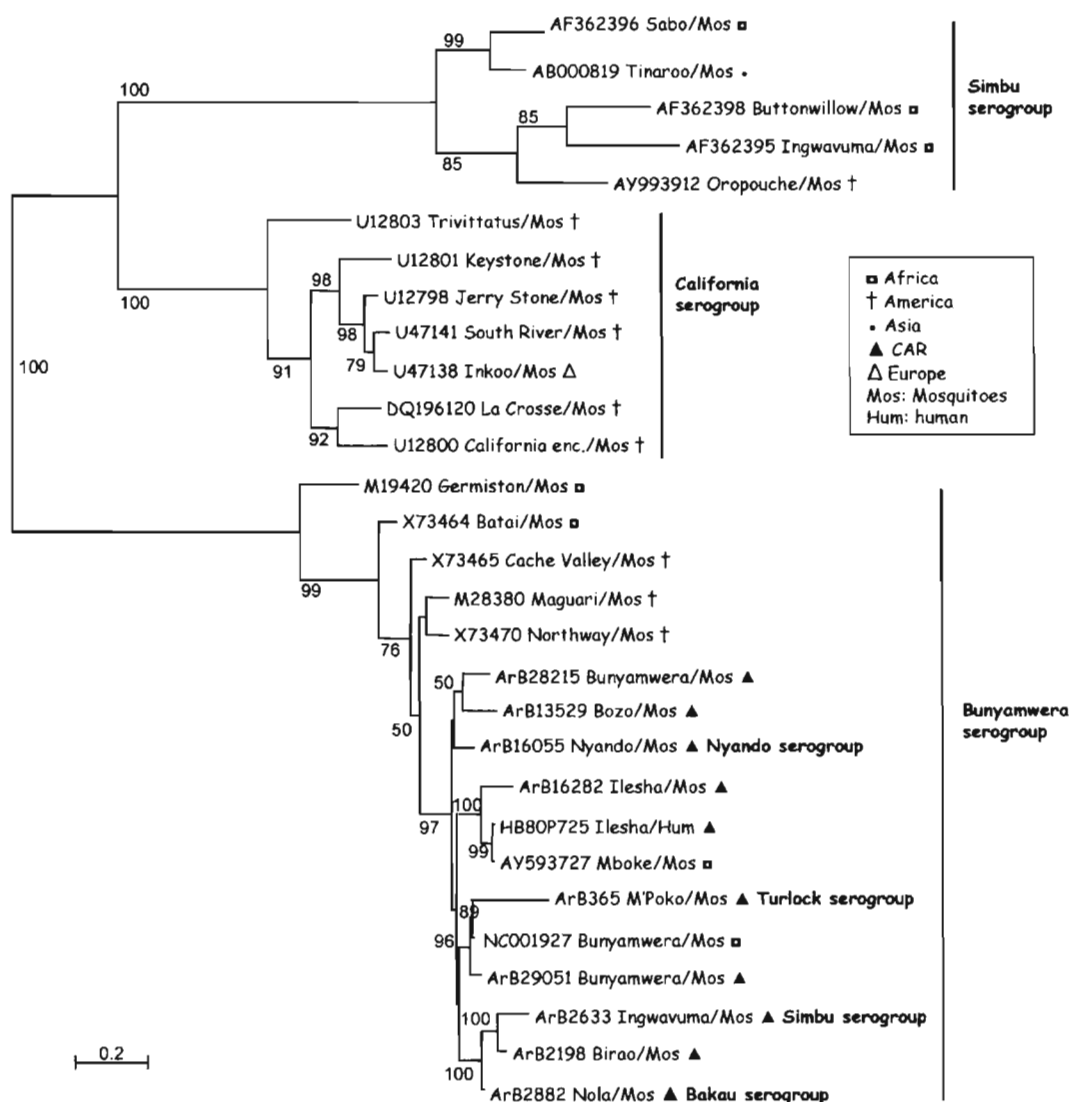


Fig. 2. Unrooted ML tree of N nucleotide sequences. Numbers at nodes are bootstrap values (see text for a detailed description of tree reconstruction). Bar, 0.2 substitutions per site.

no. AY993912; and Tinaroo, accession no. AB000819). Although it retains the main characteristics of Bunyamwera group viruses, the M'Poko strain appears as an outlier by its greater sequence divergence. M'Poko also showed a higher divergence in G2 protein sequence. Moreover, it emerged at the base of the Bunyamwera serogroup in a phylogenetic tree constructed with G2 protein sequences that was inconsistent with the tree built by using the N sequences (data not shown). However, this placement may be the product of an artefact of phylogenetic reconstruction induced by the presence of very long branches. Furthermore, in this tree, the Bunyamwera serogroup was not monophyletic, as it also included the Simbu serogroup.

Our study allowed the identification of primer sets suitable for detection of complete S RNA fragment sequences of most Bunyamwera serogroup viruses isolated from CAR in a single RT-PCR step. These primer sets have been shown to be effective in detecting the most serologically distinct viruses in the complex (M'Poko, Nyando, Ingwavuma and Nola viruses). Further studies are necessary to better characterize the two viruses (Pongola and Batama) that were not amplified by using the primer sets described above.

Acknowledgements

We thank Dr M. Bouloy for her support, for helpful advice and for suggestions about construction of the phylogenetic tree. We would

like to thank Dr N. Monhoven for oligonucleotide synthesis. This work was supported by grants from the French Ministry of Foreign Affairs.

References

- Artsob, H., Spence, L. P. & Thing, C. (1984).** Enzyme-linked immunosorbent assay typing of California serogroup viruses isolated in Canada. *J Clin Microbiol* **20**, 276–280.
- Bowen, M. D., Jackson, A. O., Bruns, T. D., Hacker, D. L. & Hardy, J. L. (1995).** Determination and comparative analysis of the small RNA genomic sequences of California encephalitis, Jamestown Canyon, Jerry Slough, Melao, Keystone and Trivittatus viruses (*Bunyaviridae*, genus *Bunyavirus*, California serogroup). *J Gen Virol* **76**, 559–572.
- Bowen, M. D., Trappier, S. G., Sanchez, A. J., Meyer, R. F., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Dunster, L. M., Peters, C. J., Ksiazek, T. G. & Nichol, S. T. (2001).** A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. RVF Task Force. *Virology* **291**, 185–190.
- Calisher, C. H. & Karabatsos, N. (1988).** Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, pp. 19–57. Edited by T. P. Monath. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dunn, E. F., Pritlove, D. C. & Elliott, R. M. (1994).** The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway bunyaviruses: sequence determination and analysis. *J Gen Virol* **75**, 597–608.
- Elliott, R. M. (1989).** Nucleotide sequence analysis of the S RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* **70**, 1281–1285.
- Elliott, R. M. (1990).** Molecular biology of *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* **71**, 501–522.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003).** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696–704.
- Hildreth, S. W., Beaty, B. J., Meegan, J. M., Frazier, C. L. & Shope, R. E. (1982).** Detection of La Crosse arbovirus antigen in mosquito pools: application of chromogenic and fluorogenic enzyme immunoassay systems. *J Clin Microbiol* **15**, 879–884.
- Huang, C., Shope, R. E., Spargo, B. & Campbell, W. P. (1996).** The S RNA genomic sequences of Inkoo, San Angelo, Serra do Navio, South River, and Tahyna bunyaviruses. *J Gen Virol* **77**, 1761–1768.
- Shope, R. E. & Causey, O. R. (1962).** Further studies on the serological relationships of group C arthropod-borne viruses and the application of these relationships to rapid identification of types. *Am J Trop Med Hyg* **11**, 283.
- Smithburn, K. C., Haddow, A. J. & Mahaffy, A. F. (1946).** A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki Forest. *Am J Trop Med* **26**, 189–208.
- Soldan, S. S. & González-Scarano, F. (2005).** Emerging infectious diseases: the *Bunyaviridae*. *J Neurovirol* **11**, 412–423.

Le virus Chikungunya

The Chikungunya virus

E. Nakouné^{1,3}

C. Finance^{1,2}

A. Le Faou^{2,3}

B. Rihn^{1,2}

¹ Laboratoire de virologie
du CHU de Nancy

² Inserm 525, Nancy Université
<b.rihn@chu-nancy.fr>

³ Institut Pasteur de Bangui

Résumé. Le virus Chikungunya (CHIKV), un arbovirus du genre *Alphavirus* représente un véritable problème de santé publique dans les régions tropicales de l'Asie du sud-est et d'Afrique. Ce virus est transmis à l'homme par des moustiques du genre *Aedes*. L'arbovirose (ou Chikungunya) est caractérisée par une fièvre, une éruption et des arthralgies invalidantes. Une surveillance accrue en zones tropicale et sub-tropicale est nécessaire, d'autant que l'on constate l'émergence de nouvelles infections dans des régions où la maladie n'avait jamais existé. Le contexte épidémique est d'une grande importance diagnostique. Il est très important de connaître les caractéristiques cliniques de l'infection à virus Chikungunya, afin de détecter les formes rarement ou jamais décrites auparavant. Le maintien d'un plateau technique opérationnel dans les laboratoires spécialisés permettra de poser un diagnostic spécifique et différentiel rapide. La connaissance de la chaîne épidémiologique de transmission, du réservoir - qui est pour le moment inconnu - à l'hôte permet de se protéger en limitant les risques à la source quand cela est possible. Puisqu'il n'existe aucun traitement antiviral efficace à ce jour, et, en l'absence de vaccin, les seules mesures de prévention concernent la protection individuelle contre les piqûres de moustiques et la lutte antivectorielle.

Mots clés : arbovirose, alphavirus, Chikungunya, vecteur *Aedes*

Abstract. Chikungunya virus (CHIKV), a member of the *Alphavirus* genus, represents a real public health problem in tropical regions of the Southeast Asia and Africa. It is transmitted to the man by *Aedes* mosquitoes and the illness, known as Chikungunya, is characterized by fever, eruptions and invalidating arthralgia. An increased surveillance in tropical and subtropical areas is necessary, as far as we have noticed recently the emergence of this new disease in regions where it had never existed before. The epidemic context is of a high importance for diagnosis. It is very important to know the clinical characteristics of the infection, to detect forms rarely or never described previously. Permanence of a highly technical core in specialized laboratories will allow, fast, specific and differential diagnosis. The knowledge of the epidemiological chain of transmission from reservoir, still unknown, to the host aims to protect populations by limiting the risks of exposure when it is possible. The only prevention measures available are individual protection against mosquitoes and antivectorial fight, in the absence of specific antiviral treatment and vaccine.

Key words: arbovirus disease, alphavirus, Chikungunya, *Aedes* mosquitoes

Article reçu le 31 janvier 2007,
accepté le 26 mars 2007

merci de vérifier les capitales et les italiques dans tout l'article. Le chikungunya est une arbovirose due au virus

Tirés à part : B. Rihn

Chikungunya (CHIKV). Ce virus a été isolé en 1953 chez des moustiques des genres *Aedes spp.* et *Culex spp.* et a été rattaché aux arbovirus du groupe A [1]. Il est responsable d'une maladie bénigne dans la majorité des cas mais qui peut devenir invalidante du fait des douleurs violentes

qui l'accompagnent et pour laquelle un diagnostic différentiel avec la Dengue peut se poser. Cette infection est présente dans la bande intertropicale et sévit surtout en Afrique, dans le Sud-Est Asiatique et les pays de l'Océan Indien.

Le virus

CHIKV appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Les *Alphavirus* sont des arbovirus (*arthropod-borne virus*), virus dont la transmission d'un hôte vertébré contaminé à un hôte sain se fait *via* un vecteur arthropode infecté. Les *Alphavirus* sont présents sur tous les continents, à l'exception de l'antarctique. Ce sont des virus à ARN simple brin, de polarité positive (l'ARN est infectieux) enveloppés. Le genre *Alphavirus* est divisé en 26 sous-groupes sur des critères sérologiques mais peut être divisé en 3 groupes principaux et un groupe recombinant sur des critères génomiques (tableau 1) [2]. Chaque sous-groupe réunit un nombre variable de souches ou de

variants géographiques. CHIKV appartient au groupe Semliki Forest, il est présent en Afrique et en Asie du Sud-Est.

Structure du virus

Comme les autres alphavirus CHIKV est un petits virus à ARN, enveloppé. La particule virale est sphérique, de 60 à 70 nm de diamètre. La nucléocapside est icosaédrique et composée de 240 capsomères formés de 2 peptides. Elle renferme un brin unique d'ARN. L'enveloppe porte 240 spicules, chacune composée de 3 hétérodimères de 2 glycoprotéines majeures E1 et E2. Des spicules, dites mineures, en plus petit nombre, formées par la glycoprotéine E3 et un polypeptide 6K, peuvent être présents. Le génome des alphavirus est constitué d'un seul brin d'ARN monocaténaire de 11-12 kb, linéaire, de polarité positive et non segmenté. Les gènes codant les protéines structurales correspondent au tiers du génome et sont situés à l'extrémité 3'. Les deux tiers restants correspondent aux protéines non structurales. Ces virus sont stables à pH compris entre 7 et 8, mais sont rapidement inactivés à pH

Tableau 1. Titre .

Groupe	Nom du virus	Abréviation	Distribution
VEE/EEE	Encéphalite équine de l'Est	EEEV	Amérique du Nord Amérique du Sud
	Encéphalite équine du Venezuela	VEEV	Amérique du Sud Amérique Centrale
	Everglades	EVEV	Floride
	Mucambo	MUCK	Brésil, Pérou
	Pixuna	PIXV	Brésil
Semliki Forest	Semliki Forest		Afrique, Eurasie
	Middelburg		Afrique
	Chikungunya	CHIKV	Afrique, Asie du Sud-Est
	O'Nyong-Nyong		Afrique
	Ross River		Australie, Océanie
	Barmah Forest		Australie
	Getah		Australie, Asie
	Sagiyama		Japon
	Bebaru		Malaisie
	Mayaro		Amérique du Sud
Una		Amérique du Sud	
Sindbis	Sindbis	SINV	Afrique, Asie, Europe, Scandinavie, Australie
	Aura	AURAV	Brésil, Argentine
	Whataroa	WHAV	Nouvelle Zélande
	Babanki	BABV	Afrique de l'Ouest
	Kyzylagac	KYZV	URSS
Virus recombinants ou de groupe incertain	Encéphalite équine de l'Ouest	WEEV	Amérique du Nord Amérique du Sud
	Highlands	HJV	Est des USA
	Fort Morgan	FMV	Ouest des USA
Non groupés	Ndumu	NDUV	Afrique
	Buggy Creek		Ouest des USA

acide [3]. À 37 °C, les virus ont une demi-vie d'environ 7 jours, ils sont rapidement inactivés à 58 °C. Ils sont sensibles aux solvants organiques et aux détergents.

