

# Transmission expérimentale d'un arbovirus du groupe B le virus Koutango par *Aedes aegypti* L.

Jean COZ <sup>(1)</sup>

G. LE GONIDEC <sup>(2)</sup>

Michel CORNET <sup>(3)</sup>

Michel VALADE <sup>(4)</sup>

M. O. LEMOINE <sup>(5)</sup>

A. GUEYE <sup>(6)</sup>

## RÉSUMÉ.

*Le virus Koutango, arbovirus du groupe B, isolé chez des rongeurs du genre Tatera et du genre Mastomys, au Sénégal, est transmissible à l'homme.*

*Le cycle complet de la transmission a été obtenu de souriceau à souriceau en utilisant *A. aegypti* comme insecte vecteur.*

## ABSTRACT.

*The virus Koutango, belonging to the group B of arboviruses, isolated from rodents of genus Tatera and genus Mastomys in Senegal, West Africa is transmissible to man.*

*Complete cycle of transmission has been obtained from suckling mice to suckling mice, using *A. aegypti* as vector insect.*

## INTRODUCTION

L'étude des arbovirus suppose des essais systématiques de transmission par les arthropodes. Nous avons essayé de transmettre à *A. aegypti* les virus isolés au Sénégal par l'Institut Pasteur de Dakar. Dans le cadre de cette étude nous avons obtenu le passage et la transmission du virus

Koutango (Dak An D 5443), du nom de la localité d'origine, provenant de matériel capturé par l'équipe O.R.S.T.O.M.

C'est un arbovirus du groupe B, se développant bien sur *A. aegypti*, très pathogène pour le souriceau nouveau-né; pour toutes ces raisons nous estimons qu'il peut nous servir de modèle dans l'étude de la transmission et de la conservation des arbovirus du groupe B, avec, nous l'espérons, des prolongements sur la connaissance du principal d'entre eux, le virus amaril, agent de la fièvre jaune.

## 1. MATÉRIEL.

### 1.1. Virus.

Le virus Koutango (Dak An D 5443) a été isolé pour la première fois en avril 1968, du sang d'un rongeur sauvage, *Tatera kempfi*. Cet animal a été capturé au Sénégal, dans la région de Saboya à Koutango (16.05 O-13.40 N), à la frontière Nord de la République de Gambie. Suivant les règles internationales, le virus prend le nom de la localité d'origine.

Il s'agit d'une zone de savane soudano-guinéenne dont les cultures principales sont l'arachide et le mil. La savane est parcourue par des affluents du fleuve Gambie, appelés les bolons. La mangrove qui couvre les rives de la Gambie

<sup>(1)</sup> Pharmacien chimiste des Armées, Entomologiste médical, O.R.S.T.O.M. BP 1386 DAKAR (Sénégal).

<sup>(2)</sup> Médecin des Armées, Biologiste des Hôpitaux, Institut Pasteur, Dakar.

<sup>(3)</sup> Médecin des Armées, Entomologiste médical, O.R.S.T.O.M.

<sup>(4)</sup> Technicien O.R.S.T.O.M., Service d'Entomologie.

<sup>(5)</sup> Technicien, Service d'Arbovirologie de l'Institut Pasteur, Dakar.

et de certains de ses bras ne remonte pas tout à fait jusqu'au village de Koutango.

Ce virus a également été isolé de la forêt de Bandia (16.55 O-14.35 N) d'un *Mastomys sp.* Il a également été isolé d'un autre *Mastomys* en République Centrafricaine.

Enfin le virus Koutango a été isolé chez l'homme à l'Institut Pasteur de Dakar, vraisemblablement à la suite d'une contamination par voie non parentérale.

Ce virus inoculé par voie intra-cérébrale au souriceau nouveau-né provoque sa mort au 3<sup>e</sup>-4<sup>e</sup> jour. L'inoculation intra-péritonéale donne les mêmes résultats.

Le virus filtre à travers les membranes « millipores » de 0,22  $\mu$  de porosité. Il est sensible au chloroforme.

Appartenant au groupe B des arbovirus, il présente en fixation du complément (FC) et en séro neutralisation une parenté particulière avec les virus West-Nile et Usutu.

### 1.2. Souriceaux.

L'animal d'expérience utilisé est le souriceau nouveau-né. Les souris utilisées appartiennent à un élevage de souris blanches provenant de reproducteurs fournis par le « Yellow Fever Research Institute » de Yaba (Lagos-Nigeria), il y a 20 ans.

### 1.3. *Aedes aegypti*.

Le présent travail a été mené avec une souche d'*A. aegypti*, originaire de Kébémér (Sénégal) et maintenue depuis plusieurs années en insectarium.