Multiplication du virus et cycle viral

Comme les autres Alphavirus, CHIKV peut être cultivé sur différents types cellulaires provenant de leurs hôtes naturels (mammifères, hommes, moustique), à des températures variant de 25 à 41 °C. Leur multiplication est intracytoplasmique (figure 1). Après fixation des spicules d'enveloppe sur des récepteurs cellulaires non identifiés, le virus est internalisé, la nucléocapside est libérée par fusion entre la vacuole d'endocytose et l'enveloppe virale. Dès l'entrée, l'ARN viral sert d'ARN messager pour la synthèse des protéines non structurales. Un polypeptide précurseur est clivé par une protéase virale pour produire les 4 protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4). Celles-ci (hélicase, protéase, ARN polymérase) assurent la synthèse d'ARN de polarité négative complémentaire de l'ARN génomique. À leur tour, ces derniers permettent la synthèse d'ARN génomiques (+) et sous-génomiques pour la traduction des protéines structurales ce qui permet la reconstitution de la particule virale. L'encapsulation des ARN s'effectue dans le cytoplasme et les virions néo-formés sont produits par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique sur laquelle se sont fixées les glycoprotéines de l'enveloppe. Dans les cellules de moustique, après une courte phase initiale productive, une infection persistante à faible niveau s'établit, sans lyse cellulaire. Dans les cellules de vertébrés sensibles (cellules Vero, BHK21 ou fibroblastes d'embryon de poulet), l'infection est rapidement très productive, maximale en 4 heures à 40 °C ou 6 heures à 30 °C puis elle conduit à la lyse cellulaire. Ces observations sont à rapprocher de l'infection *in vivo* : les insectes restent infectés toute leur vie sans affection apparente alors que l'homme fait des

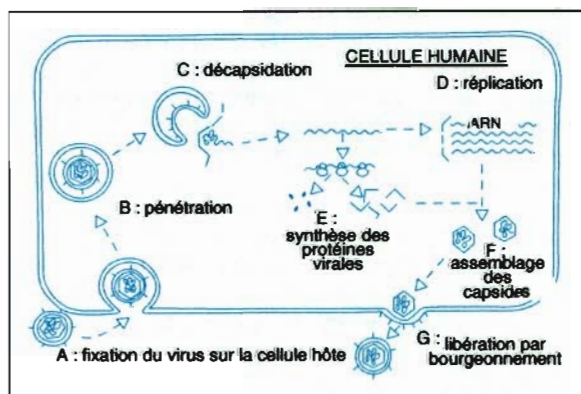


Figure 1. Multiplication du virus et cycle viral.

infections symptomatiques et courtes. Le CHIKV comme beaucoup d'arboviroses infecte l'homme de manière accidentelle. Le réservoir est un animal (qui n'est pas identifié) et le virus circule au sein de cette population grâce au couple animal/moustique qui assure ainsi la persistance du virus. L'animal infecté n'est en général pas malade. À la faveur de modification climatique ou environnementale, le moustique est amené à piquer l'homme. Si la population de diptère est importante, l'homme peut devenir une cible préférentielle et à ce moment une épidémie peut s'installer. La réplication chez le moustique est nécessaire pour assurer la transmission du virus. Il convient de rappeler que les femelles piquent car elles ont besoin de sang pour assurer la production d'œufs. Après un repas le virus se réplique dans l'intestin puis gagne les glandes salivaires. L'injection de la salive au moment de la piqûre assure la pénétration du virus dans l'hôte.

Caractéristiques cliniques de l'infection A virus Chikungunya

Selon l'OMS, le Chikungunya est une forme de Dengue, bien que les autorités sanitaires préfèrent en général éviter cette appellation afin de préserver le tourisme. Chikungunya signifie « marcher courbé ou qui brise les os » en langue *makondé* (et non *swahili* comme cela est noté fréquemment) car Marion Robinson qui, la première, a individualisé l'entité clinique a repris un terme du plateau *Makondé* où le peuple *Swahili* n'étaient pas prédominant en 1950 [4]. Cette appellation a un lien direct avec les arthralgies invalidantes (douleurs articulaires), qui sont l'un des symptômes prédominants de cette maladie. Lorsque les malades ressentent des douleurs aiguës, ils ont parfois du mal à marcher ou à effectuer leurs tâches quotidiennes.

Tableau clinique usuel

La période d'incubation silencieuse est de 4 à 7 jours après la piqûre de moustique infectante. La maladie se déclare généralement par une très forte fièvre d'apparition brutale, parfois au-delà des 40 °C, sur environ 3 jours. Cette fièvre est suivie d'un érythème, de courbatures très douloureuses, et d'arthralgies durant 5 jours ou plus, qui touchent les extrémités des membres (poignets, chevilles, phalanges). S'y associent, des céphalées, des dorsalgies, mais surtout une éruption cutanée morbilliforme parfois prurigineuse dans près de la moitié des cas. Celle-ci peut toucher le visage, le cou, le tronc ou les membres mais surtout le thorax. Elle peut être associée à un œdème facial. Chez l'enfant l'éruption peut être bulleuse avec d'importants décollements cutanés et des hémorragies bénignes à type d'épistaxis et de gingivorragies peuvent

être observées [5, 6]. Au début, les symptômes peuvent évoquer une crise de paludisme. La guérison est la règle, mais la convalescence s'accompagne d'une asthénie importante. Les arthralgies persistantes, peuvent entraîner une incapacité de plusieurs semaines, voire de plusieurs mois.

Le cas particulier des arthralgies et arthrites

Les arthralgies à CHIKV ont été décrites dès les années 1930-1950 en Australie sous le nom de *epidemic poly-arthritis* [7]. Mais celles-ci n'ont fait l'objet que de descriptions peu nombreuses et peu précises. En particulier entre arthralgies simples ou arthromyalgies d'une part, et arthrites vraies d'autre part, la distinction n'apparaît pas clairement. De même, le mécanisme de ces atteintes n'est pas bien connu et la présence du virus dans le liquide ou le tissu synovial est discutée [8, 9]. Par contre, les arthrites causées par des alphavirus voisins, et notamment par le Ross River virus, sont plus documentées [7-11]. L'atteinte articulaire survient chez 90 % des sujets infectés, après un bref épisode de fièvre éruptive. Elle est constituée d'une polyarthrite vraie à début aigu, d'intensité variable, symétrique, et touchant avec une fréquence particulière les poignets. La radiographie montre des atteintes non destructrices. Les épanchements correspondent à un liquide synovial inflammatoire ($> 1\ 000$ éléments/mm³) riche en lymphocytes. Les inflammations articulaires chroniques entraînent une gêne fonctionnelle importante et peuvent être invalidantes et persister plusieurs mois, voire années. Cependant le pronostic fonctionnel reste bon [8].

Formes rares et graves du chikungunya de l'adulte observées à La Réunion

L'infection à CHIKV est réputée ne pas mettre en jeu le pronostic vital ; ainsi en Asie, d'où proviennent la majorité des informations disponibles, ni décès ni forme clinique de particulière gravité n'avaient été rapportés [7, 12]. Pourtant, lors de l'épidémie réunionnaise, chez les sujets avec infection à CHIKV biologiquement confirmée, l'Institut national de veille sanitaire (InVS) à la date du 14 mars 2006, a comptabilisé 96 patients âgés de plus de 28 jours (sept patients de 28 jours à 15 ans, 79 patients âgés de plus de 15 ans, sex-ratio M/F 1,4), ayant nécessité un séjour en réanimation avec 39 décès. Les tableaux suivants ont été observés et directement liés à l'infection :

- huit cas d'encéphalite avec des séquelles dans trois cas, cinq cas de syndromes de Guillain-Barré dont deux nécessitant l'assistance ventilatoire ;
- huit hépatites graves avec indication de greffe ;
- quelques cas de myocardite et péricardite.

Des complications iatrogènes aux morphiniques (sur insuffisance rénale), aux AINS, au paracétamol (hépatite toxique) ont été notées. Enfin des surinfections bactérien-

nes ont été diagnostiquées : septicémie à *Listeria*, abcès hépatique à pyogène, pneumonies, chocs septiques. En général près de la moitié des cas graves résultaient de la décompensation d'une maladie chronique sous-jacente (sujets âgés, éthylisme, prise de paracétamol ou de dextropropoxyphène à forte dose).

Épidémiologie et histoire naturelle des infections au virus du Chikungunya (CHIKV)

Les premières épidémies

Les premières atteintes de chikungunya ont été observées en 1952 au Tanganyika et ont permis les premières descriptions de sa clinique [4] et de son épidémiologie [13]. Une deuxième épidémie a été décrite en Ouganda [14]. Depuis, les épidémies n'ont été observées qu'en Afrique de l'Est, en l'Asie du Sud-Est et dans le sous-continent indien. Les populations cibles sont différentes en Afrique où les ruraux sont plus atteints, en comparaison de l'Asie où les zones urbanisées sont touchées [15].

L'épidémie de La Réunion

L'épidémie de La Réunion est singulière dans le sens où c'est la première épidémie touchant une région dont les infrastructures sont identiques à celles des pays occidentaux. Dès le 15 avril 2005, un dispositif de vigilance a été mis en place à la Drass de La Réunion. En effet, une importante épidémie avait touché au début de l'année 2005 les Comores et les premiers cas « importés » des Comores avaient été décrits fin avril alors que les premiers cas autochtones ont été documentés dès le 9 mai à La Réunion. Très vite donc les médecins du groupe Grog ont été mis à contribution pour notifier les cas suspects et confirmés et des instructions ont été données aux laboratoires d'analyses biologiques et médicales de La Réunion [15, 16]. Un pic épidémique a été relevé mi-mai (~ 450 cas/semaine) avec un nombre de cas avoisinant les 3 000, suivi d'une recrudescence dès le mois d'octobre 2005 et surtout depuis décembre 2005 (~ 300 cas/semaine), alors que cette dernière recrudescence de l'épidémie, lors de l'été austral, n'avait pas eu lieu aux Comores [15]. Un autre pic épidémique a été atteint, la 2^e semaine de février 2006, mais l'occurrence a baissé fortement jusqu'à mi-mars où le nombre de cas semblait se stabiliser. Cependant le nombre de personnes présentant des signes compatibles avec une infection à CHIKV pourrait être beaucoup plus important, puisqu'une projection mathématique estime le nombre total de cas à 266 000 (dont 254 décès imputables au CHIKV) pour 770 000 habitants soit un taux d'attaque qui serait à environ 30 % [17-19]. La maladie s'est étendue aux autres

pays riverains de l'Océan Indien avec des épidémies aux Seychelles, à l'île Maurice, en Malaisie, aux Comores à Madagascar et surtout en Inde. L'épidémie de la Réunion est en nette décroissance, car on compte 20 cas sporadiques par semaine début janvier 2007, alors qu'à pareille époque - il y a 1 an - le nombre de cas était de 7 400/semaine [18].

Une des caractéristiques de l'épidémie de La Réunion est la survenue vraisemblable de transmissions materno-fœtales du virus avec 37 infections de nouveau-nés de moins de 10 jours [20]. L'autre originalité est le nombre de formes graves (neurologiques et hépatiques notamment) qui représentent plus de 120 personnes. Une micro-évolution du génome de CHIKV, unique dans les îles de l'Océan Indien, a été décrite avec une apparition de mutations, notamment de la glycoprotéine E1 (A223V), qui pourrait conférer une meilleure adaptation du virus à son vecteur ainsi que des mutations additionnelles sur nsP1 (T301I), nsP2 (Y642N) ou nsP3 (Δ E460) dans une souche isolée d'un LCR [21].

Vecteurs, réservoir de virus

Le virus est transmis par les moustiques du genre *Aedes* (en fait *Stegomyia*, nouvelle appellation officielle) notamment *aegypti*, *albopictus*, *polynesiensis*. Il a été montré par Turell *et al.* [22] qu'*Aedes albopictus*, l'espèce dominante sur l'île de La Réunion qui réapparaît massivement pendant la saison des pluies, véhiculait plus facilement le virus du singe vers le souriceau que *A. aegypti*. Le réservoir animal du CHIKV n'est pas connu mais 5,2 % des sérums d'animaux domestiques ont des anticorps inhibant l'hémagglutination [23]. Seul Konstantinov [24] a montré, lors d'un imposant travail, qu'une tique (*Ixodes*) sur 96 167 isolées en République de Guinée, hébergeait le CHIKV qui, par ce vecteur, pourrait être transmis aux animaux sauvages et domestiques.

Le diagnostic biologique de l'infection A CHIKV

Le diagnostic d'une arbovirose est difficile et nécessite la recherche directe du virus dans le sang du malade quand cela est possible ainsi que la recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum. Il est réservé aux laboratoires spécialisés.

Diagnostic direct

Isolement viral

C'est le diagnostic de certitude et de référence à partir du sang d'un patient fébrile, la phase virémique s'étendant de J1 à J5. Il peut être réalisé par inoculation (intracérébrale)

ou suriceau nouveau-né ou par culture cellulaire sur cellules Vero ou cellules C6/36 d'*Aedes albopictus* [25]. L'effet cytopathogène est observé après 2 à 3 jours [26]. Il consiste en un arrondissement, une augmentation de la réfringence et détachement du support dans le milieu de culture. À la coloration, des inclusions cytoplasmiques sont visibles. Le virus est identifié par des techniques sérologiques ou moléculaires. Cette technique est sensible et permet de disposer de la souche.

Diagnostic moléculaire

La recherche du virus par amplification génique est plus aisée et une RT-PCR utilisant deux couples d'amorces choisies dans les gènes de la protéine non structurale 1 (nsP1 : CHIK/nsP1-S : 5'-TAGAGCAGGAAATTGAT CCC et CHIK/nsP1-C : 5'-CTTTAATCGCCTGGTGG TAT) et de la glycoprotéine E1 (E1 : CHIK/E1-S : 5'-TCA CCATTCATGTGGGGC / CHIK/E1-C : 5'-GCCTTTGTA CACCACGATT) [27]. Une RT-PCR combinée à une PCR nichée a été décrite par Pfeiffer *et al.* [28]. Cette technique amplifie un fragment de 427 pb du gène *E2* de tous les *Alphavirus* et la PCR nichée permet d'amplifier spécifiquement un fragment de 172 pb de CHIKV.

Détection rapide d'antigène viral directement à partir des produits biologiques

Le diagnostic direct, pratiqué à l'aide d'anticorps monospécifiques, est largement utilisé car c'est une technique rapide, évitant les aléas de la culture cellulaire. Cet immuno-cyodiagnostic est effectué sur sécrétions muqueuses, frottis de lésions ou sang.

Diagnostic indirect

Sérologie spécifique

Il convient de se limiter principalement à la recherche de deux types de marqueurs : les IgM par test Elisa en immunocapture [29] pour faire preuve d'une infection aiguë, active ou d'une infection néonatale. Les IgM sont mis en évidence par un prélèvement postérieur au cinquième jour. Elles persistent plusieurs jours à trois semaines. Les IgG sont recherchées par Elisa ou agglutination de particules sensibilisées [30]. Il existe une probabilité de faux-positifs par réaction croisée avec les IgM de la dengue, du fait d'une stimulation antigénique polyclonale. Par ailleurs, des réactions croisées avec d'autres *Alphavirus* comme Sindbis, O'nyong nyong, et le Ross River virus peuvent survenir.

La réaction de séro-neutralisation

C'est la réaction de référence car les anticorps neutralisants sont parmi les plus spécifiques étant donné qu'ils ne présentent pas ou peu de réactions croisées entre les espèces d'une famille virale. Cependant, cette recherche est délicate et longue à mettre en œuvre et nécessite de posséder

der les souches virales contre lesquelles on recherche les anticorps présents dans le sérum du patient.

Diagnostic différentiel

Les régions où CHIKV circule sont également des zones de forte activité des virus de la dengue et d'autres alphavirus comme Sindbis, O'nyong nyong, Mayaro. Dans un contexte où deux épidémies circuleraient simultanément, il serait très difficile de porter un diagnostic purement clinique. Il peut y avoir des réactions croisées avec le virus O'nyong nyong, que Calisher [31] a classé comme sous-type du CHIKV. Il existerait une possibilité de faux positifs avec les IgM de la dengue, par stimulation polyclonale. Les principaux diagnostics différentiels sont donc la Dengue, une infection à virus O'nyong nyong ou virus de Ross River.

Aussi la recherche des principaux arbovirus doit être privilégiée quand elle est possible, soit par culture ou par amplification génique [32, 33]. Pour ce faire il est impératif d'obtenir un prélèvement sanguin précoce.

Conduite pratique à tenir lors d'une suspicion de cas de chikungunya

Le diagnostic clinique est rapidement évoqué dans un contexte épidémique bien qu'il faille aussi garder à l'esprit les autres causes de fièvre. Ce diagnostic peut être confirmé par sérodiagnostic à partir de réactifs fournis par le Centre national de référence des arboviroses : les IgM sont identifiés en moyenne à partir du cinquième jour après l'apparition des signes cliniques. Un diagnostic plus précoce peut aussi être obtenu par amplification génique ou RT-PCR (figure 2). Dans le cas de la Réunion, ces examens sont réalisés par les laboratoires hospitaliers d'immunologie du Centre hospitalier de Saint-Denis et de Saint-Pierre, qui ont passé une convention avec le Centre national de référence des arboviroses.

Pour la population générale les sérodiagnostics seront adaptés aux différentes situations :

– en zone épidémique il n'est pas recommandé une sérologie de CHIKV systématique devant une symptomatologie clinique évocatrice. Par contre, en cas de doute diagnostique, les sérologies de CHIKV et du virus de la Dengue

sont recommandées compte tenu de la possible co-circulation des deux virus ;

– en zone non épidémique la sérologie de CHIKV et du virus de la Dengue doivent être systématiques pour les « premiers cas suspects » compte tenu de la possible co-circulation des deux virus, sans conditionner l'intervention de la lutte antivectorielle au résultat.

Chez les femmes enceintes asymptomatiques, il est conseillé de ne pas réaliser de sérologie de CHIKV. Par contre, elle est vivement préconisée chez les femmes symptomatiques sans cause infectieuse évidente ou habitant dans une zone de circulation active du virus. La PCR est recommandée chez les femmes présentant un Chikungunya aigu au cours du dernier mois de grossesse. Lorsque les malades sont hospitalisés il est également recommandé de pratiquer une PCR ou sérologie de CHIKV pour les formes graves mettant en jeu le pronostic vital et pour les formes " émergentes ", c'est-à-dire présentant une symptomatologie clinique non encore décrite dans la littérature internationale.

Le traitement

La prise en charge thérapeutique d'un chikungunya banal repose essentiellement sur la prescription d'anti-inflammatoires non stéroïdiens afin de soulager les douleurs, l'évolution spontanée de la maladie étant presque toujours favorable. En effet, en l'absence d'un traitement antiviral spécifique, la prise en charge est centrée sur la surveillance et les traitements symptomatiques : antalgiques, antipyrétiques, maintien des fonctions essentielles. Il s'agit aussi d'être attentif aux effets iatrogènes des thérapeutiques prescrites, notamment en ce qui concerne les risques d'abus et de dépendance aux opiacés. Il est conseillé de prescrire le plus tôt possible le traitement symptomatique pour soulager la douleur et la fièvre. Le clinicien peut aussi prescrire, si nécessaire, une kinésithérapie à des fins antalgiques (massage, cryothérapie, chaleur locale...), avec mobilisation précoce après la phase fébrile. Il convient également d'expliquer à l'entourage du patient les mesures de protection pour éviter la transmission vectorielle.

La recherche de la survenue éventuelle de complications propres à la maladie : forte fièvre, formes cutanées vésiculo-bulleuses ou extensives... ou de formes graves avec des symptômes d'atteinte cérébrale (signes de méningite ou d'encéphalopathie) est indispensable. Les soignants se doivent de surveiller tout effet indésirable lié au traitement, notamment les décompensations de comorbidités : insuffisance cardiaque, insuffisance hépatique, insuffisance coronaire, diabète, insuffisance rénale chronique...

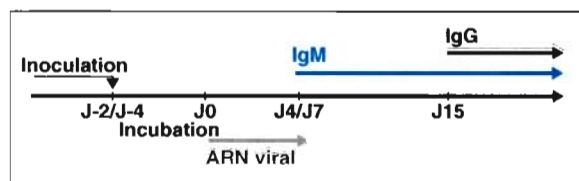


Figure 2. Stratégie du sérodiagnostic et d'un diagnostic précoce par RT-PCR d'une infection à virus Chikungunya.

Les mesures de prévention

Le Chikungunya est une maladie à déclaration obligatoire et la prévention est très importante. La lutte antivectorielle communautaire, mécanique, chimique et biologique, est surtout basée sur des épandages massifs et nocturnes d'insecticides type organophosphorés, méthylpyrimiphos, théméphos, fénitrothion qui ne sont pas sans poser des problèmes écologiques. Certains insecticides employés jusqu'alors à La Réunion ont été remplacés par un larvicide, le BTI ou la toxine « cristal » de *Bacillus thuringiensis israelensis*. À La Réunion, des actions de lutte contre le moustique *Aedes* ont été menées de façon intensive ; elles consistaient à : 1) réduire le nombre de gîtes larvaires par suppression de toutes les réserves d'eau stagnante dans et à proximité des maisons et, lorsque cette suppression n'est pas possible, appliquer des traitements larvicides ; 2) en zone infectée et période épidémique, lutter contre le vecteur adulte par épandage aérien d'insecticide. Leur efficacité dépend de l'implication de la population à leur mise en œuvre. Auprès des personnes malades, il convient aussi d'insister sur l'utilisation de répulsifs cutanés ou d'une moustiquaire imprégnée, afin d'éviter la transmission du virus à un nouveau moustique et donc, à d'autres personnes. Dans la métropole et particulièrement dans les Alpes-Maritimes et en Haute-Corse, en raison de l'implantation avérée d'*Aedes albopictus*, l'InVS demande à ce que tout cas suspect de Chikungunya soit signalé au médecin inspecteur de santé publique de la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) de ces départements.

Au niveau individuel, la prévention de la piqûre de moustique passe préférentiellement par l'utilisation de moyens de protection physique : vêtements longs, qui peuvent être imprégnés d'insecticides (perméthrine par exemple), chaussures fermées, moustiquaires, diffuseurs d'insecticide... L'utilisation de répulsifs est recommandée, avec des précautions à respecter, chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 12 ans. Chez le nouveau-né de moins de trois mois, il convient de ne pas utiliser de produit répulsif et de privilégier l'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticides pyrèthrinoides (perméthrine, deltaméthrine) ; l'usage du diéthyltoluamide (DEET) est contre-indiqué. Chez les enfants de trois mois à deux ans, il est conseillé de limiter l'application d'un répulsif à une fois par jour et d'éviter les muqueuses et les mains des enfants. Une information sur les répulsifs anti-moustiques proposés en pharmacies est disponible sur le site Internet www.sante.gouv.fr [rubrique chikungunya].

Conclusion

Dans un contexte d'atteinte isolée, le diagnostic d'un épisode est rarement obtenu dans le cas d'une infection bény-

gne à virus Chikungunya ou alors c'est le plus souvent un diagnostic rétrospectif qui est demandé. Par contre, dans un contexte épidémique une bonne coordination entre le clinicien et le laboratoire permet d'obtenir des prélèvements précoces, au moment des pics fébriles et ainsi de faire rapidement le diagnostic de l'infection dans de bonnes conditions. Il faudra attendre d'autres épisodes d'infection pour savoir si les cas graves observés à la Réunion correspondent à une évolution du virus ou bien si c'est un phénomène isolé du fait de l'isolement de l'île.

merci de préciser les noms des auteurs, éditeurs si besoin, la ville d'édition, la maison d'édition et l'année

Références

1. Lippincott Williams, Wilkins. Fields. Virology 4th Edition : 200, 1579.
2. Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale*. Paris : Estem, De Boeck diffusion, 2003 ; (699).
3. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. In : *Virus taxonomy*. Academic Press, 2000 : 1162 ; merci de préciser la ville et le nom de l'article .
4. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1955 ; 49 : 28-32.
5. Brighton SW, Prozesky OW, de la Harpe AL. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S Afr Med J* 1983 ; 63 : 313-5.
6. Fourie ED, Morrison JG. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S Afr Med J* 1979 ; 56 : 130-2.
7. Mackenzie JS, Smith DW. Mosquito-borne viruses and epidemic polyarthritis. *Med J Aust* 1996 ; 164 : 90-3.
8. Jeandel P, Josse R, Durand JP. Exotic viral arthritis : role of alphavirus. *Med Trop* 2004 ; 64 : 81-8.
9. Kennedy AC, Fleming J, Solomon L. Chikungunya viral arthropathy : a clinical description. *J Rheumatol* 1980 ; 7 : 231-6.
10. Harley D, Sleight A, Ritchie S. Ross River virus transmission, infection, and disease : a cross-disciplinary review. *Clin Microbiol Rev* 2001 ; 14 : 909-32.
11. Suhrbier A, La Linn M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr Opin Rheumatol* 2004 ; 16 : 374-9.
12. Jupp PG, McIntosh BM. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc* 1990 ; 6 : 415-20.
13. Lumsden WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1955 ; 49 : 33-57.
14. Mason PJ, Haddow AJ. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53 ; an additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957 ; 51 : 238-40.

15. Duhamel G, Gombert D, Paupy C, Quatresous I. Mission d'appui à la lutte contre l'épidémie de chikungunya à la Réunion, Rapport 200612 de l'IGAS, l'AFSET, l'IRD et l'InVS, janvier 2006.
16. Paquet C, Quatresous I, Solet JL, *et al.* Chikungunya outbreak in Reunion : epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006. *Euro Surveill* 2006 ; 11 ; [E060202-3].
17. Institut de Veille Sanitaire. *Epidémie de Chikungunya à La Réunion/Océan Indien : Point de situation au 7 avril.* 2006.
18. Institut de Veille Sanitaire. *Chikungunya dans l'Océan Indien : Point de situation au 12 janvier.* 2007.
19. Jossieran L, Paquet C, Zehgnoun A, *et al.* Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. Emerging infectious disease. www.cdc.gov/eid. Vol. 12, No 12, December 2006.
20. Touret Y, Randrianaivo H, Michault A, *et al.* Early maternal-fetal transmission of the Chikungunya virus. *Presse Med* 2006 ; 35 : 1656-8.
21. Schuffenecker I, Itaman I, Michault A, *et al.* Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 2006 ; 3 : e263 ; (Epub 2006 May 23).
22. Turell MJ, Beaman JR, Tammariello RF. Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) to chikungunya virus. *J Med Entomol* 1992 ; 29 : 49-53.
23. Adesina OA, Odelola HA. Ecological distribution of Chikungunya haemagglutination inhibition antibodies in human and domestic animals in Nigeria. *Trop Geogr Med* 1991 ; 43 : 271-5.
24. Konstantinov OK. Les tiques de la famille des Ixodidae comme réservoir des Arbovirus dans la République de Guinée. II. Arbovirus. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1990 ; 43 : 15-22.
25. Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, *et al.* Epidemic resurgence of Chikungunya virus in Democratic Republic of the Congo : identification of a new central African strain. *J Med Virol* 2004 ; 74 : 277-82.
26. El Mekki AA, van der Groen G. A comparison of indirect immunofluorescence and electron microscopy for the diagnosis of some haemorrhagic viruses in cell cultures. *J Virol Methods* 1981 ; 3 : 61-9.
27. Hasebe F, Parquet MC, Pandey BD, *et al.* Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2002 ; 67 : 370-4.
28. Pfeffer M, Linssen B, Parke MD, Kinney RM. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR / nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002 ; 49 : 49-54.
29. Thein S, La Lim M, Aaskov J, *et al.* Development of a simple indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin M antibody in serum from patients following an outbreak of Chikungunya virus infection in Yangon, Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992 ; 86 : 438-42.
30. Porter KR, Tan R, Istary Y, *et al.* A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia : evidence for the first outbreak since 1982. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004 ; 35 : 408-15.
31. Calisher CH, Shope RE, Brandt W, *et al.* Proposed antigenic classification of registered arboviruses I. Togaviridae, Alphavirus. *Intervirology* 1980 ; 14 : 229-32.
32. Hernandez R, Nelson S, Salm JR, Brown DT, Alpert AJ. Rapid preparative purification of West Nile and Sindbis virus PCR products utilizing a microbore anion-exchange column. *J Virol Methods* 2004 ; 120 : 141-9.
33. Bryant JE, Barrett AD. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003 ; 39 : 103-18.