## 2. MÉTHODE.

### 2.1. Inoculation au souriceau.

Les *A. aegypti* et les cerveaux de souriceaux prélevés ont été inoculés par voie intra-cérébrale à des souriceaux de 1-2 jours après dilution avec du tampon phosphaté albuminé (\*).

### 2.2. Inoculation au moustique.

Les femelles d'*A. aegypti*, anesthésiées au froid, ont été inoculées par piqûres intrathoraciques, elles ont été ensuite mises en observation 11 jours avec comme seule

(\*) Tampon phosphaté albuminé :

— Phosphate disodique anhydre, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . .	3,20 g
— Phosphate monosodique cristallisé, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O . . . . .	0,39 g
— Chlorure de sodium, NaCl. . . . .	6,00 g
— Eau bidistillée q.s.p.. . . . .	1 000 ml

Dans la solution ainsi obtenue, dissoudre 7,50 g d'albumine bovine; filtrer sur membrane et ajouter 500 unités de pénicilline et 500  $\mu$ g de streptomycine par millilitre.

nourriture des quartiers de pomme changés tous les deux jours. Les conditions de température et d'humidité retenues ont été les suivantes :

- température . . . . . 28 °C  $\pm$  1°,
- humidité . . . . . 80-90 % H.R.

### 2.3. Infection naturelle d'*A. aegypti*.

Les *A. aegypti*, éclos depuis 4-5 jours sont privés de pomme 24 heures avant d'être placés dans des gobelets en carton recouverts de gaze. Sur cette gaze on place 2 ou 3 souriceaux en phase virémique et on les maintient avec une autre gaze.

On procède au bout de 4-5 heures à la séparation des femelles gorgées après les avoir anesthésiés au froid. Les femelles gorgées sont ensuite placées, à 28 °C pour 80-90 % d'humidité relative, dans une pièce de l'insectarium dans des cages à double paroi. Les femelles sont mises à pondre avant d'être présentées individuellement à des souriceaux nouveaux-nés, pour essai de transmission.

### 2.4. Infection des souriceaux par les moustiques.

Les moustiques sont placés un à un dans des tubes de verre (hauteur : 8,5 cm, diamètre : 4 cm). Le tube est fermé par de la gaze, maintenue par un bracelet de caoutchouc, sur laquelle on pose un souriceau nouveau-né. On recouvre ce dernier d'une seconde gaze que l'on fixe de la même façon. Le souriceau est ainsi immobilisé. Les souriceaux sont marqués par injection intra-dermique d'encre de chine. Le repas de sang pris, les moustiques sont numérotés dans des tubes individuels et placés à -70 °C; ils seront ensuite broyés et inoculés par voie intra-cérébrale à des souriceaux nouveaux-nés. Les souriceaux piqués par les *Aedes* supposés infectés sont mis en observation; en cas de paralysie ils sont prélevés pour caractérisation du virus.

### 2.5. Titrage de la virémie du souriceau.

Après inoculation intra-cérébrale de 2 000 DL 50, en 0,02 ml, par souriceau, la virémie est étudiée toutes les 12 heures par sacrifice de 2 souriceaux. Après section de la veine axillaire le sang est recueilli dans une pipette capillaire et dilué au tampon phosphaté additionné de 10 % de sérum de lapin de façon à obtenir une dilution initiale de 10<sup>-1</sup>.

Des dilutions de 10 en 10 sont ensuite inoculées à de nouvelles portées de souriceaux pour détermination du titre par la méthode de REED et MUENCH (1938).

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DU VIRUS KOUTANGO PAR *Aedes Aegypti* L.

TABLEAU 1. — Étude des anticorps IH et FC avant et après infection par le virus Koutango (Kou)

DATE PRÉLÈVEMENT	INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION (IH)									FIXATION DU COMPLÉMENT (FC)			
	YF <sup>(1)</sup>	UGS	DB	WN	ZIKA	KOU	NTA	SAB	WSL	YF	WN	ZIKA	KOU
Prélèvement antérieur : 19-10-73 . . . . .	20 <sup>(2)</sup>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 8	< 8	< 8	< 8
Sérum 58 <sup>e</sup> jour : 21-3-74 . . . . .	320	320	160	40	640	80	80	20	40	8-16 <sup>(3)</sup>	8	< 8	16
Sérum 113 <sup>e</sup> jour : 15-5-74 . . . . .	40	20	10	10	10	10-20	10	20	10	< 8	< 8	< 8	8

(<sup>1</sup>) YF = fièvre jaune, UGS = Uganda S, DB = Dakar-bat, WN = West-Nile, ZIKA = Zika, KOU = Koutango, NTA = Ntaya, SAB = Saboya, WSL = Wesselsbron.