LES ARBOVIROSES AFRICAINES

Emmanuel NAKOUNE-YANDOKO*, Antoine TALARMIN**

*Laboratoire des Arbovirus et Virus des Fièvres Hémorragiques, Institut Pasteur de Bangui, BP 923 République Centrafricaine et Laboratoire de Virologie, CHU de Nancy, Hôpital de BRABOIS- adultes, route de Neufchâteau, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

**Institut Pasteur de Bangui, BP 923 République Centrafricaine

INTRODUCTION

Actuellement le continent africain subit de profondes mutations écologiques et démographiques (construction de barrages, exploitation forestière, concentration de population dans les grandes métropoles) qui concourent à l'émergence ou à la ré-émergence de virus pathogènes pour l'homme et l'animal. Les arbovirus (Arthropod Borne Virus), sont des virus transmis par les arthropodes piqueurs hématophages (insectes, tiques, etc.) entre vertébrés. Ils présentent des phases de multiplication tant chez les vecteurs que chez leurs hôtes vertébrés. Plus de 500 arbovirus ou virus apparentés ont été décrits dans le monde, formant un ensemble très hétérogène du point de vue de leur taxonomie. Au moins 168 espèces différentes ont déjà été isolées en Afrique (Centre de Référence OMS de Recherche pour les Arbovirus, Dakar). Parmi eux, une quarantaine sont pathogènes pour l'homme.

A l'exception de la dengue dont le réservoir de virus est l'homme, les arboviroses sont des zoonoses : maladies d'animaux sauvages et/ou domestiques pouvant infecter l'homme chez lequel les tableaux cliniques sont variables (Tableau 1), pouvant aller de la fièvre isolée aux syndromes hémorragiques aigus gravissimes. Les infections inapparentes sont très fréquentes. Les arbovirus nécessitent pour leur transmission un arthropode. La transmission directe entre vertébrés est exceptionnelle. Une transmission verticale est possible chez l'arthropode. Les arthropodes sont des moustiques, des phlébotomes, des culicoïdes, des tiques, etc., qui demeurent infestants toute leur vie. Etant donné l'existence de réservoirs formés du couple arthropode/animal sauvage, tout changement climatique et écologique peut entraîner des modifications de l'aire d'extension de ces maladies ainsi qu'éventuellement des changements de vecteur ou d'hôte.

I. LES PRINCIPAUX ARBOVIRUS PATHOGÈNES POUR L'HOMME ET L'ANIMAL

Tous ces virus sont à ARN et enveloppés. Ils appartiennent pour la plupart à la famille des *Togaviridae* pour les *Alphavirus*, *Flaviviridae* pour les *Flavivirus* et *Bunyaviridae* pour les *Bunyavirus*.

a) *Alphavirus*

Ce sont des virus sphériques (d'environ 70 nm de diamètre),

leur enveloppe dérive d'une membrane cellulaire. Ce sont des virus à ARN simple brin de 10 à 12 kb à polarité positive.

Chikungunya virus

Il est endémo-épidémique en Afrique subsaharienne, avec la survenue de grandes épidémies (au Sénégal en 1996 et 1997 ; en République Démocratique du Congo en 1999-2000). On observe des formes hémorragiques pétéchiales mais sans hémorragie digestive ni collapsus.

O'Nyong-Nyong virus

Il a été isolé pour la première fois en 1959 en Ouganda lors d'une vaste épidémie qui s'était propagée jusqu'en République Centrafricaine (2 millions de personnes atteintes). Depuis il a fait une ré-émergence épidémique en 1996-1997 dans la même zone (Ouganda et Tanzanie) après 35 ans de silence.

b) *Flavivirus*

Ce sont des virus à ARN simple brin, enveloppés de 40 à 60 nm de diamètre. Leur ARN est de polarité positive et code pour une polyprotéine qui est secondairement clivée en donnant l'ensemble des protéines virales.

West Nile virus

Il se maintient dans la nature par transmission par les moustiques du genre *Culex* entre les oiseaux. L'Afrique constitue le foyer enzootique principal. L'homme ou le cheval sont des hôtes sensibles au virus mais ne participent pas à l'amplification biologique puisque la virémie est brève et faible. Des atteintes ont été observées depuis 1996 chez l'homme (Zeller, 1999), le cheval et les oiseaux au cours d'épidémies en Afrique du Nord, Afrique noire, Madagascar.

Wesselsbron virus

Son nom vient de la région d'Afrique du Sud où il a été identifié en 1955 pour la première fois (Weiss *et al.*, 1956). C'est un virus atteignant le bétail, transmis par les moustiques (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). Chez les ovins et les caprins (Baba *et al.*, 1989), il est responsable d'affections fébriles souvent mortelles et d'avortements.

Tableau 1 : Classification des arbovirus

Famille	Genre	Virus	Syndrome	Transmission	Incubation	Taux de mortalité	Réserveir	Répartition géographique
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya	Rash, arthralgie	<i>Aedes aegypti</i>	4-7 jours		singes	Afrique subsaharienne
		O'Nyong-Nyong	Rash, arthralgie	<i>Anopheles gambiae</i>	4-7 jours		homme	Ouganda, Tanzanie
		Semliki Forest	Fièvre nue	<i>Aedes aegypti</i>	4-7 jours		inconnu	Afrique équatoriale
		Sindbis	Fièvre nue	<i>Aedes aegypti</i>	4-7 jours		inconnu	Afrique équatoriale
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Fièvre jaune	Fièvre, ictère, Fièvre hémorragique	<i>Aedes aegypti</i>	1 semaine	15%	singes, animaux sauvages	Afrique entre 20°N et 20°S
		Dengue	Fièvre, myalgies Dengue hémorragique	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i>	2 à 7 jours	faible 5-10%	homme	Bande intertropicale Afrique de l'Est, Kenya, Tchad, Egypte Mauritanie, Madagascar, Djibouti
		West-Nile	Fièvre, encéphalite éruption	<i>Culex sp.</i>	3-7 jours		mammifères, oiseaux	Afrique équatoriale, Madagascar
		Zika	Fièvre, méningite	<i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles gambiae</i>	3-7 jours		mammifères sauvages et	Afrique subsaharienne
		Wesselsbron	Fièvre, splénomégalie	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes africanus</i>	3-7 jours		domestiques	Afrique subsaharienne
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i>	Bunyamwera	Fièvre nue	<i>Aedes aegypti</i>	4-7 jours		animaux sauvages	Afrique équatoriale, République Centrafricaine
		Ilesha	Fièvre nue	<i>Aedes aegypti</i>				
	<i>Phlebovirus</i>	Fièvre de la Vallée du Rift	Fièvre, myalgies Fièvre hémorragique	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex sp.</i>	4-8 jours		animaux domestiques	Afrique de l'Est et du Sud

Yellow fever virus (virus amaril)

Le virus *amaril* infecte des singes dans la forêt où persiste un cycle moustique-singe-moustique (cycle sylvaïque) dans lequel l'homme n'est qu'un hôte accidentel. Mais des cycles urbains, spécifiquement humains, se sont mis en place à partir de ce réservoir. L'Afrique est de loin le continent le plus touché avec 95% des cas recensés dans le monde et, d'après l'OMS, 200 000 cas et 30 000 décès enregistrés par an (Digoutte, 1999 ; Cornet *et al.*, 1977). Les épidémies, surtout à l'ouest du continent, et les cas isolés sont en régulière augmentation depuis les années 90 (Lepiniec *et al.*, 1994).

Dengue virus

Ce virus a un réservoir uniquement humain et est présent dans toute la zone intertropicale.

En Afrique, les cas de dengue causés par les quatre souches de virus ont beaucoup augmenté depuis 1980. La plupart de ces cas ont été recensés au Sénégal (Traore-Lamizana *et al.*, 1990 ; Zeller *et al.*, 1992), au Kenya (Johnson *et al.*, 1990), au Mozambique (Gubler *et al.*, 1986), au Burkina Faso (Gonzalez *et al.*, 1985), à Djibouti (Saleh *et al.*, 1985 ; Hyams *et al.*, 1986 ; Rodier *et al.*, 1995) et au Cameroun (Krippner et von Laer, 2002). Aucune épidémie de dengue hémorragique n'a été signalée en Afrique en dehors de quelques cas isolés au Mozambique et à Djibouti.

c) *Bunyavirus*

Ces virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre ont un génome constitué de 3 segments d'ARN de polarité négative avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale.

Bunyamwera, Ilesha et Batai virus

Ils sont responsables d'infections inapparentes ou bénignes s'accompagnant de céphalées. Des cas d'infections à *Bunyavirus* ont été recensés au Kenya et en Somalie (Bowen *et al.*, 2001), en Guinée (Butenko, 1996), au Soudan (Nashed *et al.*, 1993), en Ouganda (Rodhanin *et al.*, 1989), au Nigeria (Fagbami et Fabiyi, 1975), en République Centrafricaine (résultat non publié).

II. EPIDÉMIOLOGIE

Les arboviroses surviennent par bouffées épidémiques entrecoupées par des intervalles libres plus ou moins longs. Le réservoir de virus est composé par le couple animal sauvage/vecteur. Ces animaux sensibles sont surtout les rongeurs, les singes et les oiseaux. Les arthropodes hématophages (moustiques: *Culex*, *Aedes* ; *Psycodidae* ; phlébotome) s'infectent lors de leur repas sanguin. Le virus se multiplie chez le vecteur sans l'affecter. Ce dernier reste infecté et donc contaminant toute sa vie. Il transmet le virus aux animaux lors des repas suivants. L'homme peut se contaminer de deux façons :

- accidentellement par pénétration dans la région où se déroule le cycle animal-arthropode (chasseurs, forestiers),

- par déplacement du vecteur ou du réservoir (oiseaux migrateurs) soit naturellement soit à l'occasion d'une perturbation écologique (grands travaux de défrichement par exemple).

III. PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS ARBOVIRALES

A la suite de l'injection de salive lors de la piqûre d'un arthropode infestant, le vertébré réceptif va développer une infection. Tout d'abord le virus se réplique à proximité du point d'inoculation puis il gagne les ganglions lymphatiques correspondants : à partir de là, il se produit une virémie avec dissémination dans l'organisme jusqu'aux organes cibles.

IV. CLINIQUE

Il existe trois grands types de formes cliniques :

a) les états fébriles indifférenciés

- une fièvre d'apparition brutale,

- des algies intenses (céphalées, myalgies, arthralgies) avec des signes associés (photophobies, vomissements, éruptions) ;

b) les formes hémorragiques

- hépatonéphrite avec hémorragies viscérales ou muqueuses ;

c) les formes neurologiques

- elles associent des signes méningés (raideur de nuque, etc.) et des signes encéphaliques (troubles de la conscience, troubles végétatifs, troubles neurologiques périphériques).

V. DIAGNOSTIC

Le diagnostic des arboviroses est uniquement biologique. Il doit cependant être orienté par la clinique mais aussi par les conditions de survenue, le nombre de cas, l'origine géographique (Tableaux 1 et 2).

V.1. Le diagnostic virologique

V.1.1. Prélèvements

Quels que soient les tests réalisés avec les échantillons, les précautions d'asepsie sont essentielles pour éviter la contamination accidentelle du technicien.

Prélèvement sanguin

Il est réalisé à partir de sérum ou de plasma.

Pour un bon isolement viral, il faut respecter des conditions strictes:

- le prélèvement doit être effectué précocement dans les

3 jours qui suivent le début des symptômes (3 premiers jours) car la virémie diminue très rapidement ;

- il doit être conservé (sans limitation de temps) dans un congélateur à -70°C ou dans l'azote liquide (ou éventuellement dans la glace carbonique).

Liquide céphalo-rachidien

Les signes neurologiques étant souvent retardés par rapport au début de la maladie, le diagnostic virologique est peu sensible à partir de ce prélèvement.

Organes

En dehors des prélèvements de peau préconisés pour le diagnostic des fièvres hémorragiques virales, les prélèvements internes sont réalisés *post-mortem*. Les prélèvements d'organes cibles où le virus persiste après la fin de la virémie peuvent permettre un diagnostic virologique précis.

Prélèvements chez l'animal

Le diagnostic chez l'animal est utile pour la recherche d'un réservoir en cas d'épidémie importante. Dans ce cas, il peut permettre d'orienter le diagnostic d'infections humaines. Le prélèvement de sang peut être fait sur l'animal vivant (bétail en particulier) mais bien souvent il est réalisé sur l'animal mort ou en *pré-mortem* immédiat. Dans ce cas, différents organes peuvent être prélevés (cerveau, cœur, rate, foie et reins).

V.1.2. Conditionnement des échantillons

Le prélèvement doit être acheminé le plus rapidement possible vers le laboratoire. Les arboviroses survenant souvent dans des régions difficiles d'accès comme en Afrique, les délais d'acheminement peuvent être très longs. De plus, dans la plupart des cas, les formations sanitaires ne disposent pas d'équipements permettant la bonne conservation des prélèvements, c'est pourquoi le diagnostic virologique des arboviroses est rarement effectué en routine.

V.1.3. La mise en culture

Isolement du virus à partir de vertébrés (homme inclus) et invertébrés (insectes)

Les sérums sont inoculés soit sans dilution soit dilués à 1:10 dans une solution phosphatée tamponnée (pH 7,2), contenant de l'albumine bovine à 0,75% et des antibiotiques, après centrifugation (800 g, pendant 10 minutes).

Les viscères sont broyés, dilués à 10 % (p/v) dans le diluant ci-dessus puis la suspension est centrifugée comme auparavant.

Inoculation au souriceau nouveau-né

Le surnageant de chaque suspension est inoculé par voie intra-cérébrale à six souriceaux Swiss nouveau-nés (0,02

mL / animal). Les animaux sont observés régulièrement pendant deux à trois semaines. Ceux qui montrent des signes de maladie font l'objet d'un prélèvement de cerveau pour des tests immunologiques ou des inoculations.

Cultures cellulaires

Différentes lignées cellulaires continues sont utilisées pour la culture des arbovirus. Il peut s'agir de cellules de moustiques *Aedes pseudoscutellaris* (lignée AP61) ou de *Culex* (C636). Ces cellules de moustiques sont sensibles à la plupart des arbovirus. La lignée cellulaire d'origine simienne Vero E6 a l'avantage de présenter un effet cytopathogène caractéristique (lésions lytiques avec destruction plus ou moins complète du tapis cellulaire).

Identification du virus

Quel que soit le système utilisé, l'identification des virus est réalisée de manière identique. Le cerveau de souriceau est recueilli pour réaliser des empreintes sur lames. Les cellules sont déposées sur lames après observation d'un effet cytopathogène.

La révélation se fait alors au microscope à fluorescence en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques. Étant donné les nombreuses réactions croisées entre les arbovirus, les anticorps polyclonaux ne permettent qu'une approche de l'identification. Cependant, de plus en plus, l'identification des virus est obtenue par les techniques de biologie moléculaire.

V.1.4. Diagnostic des arboviroses par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Ce diagnostic peut être réalisé à partir des mêmes prélèvements que ceux utilisés pour l'isolement viral, après extraction de l'ARN et une étape de transcription inverse. Pour augmenter la sensibilité on procède en général à une PCR nichée ou semi-nichée.

Des protocoles ont été mis au point pour les principaux arbovirus. Leur sensibilité est souvent supérieure à celle de la culture. L'utilisation d'amorces spécifiques d'espèces permet en général l'identification (Tableau 2). L'emploi d'amorces spécifiques de groupe ou de sous-groupe nécessite l'analyse de la séquence amplifiée pour réaliser une identification complète. Cependant pour pouvoir développer une telle approche diagnostique, une étude exhaustive de l'ensemble des génomes d'arbovirus doit être menée.

V.1.5. Mise en évidence directe des antigènes viraux

La mise en évidence d'antigènes peut être faite directement à partir du prélèvement. Les méthodes immunoenzymatiques sont moins sensibles que les précédentes.

Tableau 2 : Diagnostic virologique des arbovirus

Genre	Virus	Prélèvement	Diagnostic spécifique	Diagnostic moléculaire	Référence
Alphavirus	Chikungunya	Sang	Sérologie, culture	CHIK/nsPI-S : tagagcaggaaatgatccc CHIK/nsPI-C : cttaaacgcctggtggtat CHIK/E1-S : tcaccattcatgtgggc CHIK/E1-C : gcccttgcaccacgatt	Hasebe <i>et al.</i> , 2002
	O'Nyong-Nyng	Sang	Sérologie, culture	Ony311c : 5'-gcacgggcagacgcagtgga-3' (nt 311-332)* Ony276 : 5'-ggcaaccagctaggagatgatgc-3' (nt 276-300)	Lancioti <i>et al.</i> , 1998
	Semliki Forest	Sang	Sérologie, culture	SFV : 5'-ggaaatattaaaaccantgcaataaata-3' (nt 11442-11410) SFV : 5'-atggcggatgtgacatacacgac-3' (nt 1-25)	White <i>et al.</i> , 1998
	Sindbis	Sang	Sérologie, culture	Sind : 5'-gcattactaccatcgccatcc-3' Sind : 5'-caaggatgacacactgg-3'	Hernandez <i>et al.</i> , 2004
Flavivirus	Fièvre jaune	sang	Sérologie, culture	YFVs : 5'-ctgtcccaatctcagtc-3' non codante 3' YFVs : 5'-atgcttccttccaant-3' EMF : 5'-tggatgacsackgargyatg-3' (s=c,g; k=g,t; r=a,g; y=c,t) VD8 : 5'-gggtctctctaacctag-3'	Bryant <i>et al.</i> , 2003
	Dengue	Sang	Sérologie, culture	DV1 (+) : 5'-ggactcaggwtccc-3' DSP1 (-) : 5'-agttcttcttaaacactcg-3' (nt 5067-5045) DSP2 (-) : 5'-ccgggtgctcrgcyctgat-3' (nt 5278-5260) DSP3 (-) : 5'-tagagtyctaaegctcttg-3' (nt 5174-5152) DSP4 (-) : 5'-cctggtgatgacaaagcttg-3' (nt 5342-5320)	Seah <i>et al.</i> , 1995
	West-Nile	Sang	Sérologie, culture	WN : 5'-ggatgctggtggatgggc-3' WN : 5'-gactcggcggcggctcagtg-3'	Hernandez <i>et al.</i> , 2004
	Zika	Sang	Sérologie, culture	Non décrit	
	Wesselsbron	Sang	Sérologie, culture	Non décrit	
Bunyavirus	Bunyawera	sang	Sérologie, culture	Segment (S) : BUNS957R (5'-ccclaccaccaacc-3') I = inosine BUNS274C (5'-cttaac(eA)tggaggctgga-3') Segment (M) : M14C (5'-cggaaicagatgactacc-3') M619R (5'-gacatag(cA)tgattgaagcaagcatg-3') Segment (L) : M13CBUNLC (5'-gtaaacgacggcagtagtactcct-3') BUNL605R (5'-agtgaatcctcagtc-3'); I = inosine	Bowen <i>et al.</i> , 2001

* nt = nucléotide

V.2. Diagnostic indirect

C'est le diagnostic le plus souvent pratiqué. La sérologie est sensible et spécifique. Les IgM sont détectées entre quatre et huit jours après le début des symptômes. Ce sont des méthodes par immunocapture. Les antigènes utilisés pour la révélation sont préparés à partir de surnageants de culture cellulaire.

V.2.1. Détection des anticorps totaux

La recherche des anticorps totaux peut se faire par méthode immunoenzymatique, par immunofluorescence indirecte ou encore par inhibition de l'hémagglutination. Elle est utile pour des enquêtes séro-épidémiologiques. Pour le diagnostic, seule la comparaison du titre d'IgG sur deux sérums (un précoce, et un tardif) peut permettre, en cas de séroconversion, de conclure à une infection récente.

V.2.2. Immunofluorescence (IF)

L'usage de l'IF comme test diagnostique ou lors d'enquêtes séro-épidémiologiques est très utile mais il tend à être abandonné au profit des méthodes immunoenzymatiques.

VI. PRÉVENTION ET TRAITEMENT

1) Traitement symptomatique

En cas de syndrome fébrile, des traitements antipyrétiques et antalgiques suffisent. Les signes de gravité imposent l'hospitalisation en soins intensifs (perfusion, transfusion, alimentation entérale ou parentérale).

2) Prophylaxie

La prévention des arboviroses par la lutte contre le réservoir est presque impossible puisque, pour la plupart des virus, c'est un réservoir sauvage difficilement accessible.

Les moustiquaires ne sont efficaces que sur les vecteurs à activité nocturne, et elles n'empêchent pas les piqûres d'*Aedes aegypti* qui ont une activité au crépuscule. Elles permettent cependant de protéger les nourrissons.

La protection par la vaccination n'est disponible que pour quelques arboviroses : fièvre jaune, virus de l'encéphalite japonaise ou de l'encéphalite à tiques (ces deux dernières ne sont pas présentes en Afrique).

CONCLUSION

Les arboviroses sont pour la plupart des zoonoses sévissant surtout dans les régions intertropicales. Cependant les changements climatiques, les déplacements de populations provoquent la modification de leur répartition géographique. Les connaissances acquises sont en constante augmentation mais de nombreux travaux pour améliorer leur prise en charge thérapeutique et leur prévention sont encore à effectuer. La vaccination représente en particulier l'espoir principal pour lutter contre les infections les plus

graves et les plus fréquentes (la dengue par exemple) du fait des échecs de la lutte antivectorielle et de la difficulté de prise en charge des formes graves de ces maladies.

RÉFÉRENCES

- Baba S.S., Fagmani A.H., Omilabu S.A. (1989). Wesselsbron virus infection in West Africa dwarf goats (Fouta Djallon) : virological and immunological studies. *Acta Virol*, **33**, 81-86.
- Bowen M.D., Trappier S.G., Sanchez A.J., Meyer R.F., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Dunster L.M., Ksiazek T.G., Nichol S.T., RVF Task Force (2001). A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*, **291**(2), 185-190.
- Bryant J.E., Barrett A.D. (2003). Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. *Immunol.Med.Microbiol.*, **39**(2), 103-118.
- Butenko A.M. (1996). Arbovirus circulation in the Republic of Guinea. *Med. Parazitol. (Mosk)*, **2**, 40-45.
- Cornet M., Jan C., Coz J. (1977). Place de l'homme dans les cycles épidémiologiques de la fièvre jaune en Afrique de l'Ouest. *Méd. Trop.*, **37**, 265-268.
- Digoutte J.-P. (1999). Une arbovirose d'actualité : la fièvre jaune, son histoire naturelle face à une fièvre hémorragique, la fièvre de la vallée du Rift. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **92**, 343-348.
- Fagbami A.H., Fabiyi A. (1975). A survey for Ilesha Bunyamwera group virus antibodies in sera from domestic animals and humans in three ecological zones of Nigeria. *Virologie*, **26**, 27.
- Gonzalez J.P., Du Saussay C., Gautun J.C., McCormick J.B., Mouchet J. (1985). La dengue en Haute-Volta. Épidémies saisonnières en milieu urbain à Ouagadougou. *Bull. Soc. Path. Exot. Filiales*, **78**, 7-14.
- Gubler D.J., Sather G.E., Kuno G., Cabral J.R. (1986). Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 1280-1284.
- Hasebe F., Parquet M.C., Pandey B.D., Mathenge E.G., Morita K., Balasubramaniam V., Saat Z., Yusop A., Sinniah M., Natkunam S., Igarashi A. (2002). Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J.Med.Virol.*, **67**(3), 370-374.
- Hernandez R., Nelson S., Salm J.R., Brown D.T., Alpert A.J. (2004). Rapid preparative purification of West Nile and Sindbis virus PCR products utilizing a microbore anion-exchange column. *J.Virol.Methods*, **120**(2), 141-149.
- Hyams K.C., Oldfield E.C., Scott R.M., Bourgeois A.L., Gardiner H., Pazzaglia G., Moussa M., Saleh A.S., Dawi O.E., Daniell F.D. (1986). Evaluation of febrile patients in Port Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 860-865.
- Johnson B.K., Okoth F., Tukey P.M., Mugambi M., Woody J.N., Morrill J.C., Hyams K.C. (1990). Dengue-2 virus in Kenya. *Lancet*, **336**, 1071.
- Krippner R., von Laer G. (2002). First confirmed dengue-1 fever cases reported from Cameroon. *J. Travel Med.*, **9**, 273-274.
- Lanciotti R.S., Ludwig M.L., Rwiguma E.B., Lutwama

- J.J., Kram T.M., Karabatsos N., Cropp B.C., Miller B.R. (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology*, **252**(1), 258-268.
- Lepiniec L., Dalgarno L., Huong V.T.Q., Monath T.P., Digoutte J.-P., Deubel V. (1994). Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J. Gen. Virol.*, **75**, 417-423.
- Nashed N.W., Olson J.G., el-Tigani A. (1993). Isolation of Batai (Bunyaviridae: Bunyavirus) from the blood of suspected malaria patients in Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48**, 676-680.
- Rodhanin F., Gonzalez J.P., Mercier E., Helyncck B., Larouze B., Honnoun C. (1989). Arbovirus infections and viral haemorrhagic fevers in Uganda: a serological survey in Karamoja district, 1984. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **83**, 851-854.
- Rodier G.R., Parra J.P., Kamil M., Chakib S.O., Cope S.E. (1995). Recurrence and emergence of infectious diseases in Djibouti city. *Bull. World Health Organ.*, **73**, 755-759.
- Saleh A.S., Hassan A., Scott R.M., Mellick P.W., Oldfield E.C. 3rd, Podgore J.K. (1985). Dengue in north-east Africa. *Lancet*, **II**, 211-212.
- Seah C.L., Chow V.T., Tan H.C., Can Y.C. (1995). Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J. Virol. Methods.*, **51** (2-3), 193-200.
- Traore-Lamizana M., Zeller H., Monlun E., Mondo M., Hervy J.P., Adam F., Digoutte J.P. (1990). Dengue 2 outbreak in southeastern Senegal during 1990: virus isolations from mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, **31**, 623-627.
- Weiss K.E., Haig D.A., Alexander R.A. (1956). Wesselsbron virus: a virus previously described, associated with abortion in domestic animals. *Onderstepoort J. Vet Res.*, **27**, 183-195.
- White C.L., Thomson M., Dimmock N.J. (1998). Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J. Virol.*, **72** (5), 4320-4326.
- Zeller H.G. (1999). West-Nile: une arbovirose migrante d'actualité. *Med. Trop.*, **59**, 201-204.
- Zeller H.G., Traore-Lamizana M., Monlun E., Hervy J.P., Mondo M., Digoutte J.P. (1992). Dengue-2 virus isolation from humans during an epizootic in southeastern Senegal in November, 1990. *Res. Virol.*, **143**, 101-102.

ANNEXES 2
SEQUENCES DEPOSEES

Date: Fri, 11 May 2007 09:41:23 +0100
De: "EMBL Nucleotide Sequence Database" <datasubs@ebi.ac.uk>
À: ENAKOUNE@YAHOO.FR
Objet: RE: Your submission - Our ref: DS69221/163449/Nakoune Yandoko

Dear Colleague,

Thank you for your submission to the Nucleotide Sequence Database.
These data have been assigned the accession number(s) listed below.

We suggest you cite these numbers when referring to the corresponding
sequences
in publications or in communications to us.

Enclosed is a copy of each of your entries as listed below.

Please check the entry(ies) carefully and report any errors using our
WWW
update form at URL <http://www.ebi.ac.uk/embl/webin/update.html>

YOU MUST USE THE UPDATE FORM TO REPORT ERRORS. DO NOT EDIT THIS MESSAGE
AND
RETURN TO US, WE ARE UNABLE TO PROCESS UPDATES RECEIVED IN THIS WAY.

If you do not have access to the WWW please e-mail our database staff
at
update@ebi.ac.uk to request an update form. We do not accept updates
sent by
disk or surface mail.

If this data is to be published, it is important that you contact us
with
complete citation information at the time of publication, as this is
the only way that we can guarantee timely reflection of the publication
status in your entry.

Please keep us informed in the future about any new data relevant to
Your sequence such as: additional features, corrections to the sequence
itself or citation details.

WebIn - EMBL WWW Submission System

Please submit nucleotide sequence data and associated biological
Information to the EMBL Nucleotide Sequence Database using WebIn the EMBL
WWW submission system at <http://www.ebi.ac.uk/submission/webin.html>

The quickest way to get your data processed is to use WebIn.
Processing of your submission may be delayed if you submit sequences
Using Sequin. Submissions made using the Email submission form are no
longer accepted.