(<sup>2</sup>) Inverse de la dilution donnant une inhibition complète de l'hémagglutination par 4-8 unités d'antigène.

(<sup>3</sup>) Inverse de la dilution fixant le complément (moins de 30 % d'hémolyse).

3. RÉSULTATS.

3.1. Pathologie.

3.1.1. HOMME.

Le virus Koutango a été isolé à partir de sang humain à l'Institut Pasteur de Dakar. Il s'agit vraisemblablement d'une contamination de laboratoire. Le malade contrôlait, chaque matin, des boîtes de souriceaux inoculés avec du virus Koutango. Il est vraisemblable que la contamination s'est produite par voie non-parentérale (aérosol).

Le malade a présenté un épisode fébrile avec une température à 38,5 °C; cet épisode a duré 2 jours; il s'accompagnait de courbature et de céphalées rétro-orbitaires. Au 3<sup>e</sup> jour de la maladie, une éruption érythémateuse s'est développée sur les flancs. Le sang prélevé au 2<sup>e</sup> jour de l'épisode fébrile et inoculé au souriceau nouveau-né a permis l'isolement du virus. Nous avons pu suivre la sérologie de ce malade avant et après sa contamination par le virus Koutango.

Avant cette contamination, le 19-10-73, le titre d'anticorps fièvre jaune inhibant l'hémagglutination (IH) est de 1/20<sup>e</sup> (tabl. 1); aucun anticorps décelable contre les autres arbovirus. La phase virémique intervient les 22 et 23-1-74. On observe une augmentation des anticorps IH dans le groupe B : les anticorps anti-Koutango FC passent à 1/16<sup>e</sup> le 21-3-74, deux mois après l'infection : ils redescendent au 1/8<sup>e</sup> le 15-5-74.

3.1.2. SOURICEAU.

Le souriceau inoculé par du virus Koutango par voie intra-cérébrale meurt en 3-4 jours.

Il faut noter cependant certaines particularités. Pour

de faibles doses de virus Koutango, lors d'un titrage par exemple, on trouve quelquefois des survivants aux 3-4<sup>e</sup> jours. Il arrive que ces souriceaux, de même que les mères qui les allaitent, meurent au 8<sup>e</sup> jour. Cette observation est également valable pour les infections expérimentales par moustiques; des témoins et des mères meurent aux 8-9<sup>e</sup> jours, d'atteintes par le virus Koutango. Il y a donc vraisemblablement contamination par voie aérienne ou digestive.

3.2. Virémie chez le souriceau.

La virémie apparaît très rapidement chez le souriceau. Dès la 12<sup>e</sup> heure, nous avons déjà un titre de 1 778 DL 50 (3,25 log DL 50) qui se maintient en plateau jusqu'à la 36<sup>e</sup> heure. Puis le taux monte atteignant 10<sup>8</sup> DL 50 (8 log DL 50) et se maintenant jusqu'à la mort du souriceau (fig. 1, tabl. 2).

3.3. Infection des moustiques et transmission.

3.3.1. INOCULATION AU MOUSTIQUE.

Aux *A. aegypti* infectés par piqûre intrathoracique, nous avons présenté des lots de souriceaux. Cette méthode d'inoculation aux moustiques permet de mieux sérier les questions : nous avons ainsi testé 8 candidats « arbovirus », les souches : Le Dantec, Touré, Gossas, Yogue, Keur-Aliba, Dakar-bat, Saboya, Koutango. Pour le virus Koutango qui seul nous a donné des résultats positifs, la mort des souriceaux intervient du 3<sup>e</sup> au 5<sup>e</sup> jour après la piqûre.

Tous les moustiques testés ont ensuite été broyés et inoculés (IC) à des souriceaux d'un jour. Seul le virus Koutango nous a encore donné des résultats positifs.

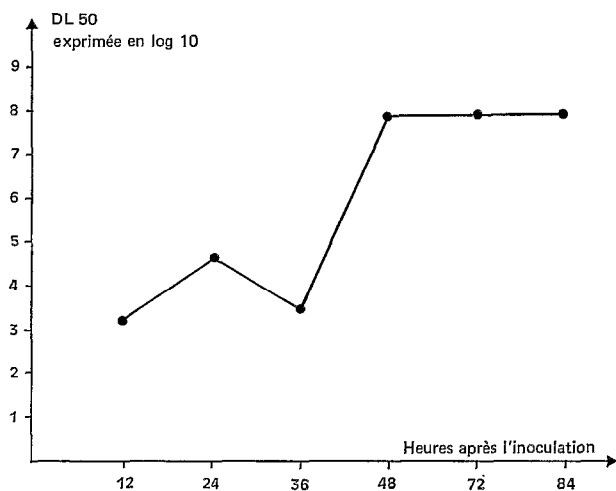


FIG. 1. — Virémie du souriceau après inoculation intracérébrale.