If you have any queries please do not hesitate to contact us at the
Following address:

E-mail: datasubs@ebi.ac.uk
Tel: +44-1223-494499
Fax: +44-1223-494472

Yours sincerely,

EMBL Nucleotide Sequence Database

Accession No(s):

Accession#: AM711130
Status: not confidential
Description: Bunyamwera virus segment S, complete sequence, strain ArB28215

Accession#: AM711131
Status: not confidential
Description: Birao virus segment S, complete sequence, strain ArB2198

Accession#: AM711132
Status: not confidential
Description: Bozo virus segment S, complete sequence, strain ArB13529

Accession#: AM711133
Status: not confidential
Description: M'Poko virus segment S, complete sequence, strain ArB365

Accession#: AM711134
Status: not confidential
Description: Nola virus segment S, complete sequence, strain ArB2882

Accession#: AM709778
Status: not confidential
Description: Bunyamwera virus segment S, complete sequence, strain ArB29051

Accession#: AM709779
Status: not confidential
Description: Ilesha virus segment S, complete sequence, strain HB80P125

Accession#: AM709780
Status: not confidential
Description: Ilesha virus segment S, complete sequence, strain ArB16282

Accession#: AM709781
Status: not confidential
Description: Nyando virus segment S, complete sequence, strain ArB16055

Accession#: AM709782
Status: not confidential
Description: Ingwavuma virus segment S, complete sequence, strain ArB2633d

EBI Dbfetch

ID AM711130; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 956 BP.
XX
AC AM711130;
XX
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Bunyamwera virus segment S, complete sequence, strain ArB28215
XX
KW gp1 gene; nucleocapsid protein.
XX
OS Bunyamwera virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-956
RA Nakoune Yandoko E.D.R.;
RT ;
RL Submitted (23-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Nakoune Yandoko E.D.R., Central Africa, Institut Pasteur De
Bangui, 923,
RL CAR/923/236, CENTRAL AFRICAN REPUBLIC.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A., Rihn B.H.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:0-0(2007).
XX
RN [3]
RA Nakoune Yandoko E.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL Thesis (2007), Department of Medical School, Nancy University,
Nancy,
RL France.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..956
FT /organism="Bunyamwera virus"
FT /segment="S"
FT /strain="ArB28215"
FT /isolate="08-08-1992"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bozo"
FT /isolation_source="Anopheles sp."
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="29-Aug-1991"
FT /identified_by="C. Mathiot"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT cttacacyyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:35304](#)"
FT [CDS](#) 83..784
FT /gene="gp1"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM97975.1](#)"

FT
/translation="MIELEFNDVAVNTSSSFDPEAAYANFKRVHTTGLSYDHIRIFYIK
FT
GREIKVSLSKRSEWEVTINLGGWKIAVYNTNFPGNRNSPVPDDGLTLHRLSGFLARFLL
FT
EKMLKMSEPEKLIKAKIINPLAEKNRITWNDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFKIFYPLAIG
FT
IYKVQRKEMEPKYFEKTMRQRYMGLEASSWTVSKLTDVQSALTVVSGLGWKKTNVSAAA
FT
RDFLAKFGINM"

XX

SQ Sequence 956 BP; 313 A; 173 C; 211 G; 259 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttgcca ttgatgagga atattgagca aaaaggagag
60 gagagtattt gagatccctt aaatgattga gttggaattt aatgatgtcg ctgttaacac
120 cagcagttct tttgaccagc aggcagcaca cgctaacttt aagcgtgtcc acaccactgg
180 gcttagttac gaccacatac gaatcttcta cattaaaggg agagagatta aagttagtct
240 ctcaaaaaga agtgaatggg aagttacaat taaccttggg ggctggaaga ttgctgtata
300 taatacgaat tttcctggca acaggaacag cccagttcct gacgatggtc ttacctcca
360 ccgcctcagt ggattccttg ccagggttctt acttgagaag atgctgaaaa tgagtgaacc
420 agaaaaatta attataaagg caaaaataat caaccactg gctgaaaaaa ataggatcac
480 ctggaatgat ggtgaagagg tttacctgct tttcttcctt ggctcagaaa tgttcctagg
540 tacatttaaa ttctacccat tggcaattgg gatttataaa gtgcaaagga aagaaatgga
600 accgaaatat tttgaaaaaa ctatgaggca gaggtacatg ggccttgaag catcaagctg
660 gacagtgagc aaattaactg atgttcaatc agcacttaca gttgtttctg gcttaggctg
720 gaagaaaacc aacgtgagcg ctgcagccag agacttcctg gctaaatttg gcatcaatat
780 gtaatttggg aatttgaatt aatctggcaa acatttttaa atttaacag gctaaatgtg
840 ggtttttaac ccacaaaata acagcatctt ggggtgggtg ttgcggacca aaaaaccatt
900 ggaagttcat tcaacattct gatttgggat ataagtttta ggtggagcac actact
956
//

EBI Dbfetch

```
ID   AM711131; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 894 BP.
XX
AC   AM711131;
XX
DT   11-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT   11-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE   Birao virus segment S, complete sequence, strain ArB2198
XX
KW   gp1 gene; nucleocapsid protein.
XX
OS   Birao virus
OC   Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN   [1]
RP   1-894
RA   Nakoune Yandoko E.D.R.;
RT   ;
RL   Submitted (23-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL   Nakoune Yandoko E.D.R., Central Africa, Institut Pasteur De
Bangu, 923,
RL   CAR/923/236, CENTRAL AFRICAN REPUBLIC.
XX
RN   [2]
RA   Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A., Rihn B.H.;
RT   "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL   J. Gen. Virol. 88:0-0(2007).
XX
RN   [3]
RA   Nakoune Yandoko E.;
RT   "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL   Thesis (2007), Department of Medical School, Nancy University,
Nancy,
RL   France.
XX
FH   Key          Location/Qualifiers
FH
FT   source      1..894
FT                  /organism="Birao virus"
FT                  /segment="S"
FT                  /strain="ArB2198"
FT                  /isolate="18-08-1969"
FT                  /mol_type="genomic RNA"
FT                  /country="Central African Republic: Birao"
FT                  /isolation_source="Anopheles sp."
FT                  /collected_by="JP Digoutte"
FT                  /collection_date="03-Sep-1969"
FT                  /identified_by="JP Digoute"
FT                  /virion
FT                  /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT                  cttacacyytgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT                  ccccnaccaccacc"
FT                  /db_xref="taxon:273358"
FT   CDS        86..787
FT                  /gene="gp1"
FT                  /product="nucleocapsid protein"
FT                  /protein_id="CAM97976.1"
```

FT
/translation="MIELEFHVAANTSSTFDPEVAYANFKRIHTNGLSYDNIRIFYIK
FT
GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKVAVYNTNFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGFLARYLL
FT
EKMLKVSEPEKLIKTKIINPLAEKNGITWKDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFKIFYPLAIG
FT
IYKVQKKEMDPKYLEKTMQRQYMGLEASTWTVSKVSEVQSALTVVSSLGWKKTNTVAAA
FT
RDFFAKFGINM"

XX
SQ Sequence 894 BP; 291 A; 173 C; 194 G; 236 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttgcta ttggtgaaaa tcgctgtgct attaaatcca
60
acagaaggct attaaaggct ctttaatgat tgagttggaa tttcatcatg tcgctgctaa
120
caccagcagt acttttgacc cagaggctgc atatgctaac ttaagcgta tccacaccaa
180
tgggcttagt tatgacaaca tacgaatctt ctacattaa ggacgcgaga ttaaaactag
240
tctcgcaaag agaagtgaat gggagggttac acttaacctt gggggctgga aggttgctgt
300
atacaatagc aattttctctg gcaaccggaa caaccagtt cctgacgatg gtcttacct
360
ccaccgcctc agtggattcc ttgccaggta tctacttgaa aaaatgctga aagttagtga
420
accagagaaa ttgattatta agacaaaaat aataaatcca ttggctgaaa aaaatggcat
480
cacatggaaa gacggagaag aagtttactt atctttcttc ccggggctcag aaatgttctt
540
aggaactttc aaattctacc cacttgcaat cggcatctac aaggttcaaa agaaggaaat
600
ggatccaaaa tatctggaaa agacaatgcg gcagcgctat atggggtag aagcatccac
660
ttggacagtt agtaaagtct cagaagttca gagtgcttta acagttgtct caagcttagg
720
ctggaagaaa accaacgta ctgctgcagc tcgggacttc tttgctaaat tcggaataaa
780
catgtaaaca ggttttagtta ttgaatctgg ctaaaaattt ctactttaa ttggcaaaaa
840
gggcaatagc aaccacaaca atagcagctg cttgggtggg tgtgtgggga caga
894
//

EBI Dbfetch

ID AM711132; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 961 BP.
XX
AC AM711132;
XX
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Bozo virus segment S, complete sequence, strain ArB13529
XX
KW gp1 gene; nucleocapsid protein.
XX
OS Bozo virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-961
RA Nakoune Yandoko E.D.R.;
RT ;
RL Submitted (23-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Nakoune Yandoko E.D.R., Central Africa, Institut Pasteur De
Bangui, 923,
RL CAR/923/236, CENTRAL AFRICAN REPUBLIC.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A., Rihn B.H.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:0-0(2007).
XX
RN [3]
RA Nakoune Yandoko E.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL Thesis (2007), Department of Medical School, Nancy University,
Nancy,
RL France.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..961
FT /organism="Bozo virus"
FT /segment="S"
FT /strain="ArB13529"
FT /isolate="Feb-1980"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bozo"
FT /isolation_source="Anopheles sp."
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="Nov-1979"
FT /identified_by="JP Digoute"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:273349](#)"
FT [CDS](#) 86..787
FT /gene="gp1"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM97977.1](#)"

FT
/translation="MIELEFNDVAANTSSTFDPEAAYANFKRVHTTGLTYDHIRIFYIK
FT
GSEIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKITVYNTNFPGNRNNPSPDDGLTLHFHFCGFLAKSLL
FT
EKMLKVSAPKLI I KSKITSPLAEKNGITWNDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFHFYPLPIG
FT
IYQGLRRDLEPKYFGKTLRLMYMGLEASSWTVSKLTEGQSALTVVSGLGWKKTNVSAAA
FT
RDFLAKFGINM"

XX

SQ Sequence 961 BP; 293 A; 190 C; 214 G; 264 T; 0 other;
agtagtgtac tccacactac aaacttgcta ttggtgaaaa atgcgaatct actagagaca
60 agagaagtga atttgaggct cccaatgat tgagttggaa ttaaatgatg tcgctgctaa
120 caccagcagt acttttgacc cagaggcagc atacgctaac ttaagcgtg tccacaccac
180 tgggcttact tatgaccaca tacgaatcct ctacattaa gggagcgaga ttaaaactag
240 tctcgcaaaa agaagtgaat ggaagttac acttaacctt gggggctgga agattactgt
300 atataatacg aattttcctg gcaaccggaa caaccgaagt cctgacgatg gtcttacctt
360 ccacttcttt tgtggattcc ttgccaagtc cttacttgaa aagatgctga aggtcagtg
420 accggagaaa ttgattataa aatcaaaaat aaccagccct ttggctgaaa agaattggat
480 cacttggaat gatggagagg aggtttatct ctctttcttc cctggctcag agatgttctt
540 aggtacattt catttctacc ctttgccaat tggaatctac caagggtcc gcagagactt
600 ggaacaaaa tactttgga aaactgag gctgatgtac atgggactag aagcatcatc
660 ctggactgtg agtaaattga ctgaaggga gtctgcactg acagttgtct ctggcttagg
720 ctggaagaaa accaatgtta gtgctgcagc cagagacttc ctggctaagt ttggcatcaa
780 catgtaagta tggacacttt ttaaatctgg caaaattcta caatcttaat caggctaaaa
840 gggtttttaa acccaacaaa ataacagcat attgggtggg tggttgggga cagaaagaca
900 atgggttcat tcaacatttt gattttaatg gatataaag ttttaggtgg agcactac
960
t
961
//

EBI Dbfetch

ID AM711133; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 955 BP.
XX
AC AM711133;
XX
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 11-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE M'Poko virus segment S, complete sequence, strain ArB365
XX
KW gpl gene; nucleocapsid protein.
XX
OS M'Poko virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-955
RA Nakoune Yandoko E.D.R.;
RT ;
RL Submitted (23-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Nakoune Yandoko E.D.R., Central Africa, Institut Pasteur De
Bangui, 923,
RL CAR/923/236, CENTRAL AFRICAN REPUBLIC.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A., Rihn B.H.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:0-0(2007).
XX
RN [3]
RA Nakoune Yandoko E.;
RT "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL Thesis (2007), Department of Medical School, Nancy University,
Nancy,
RL France.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..955
FT /organism="M'Poko virus"
FT /segment="S"
FT /strain="ArB365"
FT /isolate="23-10-1968"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Ouango"
FT /isolation_source="Anopheles sp."
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="17-Oct-1968"
FT /identified_by="JP Digoute"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT cttacacyyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:442712](#)"
FT [CDS](#) 86..808
FT /transl_table=[1](#)
FT /gene="gpl"
FT /product="nucleocapsid protein"

```

FT                               /protein_id="CAM97978.1"
FT
FT /translation="MIEVEFHADVADKSSTYDPEVAYAKQKRVHTTGLSYDHIRILYKRR
FT
FT KNKTSPTKTTEWERTVKLGDGKNTADKTNFPGNSKNPGTDDGPTPNRLRKTLPYLLKK
FT
FT KMKVSEPEKLI IKS KISNQGAEKNGINGKDGEEINNSFIPGTEMFLGTFRVYPLAIGIY
FT
FT KVKSKEREPKYLEKTKRQRNMGQKAANWTVSKWTEVQSALTVVSSLGWKKTNVSAAARD
FT                               FLAKFGINIKAGMHFESS"
XX
SQ   Sequence 955 BP; 363 A; 194 C; 210 G; 188 T; 0 other;
    agtagtgtac tccacactac aaacttgcta ttggtgaaaa tcgctgtgct agtaaatcca
60
    aaagaaactc attaaagcaa ccttaatgat agaggtggaa tttcatgatg tcgctgataa
120
    gagcagtact tatgaccagc aggtcgcata cgcaaaacaa aagcgtgtcc acaccactgg
180
    gcttagttat gaccacatac gaatcctcta caaaagacgc aaaaacaaaa ccagtccaac
240
    aaaaacaaca gaatgggaac gaacagtcaa acttggggac ggaagaaca cagcagacaa
300
    aacgaatttt ccgggcaaca gcaaaaaccc aggaaccgac gatgggtcca ccccaaccg
360
    cctcaggaaa acccttccca ggtacctact aaagaaaaag atgaaagtca gtgaaccaga
420
    gaaattgatt attaaatcaa aaataagcaa ccaaggggct gaaaagaatg ggatcaatgg
480
    gaaagatgga gaggaaataa ataactcttt catcccagga acagagatgt tcttaggaac
540
    tttcagagtc tacccttag caatcggaat ctacaaagtt aagagcaaag aaaggggaacc
600
    aaaatacctt gagaaaacaa aaaggcagag aaacatggga caaaaagcag caaattggac
660
    tgtagtaaaa tggacagaag ttcagtctgc actgacagtt gtctctagct taggctggaa
720
    gaaaaccaac gttagtgcag ctgccagga cttccttgct aaattcggaa tcaacattaa
780
    agcagggatg cattttgaat cgagctaaag tcatctgttt taatttggtt aaaagggtag
840
    gttcaacca caaaataaca gccgcttggg tgggtgattg gggacagaaa gacaccgggc
900
    taaatcaaca gtaaaccgtc aatggtatgt caagttgaag gtggagcaca ctact
955
//

```

EBI Dbfetch

```
ID    AM711134; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 961 BP.
XX
AC    AM711134;
XX
DT    11-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT    11-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE    Nola virus segment S, complete sequence, strain ArB2882
XX
KW    gpl gene; nucleocapsid protein.
XX
OS    Nola virus
OC    Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN    [1]
RP    1-961
RA    Nakoune Yandoko E.D.R.;
RT    ;
RL    Submitted (23-APR-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL    Nakoune Yandoko E.D.R., Central Africa, Institut Pasteur De
Bangui, 923,
RL    CAR/923/236, CENTRAL AFRICAN REPUBLIC.
XX
RN    [2]
RA    Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A., Rihn B.H.;
RT    "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL    J. Gen. Virol. 88:0-0(2007).
XX
RN    [3]
RA    Nakoune Yandoko E.;
RT    "Molecular Characterization of African Orthobunyaviruses";
RL    Thesis (2007), Department of Medical School, Nancy University,
Nancy,
RL    France.
XX
FH    Key          Location/Qualifiers
FH
FT    source      1..961
FT                /organism="Nola virus"
FT                /segment="S"
FT                /strain="ArB2882"
FT                /isolate="29-07-1970"
FT                /mol_type="genomic RNA"
FT                /country="Central African Republic:Nola"
FT                /isolation_source="Anopheles sp."
FT                /collected_by="JP Digoutte"
FT                /identified_by="JP Digoute"
FT                /virion
FT                /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT                ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT                ccccnaccaccacc"
FT                /db_xref="taxon:442713"
FT    CDS        86..787
FT                /transl_table=1
FT                /gene="gpl"
FT                /product="nucleocapsid protein"
FT                /protein_id="CAM97979.1"
```

FT
/translation="MIELEFHDVAANTSSTFDPEVAYANFKRIHTTGLSYDNIRIFYIK
FT
GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKITVYNTNFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGFLARYLL
FT
EKMLKVSEPEKLIKTKIINPLAEKNGITWKDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFKIFYPLAIG
FT
IYKVQRKEMEPKYLEKTMQRQRYMGLEASTWTVSKLTEVQSALTVVSGLGWKKTNSAAA
FT
REFFAKFGINM"

XX

SQ Sequence 961 BP; 310 A; 190 C; 207 G; 254 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttgcta ttggtgaaaa tcgctgggct attaaagcaa
60 tcagctgggc attaatgcc ctttaatgat agagttggaa tttcatgatg tcgctgctaa
120 caccagcagt acttttgacc cagaggtcgc atatgctaac ttaagcgta tccacaccac
180 tgggcttagt tatgacaaca tacgaatcct ctacattaaa ggacgcgaga ttaaaactag
240 tctcgcaaag agaagtgaat gggagggttac acttaacctt gggggctgga agattactgt
300 atataatagc aattttcctg gcaaccggaa caaccagtt cctgacgacg gtcttacctt
360 ccaccgcctc agtggattcc ttgccaggta tctacttgag aaaatgctga aagttagtga
420 accagaaaaa ttgattataa aaacaaaaat aataaaccca ttggctgaaa aaaatggcat
480 aacttgaaaa gatggagagg aagtttactt atcattcttc ccgggttcag aaatgttctt
540 aggaactttc aaattctacc cactagcaat tggcatctac aaggttcaac ggaaagaaat
600 ggaacaaaaa tatctggaaa agacaatgcg gcagcgggat atggggctag aagcatcaac
660 ttggactggt agcaaatga cagaagttca gtctgcatta acagttgtct caggcttagg
720 ctggaagaaa accaacgtta gtgctgctgc ccgtgaattc tttgctaaat tcggaataaa
780 catgtaaaaa agtgagcata ttgaatctgg ctaaaaacat ctacttgaat ttggcaaaaa
840 gggcaatttc accccacatt ctagcagctt ttaggggtgg tggttgggga cagacggaca
900 gctggctaaa tcaccattat ccggttacca gtattttaag ttttaggtgg agcacactac
960
t
961
//

EBI Dbfetch

ID AM709778; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 961 BP.
XX
AC AM709778;
XX
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Bunyamwera virus S segment, complete sequence, genomic RNA, strain
ArB29051
XX
KW complete viral segment; nucleocapsid protein; sSgpl gene.
XX
OS Bunyamwera virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-961
RA Rihn B.H.;
RT ;
RL Submitted (02-MAY-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Rihn B.H., Meurthe et Moselle, CHU de Nancy Brabois and INSERM 525,
30 Rue
RL Lionnois, 54003 Nancy, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A.E., Rihn B.H.;
RT "Molecular characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:1761-1766(2007).
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..961
FT /organism="Bunyamwera virus"
FT /segment="S"
FT /specific_host="Mansonia uniformis"
FT /strain="ArB29051"
FT /isolate="12-09-94"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Kolongo"
FT /collected_by="Jean Vincent"
FT /collection_date="08-Sep-1994"
FT /identified_by="Jean Vincent"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT cttacyyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT cccnaccaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:35304](#)"
FT [CDS](#) 86..787
FT /gene="sSgpl"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM98679.1](#)"
FT
FT /translation="MIELEFHDVAANTSSTFDPEVAYANFKRVHTTGLSYDHIRIFYIK
FT GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKITVYNTNFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGFLARYLL
FT EKMLKLSEPEKLIISKIINPLAEKNGITWNDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFRFYPLAIG

FT
IYKVQRKEMEPKYLEKTMRQRYMGLEAATWTVSKLTEVQSALTVVSSLGWKKTINVSA
FT RDFLAKFGINM"
XX
SQ Sequence 961 BP; 308 A; 187 C; 207 G; 259 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttgcta ttgttgaaaa tcgctgtgct atcaaattta
60 acagaaagtc attaaaggct ctttaatgat tgagttagaa tttcatgatg tcgctgctaa
120 caccagcagt acttttgacc cagaggctgc atacgctaac ttttaagcgtg tccacaccac
180 tgggcttagt tatgaccaca tacgaatcct ctacattaa ggacgcgaga ttaaaactag
240 tctcgcaaaa agaagtgaat ggggaagttac acttaacctt gggggctgga agattactgt
300 atataatagc aattttcctg gcaaccgga caaccagtt cctgacgatg gtcttacctt
360 ccaccgcctc agtggattcc ttgccaggta cctacttgag aagatgctaa aactcagtga
420 accagaaaaa ttgatcatca aatcaaaaat aatcaatcca ttggctgaaa aaaatgggat
480 cacttggaat gatggggagg aagtttatct ctcctttttc ccaggatcag aaatgttcct
540 aggaactttc agattctacc cottagcaat tgggatctac aaagtccagc gcaaggaaat
600 ggaaccgaaa taccttgaaa agacaatgcg gcagaggtac atgggactag aagcagcaac
660 ttggactggt agtaaattga cagaagttca gtctgcactg acagttgtct ccagcttggg
720 ttggaagaaa actaatgtta gtgcagctgc cagggacttc cttgctaaat ttggaattaa
780 catgtaagca ggaagcatt tctaactcggg ctaaaatcat cagttttaat ttggctaaaa
840 gggttgtttc aaccacaaaa ataacagctg tttgggtggg tggttgggga cagaaagaca
900 gcggactaaa ttaacattac attattaata gtattttaag ttttaggtgg agcacactac
960
t
961
//

EBI Dbfetch

ID AM709779; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 961 BP.
XX
AC AM709779;
XX
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Ilesha virus S segment, complete sequence, genomic RNA, strain
HB80P125
XX
KW complete viral segment; nucleocapsid protein; sSgpl gene.
XX
OS Ilesha virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-961
RA Rihn B.H.;
RT ;
RL Submitted (02-MAY-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Rihn B.H., Meurthe et Moselle, CHU de Nancy Brabois and INSERM
525, 30 Rue
RL Lionnois, 54003 Nancy, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A.E., Rihn B.H.;
RT "Molecular characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:1761-1766(2007).
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..961
FT /organism="Ilesha virus"
FT /segment="S"
FT /specific_host="human"
FT /strain="HB80P125"
FT /isolate="26-11-80"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bangui"
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="19-Nov-1980"
FT /identified_by="JP Digoutte"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:273341](#)"
FT [CDS](#) 86..787
FT /gene="sSgpl"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM98680.1](#)"
FT
FT /translation="MIELEFHDVTANTSSTFDPEVAYANFKRIHTNGLNYDHIRIFYIK
FT
FT GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKIAVYNTNFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGYLARCLL
FT
FT EKMLKVSEPEKQIIKSKIINPLAEKNGITWDDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFRFYPLAIG

FT
IYKVQRKEMEPKYLEKTMRQRYMGLEASTWTISKLAEVQSALTVVSGLGWKKTNVSAAA
FT
RDFLAKFGINM"

XX
SQ Sequence 961 BP; 319 A; 198 C; 198 G; 246 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac acacttgcta ttgctgaaaa ttattatgac atctattcca
60
atagaagatc atcttgaact ctttaatgat tgaattagag tttcatgatg tcaactgctaa
120
caccagcagt acttttgacc cagaggctgc atacgctaac ttaagcgta tccacaccaa
180
tgggcttaac tacgaccaca tacgaatctt ctacattaaa ggacgcgaga ttaaaactag
240
tctcgcaaaa agaagtgaat gggagggttac acttaacctt gggggctgga agattgccgt
300
atataatacg aattttctctg gcaaccggaa caaccagtt cctgacgatg gtctaaccct
360
ccaccgcctc agtggatacc ttgccagggtg cctacttgag aagatgctaa aagtcagtga
420
accgaaaaaa caaattatca aatcaaaaat tattaacca ttggcagaaa aaaacggaat
480
aacttgggat gatggtgaag aagtttactt atctttcttc cctggttctg agatggttctt
540
agggactttt agattctacc cattggcaat tggaaatctac aaagtccaac gcaaagagat
600
ggaaccgaaa taccttgaaa aaacaatgag acaaagatac atgggcttgg aagcatcaac
660
ctggaccatc agcaaattgg cagaagtaca atcagcctta acagtgggtct ctggcttggg
720
ctggaagaaa actaatgtta gtgctgcagc tagagacttc cttgctaaat ttggaatcaa
780
catgtaagca gaaaaacaat ttcaatcggg tgaaaattca aaaataaaat ttggctaaaa
840
gggttgggtc aaccgcgaaa ataacaggtt attgggtggg tgggtgggga caggaaaaca
900
gccagcttcc ccttccataa cttcttccat gtctcccgag gttaaagtgg aaactacatc
960
g
961
//

EBI Dbfetch

ID AM709780; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 961 BP.
XX
AC AM709780;
XX
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Ilesha virus S segment, complete sequence, genomic RNA, strain
ArB16282
XX
KW complete viral segment; nucleocapsid protein; sSgp1 gene.
XX
OS Ilesha virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-961
RA Rihn B.H.;
RT ;
RL Submitted (02-MAY-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Rihn B.H., Meurthe et Moselle, CHU de Nancy Brabois and INSERM
525, 30 Rue
RL Lionnois, 54003 Nancy, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A.E., Rihn B.H.;
RT "Molecular characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:1761-1766(2007).
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..961
FT /organism="Ilesha virus"
FT /segment="S"
FT /specific_host="Anopheles gambiae"
FT /strain="ArB16282"
FT /isolate="Feb 81"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bouboui"
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="Nov-1980"
FT /identified_by="JP Digoutte"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="taxon:273341"
FT CDS 86..787
FT /gene="sSgp1"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="CAM98681.1"
FT
FT /translation="MIELEFHDVNTANTSSTFDPEVAYANFKRIHTNGLNYDHIRIFYIK
FT
FT GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKISVYNTKFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGFLARYLL
FT
FT EKMLKVSEPEKLI I KSKI INPLAEKNGITWYDGEEVYLSFFPGSEMCLGTQDFYPMAIE

FT
FYQVQRKEMEPKFLEKTLKQORSLGLEPSTWTISQLVKLQSALTVVSGLGWKKTNVGAAA
FT
RNFLAKFGINM"