TABLEAU 2. — Étude de la virémie chez le souriceau inoculé par voie intracérébrale

NOMBRE DE JOURS APRÈS L'INOCULATION	NOMBRE D'HEURES APRÈS L'INOCULATION	VIRÉMIE (log DL 50 / 0,02 ml)
1 . . . . .	12	3,25
	24	4,7
2 . . . . .	36	(3,5)
	48	8
3 . . . . .	60	8
	72	8
4 . . . . .	84	Décès
	96	

TABLEAU 3. — Essais de transmission expérimentale du virus Koutango par des *A. aegypti* nourris sur des souriceaux inoculés intracérébralement, 48 heures après l'inoculation (8 log DL 50)

	NOMBRE DE JOURS D'INCUBATION DES AEADES	SOURICEAUX PIQUÉS			TEMPÉRATURE HUMIDITÉ
		Morts	Total	%	
Expérience n° 1	7 jours . . . . .	2	12	(17) (***)	28 °C 80-90 % HR
	12 jours . . . . .	14	20	70	
	17 jours . . . . .	7	12	(57,9)	
	19 jours . . . . .	4	7		
	22 jours . . . . .	6	10	82,6	
	26 jours . . . . .	13	13	88	
33 jours . . . . .	22	25	88		
Expérience n° 2	18 jours . . . . .	6	7	(86)	
Expérience n° 3	15 jours . . . . .	23	25	92	
Expérience n° 4	4 jours . . . . .	1	15	(6,7)	
	11 jours . . . . .	9	10	(90)	
Expérience n° 5	6 jours . . . . .	9	24	37,5	
	13 jours . . . . .	16	23	69,6	
	20 jours . . . . .	21	24	87,5	
	27 jours . . . . .	12	15	(80)	
Expérience n° 6	5 jours . . . . .	0	12	(0)	24 °C 80-90 % HR
	10 jours . . . . .	1	13	(7,7)	
	12 jours . . . . .	4	11	(36,4)	

(\*\*\*) Entre parenthèses les pourcentages calculés pour des effectifs < 20.

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DU VIRUS KOUTANGO PAR *Aedes aegypti* L.

3.3.2. TRANSMISSION PAR *A. aegypti*.

Des lots d'*A. aegypti* gorgés sur souriceaux virémiques, après une période d'observation, ont été nourris une seconde fois. Les résultats sont présentés :

- d'une part au tableau 3 (fig. 2) en tenant compte des souriceaux piqués par les *A. aegypti*,
- d'autre part au tableau 4 (fig. 3) où n'ont été retenues que les séries avec résultats de la piqûre du moustique et de l'inoculation de ce même moustique,

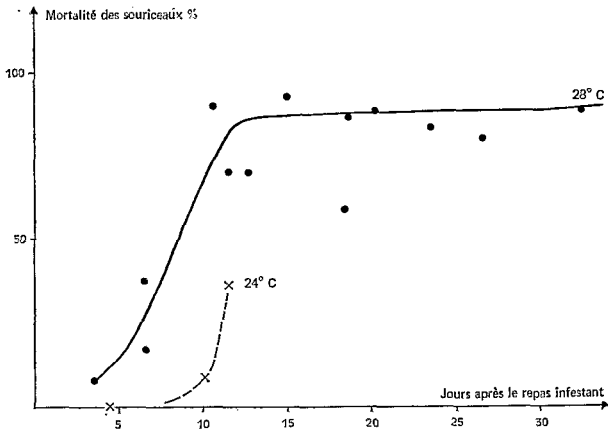


FIG. 2. — Transmission du virus Koutango par *A. aegypti* en fonction de la température.

- un seul résultat : série rejetée,
- piqûre positive (1), inoculation négative : série rejetée,
- deux résultats positifs : séries retenues,
- deux résultats négatifs : séries retenues,
- piqûre négative, inoculation positive : série retenue.