XX

SQ Sequence 961 BP; 324 A; 199 C; 197 G; 241 T; 0 other;
agtagtgtac tccacactac aaacctgcta acgctgagaa tcactatgac atctaatacca
60 atagaaaatc atcttgaact ctttaatgat tgaattagag tttcatgatg tcaactgctaa
120 caccagcagt acttttgacc cagaggctgc atacgctaac ttaagcgta tccacaccaa
180 tgggcttaac tacgaccaca tacgaatctt ctacattaa ggacgcgaga ttaaaactag
240 tctcgcaaaa agaagtgaat gggagggttac acttaacctt ggggctgga agatttctgt
300 atataatacg aaatttctctg gcaaccggaa caaccagtt cctgacgatg gtcttacct
360 ccaccgactc agtggattcc ttgccaggta cctacttgag aagatgctta aagtcagtga
420 accggaaaaa ttaattatta aatcaaaaat aatcaaccct ttggcggaaa aaaacgggat
480 cacttggat gatggagagg aagtttacct ctctttcttc cctggctctg agatgtgcct
540 ggggacccaa gatttctacc ccatggcaat tgaattctac caagtccaac gcaaagaaat
600 ggaaccgaaa ttccttgaaa aaacattgaa gcaaagatcc ttgggactag aaccttcaac
660 ctggaccatc agccaattgg tgaagttaca atcagcccta acagtggctct ctggcttggg
720 ttggaagaaa actaatgtag gtgctgcagc taggaacttc cttgctaaat ttggaatcaa
780 catgtaagga gggaaacaat ttcaatcagg taaaaaaaaat aaaataaaat ttggctaaaa
840 ggggtggattc aaccgcgaa ataacagcca tacagatggg tggcttgggg acgagaaaaa
900 actggcttaa ccttaaatat gtgcttcata atgaatttag gttaaagtgg aaactacatc
960

g

961

//

EBI Dbfetch

ID AM709781; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 959 BP.
XX
AC AM709781;
XX
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Nyando virus S segment, complete sequence, genomic RNA, strain
ArB16055
XX
KW complete viral segment; nucleocapsid protein; sSgp1 gene.
XX
OS Nyando virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-959
RA Rihn B.H.;
RT ;
RL Submitted (02-MAY-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Rihn B.H., Meurthe et Moselle, CHU de Nancy Brabois and INSERM
525, 30 Rue
RL Lionnois, 54003 Nancy, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A.E., Rihn B.H.;
RT "Molecular characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:1761-1766(2007).
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..959
FT /organism="Nyando virus"
FT /segment="S"
FT /specific_host="Anopheles funestus"
FT /strain="ArB16055"
FT /isolate="Feb 81"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bozo"
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="27-Oct-1980"
FT /identified_by="JP Digoutte"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccacc"
FT /db_xref="[taxon:35316](#)"
FT [CDS](#) 80..781
FT /gene="sSgp1"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM98682.1](#)"
FT
FT /translation="MIELEFNDVTANTSSTFDPEVAYANFKRIHTNGLNYDHIRIFYIK
FT
FT GREIKISLAKRSEWEVTLNLGGWKIAVYNTNFPGNRRNNPIPDGLTLHRLSGFLARFLL
FT
FT EKMLKVSEPEKLIKTKIINPLAEKNGITWNLDGEEVYLSFFPGAEMFLGTFKFYPPFAIG

FT
IYKVQSKEMEPKYLEKTMWQRYMGLEASSWTVSKLTEVQSALTVVSGLGWKKTNVSAAA
FT
RDFLAKFGINM"

XX

SQ Sequence 959 BP; 317 A; 182 C; 206 G; 254 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttttcg ttgcgaagtt acattataaa taaaatagaa
60 gatcatcttg ggttctcaaa tgattgaatt agaattcaat gatgtcactg ctaacaccag
120 cagtactttt gacccagagg tcgcatagcg taactttaag cgtatccaca ccaatgggct
180 taactacgac cacatacgaa tcttctacat taaaggaaga gagattaaaa ttagtctcgc
240 aaaaagaagt gaatgggagg ttacacttaa ccttgggggc tggaagattg ctgtatataa
300 tacgaatttt cctggcaaca ggaacaaccc aattcctgac gatgggtctta ccctccaccg
360 cctcagtgga ttccttgcca ggtttctact tgaaaagatg ctgaaagtta gtgaaccaga
420 aaaattgatt ataaagacaa aaataatcaa tccattggct gaaaaaaaaatg gcataacatg
480 gaatgatgga gaagaagttt acttgtcatt cttccctggc gcagaaatgt tcttaggaac
540 attcaaattc taccatttg caattggaat ctacaaggtt caaagcaaag aaatggaacc
600 aaaatatctt gagaaaacaa tgtggcagag gtacatgggg ctagaagcat ccagttggac
660 agttagcaaa ttgacagaag ttcagtctgc actgacagtt gtctctggct tgggctggaa
720 gaagaccaat gttagtgtg cagccagaga cttcctggct aaatttgga tcaacatgta
780 atctgggata tgtgttcaat ctggccaaaa tattaatatt ttatctggct aaaaggggtg
840 tttaaacctt caatataaca gcataatagg ttggcgggtg gggacggaaa gacaacggaa
900 taactcaact ttctgatttg gtactcaagt tgaggtggag cacctacggg gccctccc
959
//

EBI Dbfetch

ID AM709782; SV 1; linear; genomic RNA; STD; VRL; 958 BP.
XX
AC AM709782;
XX
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Created)
DT 16-MAY-2007 (Rel. 91, Last updated, Version 1)
XX
DE Ingwavuma virus S segment, complete sequence, genomic RNA, strain
ArB2633d
XX
KW complete viral segment; nucleocapsid protein; sSgp1 gene.
XX
OS Ingwavuma virus
OC Viruses; ssRNA negative-strand viruses; Bunyaviridae;
Orthobunyavirus.
XX
RN [1]
RP 1-958
RA Rihn B.H.;
RT ;
RL Submitted (02-MAY-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Rihn B.H., Meurthe et Moselle, CHU de Nancy Brabois and INSERM
525, 30 Rue
RL Lionnois, 54003 Nancy, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Nakoune Yandoko E., Finance C., Le Faou A.E., Rihn B.H.;
RT "Molecular characterization of African Orthobunyaviruses";
RL J. Gen. Virol. 88:1761-1766(2007).
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT [source](#) 1..958
FT /organism="Ingwavuma virus"
FT /segment="S"
FT /specific_host="Estrilda melpoda"
FT /strain="ArB2633d"
FT /isolate="17-02-72"
FT /mol_type="genomic RNA"
FT /country="Central African Republic:Bangui"
FT /collected_by="JP Digoutte"
FT /collection_date="29-Dec-1971"
FT /identified_by="JP Digoutte"
FT /virion
FT /PCR_primers="fwd_name: BUNS274C, fwd_seq:
FT ctttaacyttgggggctgga, rev_name: BUNS957R, rev_seq:
FT ccccnaccaccaccc"
FT /db_xref="[taxon:159145](#)"
FT [CDS](#) 84..785
FT /gene="sSgp1"
FT /product="nucleocapsid protein"
FT /protein_id="[CAM98683.1](#)"
FT
FT /translation="MVGIEFHDAANTSSSTFDPEVAYANFKRIHTNGLSYDNIRIFYIK
FT GREIKTSLAKRSEWEVTLNLGGWKVAVYNTNFPGNRNNPVPDDGLTLHRLSGFLHKSL
FT DTMLLVSEPDKLIKSKIINPMAEKNGITWNDDGEEVYLSFFPGSEMFLGTFRFYPLAIG

FT
IYKVQKEMDPKYLEKTMQRQRYMGLEASSWTVSKVSEVQSALTVVSGLGWKKTNVSAAA
FT
REFLAKFGINM"

XX

SQ Sequence 958 BP; 308 A; 188 C; 204 G; 258 T; 0 other;
agtagtgtag tccacactac aaacttgcta ttgatacaaa tccgtaacgg aggggtccaga
60 gctggctcat ttcttgccct taaatggtag gaatagaatt tcatgatgtc gctgctaaca
120 ccagcagtag ttttgaccca gaggtcgcat atgctaactt taagcgtatc cacaccaatg
180 ggcttagtta tgacaacata cgaatcttct acattaaagg acgcgagatt aaaactagtc
240 tgcgaaagag aagtgaatgg gaggttacac ttaaccttgg gggctggaag gttgctgtat
300 acaatacgaa ttttcttggc aaccggaaca acccagttcc tgacgacggt cttaccctcc
360 accgcctcag tggattccta cacaagtcct tactagatac aatgctgtta gtcagtgaac
420 cagataaatt gattattaaa tctaaaataa tcaaccaat ggctgaaaag aatgggatca
480 cttggaacga cggagaggaa gtttatctct ctttcttccc gggatcagaa atgttcttag
540 gaacattcag attctacca cttgcaattg gcatctacaa ggttcaaaag aaagaaatgg
600 atccaaaata tctggaaaag acaatgaggc agcgctatat ggggctagaa gcatccagtt
660 ggacagtgag caaagtctca gaagttcaga gtgctttaa agttgtctca ggcttaggct
720 ggaagaaaac taacgtcagt gctgcagctc gtgaattctt ggcaaaattc ggaataaata
780 tgtaaacaaa ttgagtaatt gaatctggct aaaaatttct acttgaattt ggcaaaaagg
840 gcaatagcgc caccaacttt agtctttggt ttttagggta aatgagggcc tgaggatc
900 agcaaaattt atcacattat atcagtattt taaaagtatt acggtggagc acactact
958

//

ANNEXES 3
PRINCIPES GENERAUX DES METHODES ET
TECHNIQUES UTILISEES

Principe de l'amplification de virus à ARN

Afin d'étudier un fragment d'ADN particulier et dont la séquence est au moins partiellement connue, il est nécessaire de faire une répllication enzymatique de ce fragment (amplification) qui permettra de disposer de quantités manipulables d'ADN pour le caractériser. La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification au cours de la PCR. La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses ou *reverse transcriptase RT*. Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADNc.

Principe de séquençage d'ADN

Pour connaître la séquence des ADN, on fait synthétiser un brin d'ADN par une enzyme spécifique. L'enzyme commence son travail à partir de l'extrémité 3' ou d'une sonde hybridée qui sert d'amorce. Elle ajoute des nucléotides complémentaires de ceux du brin qu'elle copie. Elle a pour substrat des désoxynucléotides triphosphates normaux mélangés avec des désoxynucléotides sans la fonction alcool secondaire en 3' ce qui empêche la synthèse de se poursuivre au-delà. Les didésoxynucléotides incorporés en dernier sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes : ddATP (lié au fluorochrome JOE = vert), ddCTP (lié au fluorochrome 5-FAM = bleu), ddGTP (lié au fluorochrome TAMRA = jaune) et ddTTP (lié au fluorochrome ROX = rouge). L'incorporation de ces didésoxynucléotides marqués va interrompre la synthèse de façon aléatoire mais toujours au niveau de base complémentaire de la séquence. Les fragments néo-synthétisés sont ensuite séparés dans un champ électrique (électrophorèse : les ADN sont des anions, ils vont vers le pôle +), en fonction de leur longueur (les plus petits sont les plus rapides). Le logiciel détermine après balayage laser les différents polymères identifiés par leur couleur, permettant de lire la séquence.

Principe de la recherche par similitude

La recherche de séquences homologues de nucléotides dans les banques de données constitue une étape essentielle de notre travail. Il nous paraît donc important de faire ici le point sur la méthodologie de la recherche de similitude dans les banques de séquences. Le domaine d'application de la recherche de similitude ne se limite pas à l'évolution moléculaire et à la phylogénie. La recherche de relations évolutives est également un moyen le plus simple et le plus efficace pour obtenir des indices sur la fonction d'un gène nouvellement séquencé : si deux gènes dérivent d'un ancêtre commun, il est probable qu'ils aient une fonction et une structure similaires. Cette approche donne souvent des résultats intéressants car désormais, la taille des banques de données est telle

qu'environ 30 % à 60 % des séquences nouvelles est homologue à des gènes ou fragments de gènes déjà identifiés (Bork P. and Koonin E.V., 1994).

Principe de l'alignement multiple

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui leur confèrent un sens et une pertinence biologiques. En général les algorithmes fonctionnent sur des segments de séquences (on parle de fenêtres, de motifs ou de mots) sur lesquels on regarde s'il existe ou non une similitude significative. Si on ne prend en compte que des analogies entre sous-séquences sans traiter la possibilité d'insertion ou de délétion, on parlera alors de segments similaires. Ainsi l'équation se résume uniquement à l'expression de la somme des scores élémentaires. On distingue pour cette catégorie deux classes précises de similitude : la ressemblance parfaite ou identité et la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. La similitude entre deux séquences est mesurée en sommant le long de l'alignement, les scores attribués à chaque paire de résidus et aux "indels" (insertion-délétion).

Nom : **Monsieur NAKOUNE YANDOKO**

Prénom : **David Emmanuel Rivalyn**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1377

Nancy, le 16 juillet 2007

Le Président de l'Université



Jean-Pierre FINANCE

Résumé

La famille des *Bunyaviridae* regroupe plus de 350 virus transmis par des arthropodes, classés en cinq genres. La prévalence de ces virus en République Centrafricaine est mal connue et mérite des études moléculaires afin mettre en place un diagnostic fiable, de mieux caractériser les vecteurs et d'identifier les réservoirs qui sont le plus souvent inconnus. Etant donnée la diversité de ces virus, seuls les virus du genre *Orthobunyavirus* ont été caractérisés dans cette étude. La caractérisation génomique de *Bunyaviridae* a été réalisée par le séquençage de segments encadrés par des amorces consensus pour un diagnostic d'espèce. Parmi les orthobunyavirus isolés à l'Institut Pasteur de Bangui (RCA), 12 souches classées dans six sérogroupes ont été incluses dans cette étude. Des couples d'amorces définies dans notre laboratoire ont permis d'amplifier et d'obtenir une séquence complète du segment S de dix souches virales. Une séquence partielle de la glycoprotéine G2 (segment M) de ces souches a également été obtenue. L'organisation génétique du segment S de ces souches de RCA recoupe celle des sérogroupes Bunyamwera, California et Simbu. Leur génome est constitué de deux cadres ouverts et chevauchants de lecture qui codent une protéine de la nucléocapside et une protéine non structurale. La comparaison des séquences nucléiques du segment S et de la protéine G2 des souches de RCA à celle de la souche de référence Bunyamwera NC_001927 montre une différence de 5 % à 15 % et 3,3 % à 42,2 % respectivement. Les séquences des protéines N et G2 de la souche M'Poko ArB365 ont été les plus divergentes (15 % et 42,2 % de différence respectivement). L'arbre phylogénétique construit avec les séquences de la protéine N est monophylétique tandis que celui obtenu avec les séquences de la protéine G2 ne l'est pas.

Mots clés

Orthobunyavirus, séquençage des segments S et M, phylogénie, République Centrafricaine.

Summary

The *Orthobunyavirus* genus is composed of segmented negative sense RNA viruses that are responsible for mild to severe human diseases. To date, no molecular studies of *Bunyaviridae* of the genus *Orthobunyavirus* from Central Africa have been reported, and their classification relies on serological testing. We have designed and evaluated four new primer pairs for amplification by RT-PCR and sequencing of the complete genomic small (S) RNA segments of ten *Orthobunyavirus* viruses isolated from Central African Republic (CAR) and pertaining to 5 different serogroups. Phylogenetic analysis showed that these 10 viruses belong to the Bunyamwera serogroup. The S segment sequences differ from those of the Bunyamwera virus reference strain by 5-15 % at the nucleotide level, and both overlapping reading frames encoding nucleocapsid (N) and non-structural (NS) protein were evident in sequenced genomes. Partial sequencing of M segment was also performed and inversely to the S fragment, the obtained phylogenetic tree was not monophyletic as M'Poko strain was highly divergent. This study should improve diagnosis and surveillance of African bunyaviruses.

Key words

Orthobunyaviruses, S and M segments sequencing, phylogeny, Central African Republic.