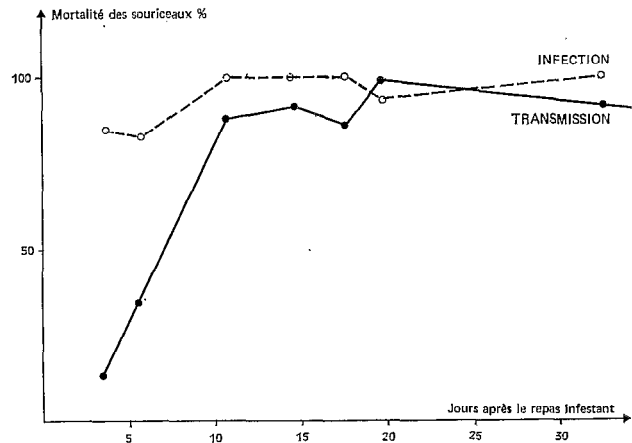


FIG. 3. — Évolution des indices d'infection et de transmission chez *A. aegypti* (28 °C).

(1) La piqûre est dite positive lorsqu'elle entraîne la mort du souriceau en 3-4 jours.

TABLEAU 4. — Évolution des indices d'infection et de transmission

NOMBRE DE JOURS APRÈS LE REPAS INFECTANT	TRANSMISSION		INFECTION		TOTAL MOUSTIQUES TESTÉS C
	Nombre A	%	Nombre B	%	
4 (28 °C) . . . . .	1	(7,7)	11	(85)	13
6 . . . . .	8	34,8	19	82,6	23
11 . . . . .	8	(89)	9	(100)	9
15 . . . . .	23	92	25	100	25
18 . . . . .	6	(86)	7	(100)	7
20 . . . . .	16	(100)	16	(94)	17
33 . . . . .	11	(92)	12	(100)	12
5 (24 °C) . . . . .	0	(0)	1	(10)	10
10 . . . . .	0	(0)	2	(29)	7
12 . . . . .	4	(100)	4	(44)	9

$$\text{Indice infection} = \frac{B \times 100}{C}; \text{Indice transmission} = \frac{A \times 100}{B}$$

Le virus Koutango se multiplie rapidement dans le moustique à 28 °C; on obtient en effet les premières transmissions avant le 5<sup>e</sup> jour; le taux de transmission croît rapidement pour atteindre un maximum après le 10<sup>e</sup> jour. La transmission suit ensuite un plateau jusqu'à la mort du moustique, du moins dans nos conditions d'expérience.

La température paraît jouer un rôle important :

A 24 °C, température obtenue accidentellement, l'évolution du virus paraît beaucoup plus lente (tabl. 3, fig. 2) :

- au 5<sup>e</sup> jour : piqûre (0/12), inoculation (0/12),
- au 10<sup>e</sup> jour : piqûre (1/13), inoculation (2/13),
- au 12<sup>e</sup> jour : piqûre (4/11), inoculation (6/11).

Les résultats exprimés en souriceaux morts par rapport au total des souriceaux testés montrent que les taux d'infection et de transmission montent progressivement comme dans les expériences menées à 28 °C mais qu'ils sont nettement inférieurs.

## DISCUSSION.

Outre son activité sur l'homme, le virus Koutango du groupe B des arbovirus présente un intérêt fondamental. C'est tout d'abord un virus qui se développe très rapidement chez le souriceau puisque la mort intervient entre 3 et 5 jours. C'est ensuite un virus qui donne des taux d'infection et de transmission très élevés chez *A. aegypti*, insecte éminemment malléable. C'est donc un virus qui peut servir de modèle et qui permettra peut-être d'approfondir et

de comprendre les mécanismes de conservation des arbovirus dans la nature.

Dans le groupe B des arbovirus se trouve le virus amaril, également transmis par des *Aedes* de différentes espèces dont *A. aegypti*. C'est un virus plus difficilement malléable que le virus Koutango; tout d'abord parce qu'après 3 ou 4 passages sur souris du virus humain épidémique, il devient très difficile de mettre en évidence le virus chez des *A. aegypti* gorgés sur souriceaux virémiques, d'autre part parce que le temps d'incubation chez la souris est en général plus long (8 jours).

Certaines conclusions obtenues avec le virus Koutango déboucheront, peut-être, sur des perspectives épidémiologiques à propos de la fièvre jaune.

## REMERCIEMENTS.

Nous tenons à remercier le D<sup>r</sup> ROBIN, Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar, responsable au Centre Collaborateur O.M.S. de Référence et de Recherche pour les virus transmis par les arthropodes, pour les caractérisations de virus.

Nous remercions également R. CHATEAU, technicien O.R.S.T.O.M. qui a capturé les rongeurs au Sénégal.

*Manuscrit reçu au S.C.D. de l'O.R.S.T.O.M.,  
le 7 janvier 1975.*

## BIBLIOGRAPHIE

- REED (L. J.) and MUENCH (H.), 1938. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27 : 493-497.