

Transmission expérimentale comparée du virus amaril et du virus Zika chez *Aedes aegypti* L. ⁽⁵⁾

Michel CORNET ⁽¹⁾

Yves ROBIN ⁽²⁾

Catherine ADAM ⁽³⁾

Michel VALADE ⁽⁴⁾

Marie-Armande CALVO ⁽³⁾

RÉSUMÉ

Les auteurs se sont proposés d'étudier la transmission du virus amaril et du virus Zika par des *Aedes aegypti* artificiellement infectés. Ils ont trouvé que la période d'incubation chez le moustique était plus longue avec le virus amaril qu'avec le virus Zika et qu'un moustique infecté ne transmettait pas régulièrement à chaque piqûre, même s'il avait déjà transmis. Il semble également que, passé ce délai d'incubation, la transmission soit moins efficace avec le virus amaril. Ceci pourrait expliquer la moindre fréquence des poussées épzootiques dues au virus amaril, telle qu'elle a été observée au Sénégal Oriental.

MOTS CLÉS : *Aedes* - Transmission - Arbovirus - Région éthiopienne.

ABSTRACT

COMPARISON BETWEEN EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF YELLOW FEVER AND ZIKA VIRUSES IN *Aedes aegypti*

The authors expected to study the transmission of yellow fever and Zika viruses by artificially infected *Aedes aegypti*. They found that the incubation period in mosquitoes is longer with yellow fever than with Zika and that an infected mosquito does not regularly transmit at each bite, even if it has already transmitted. It seems that, after this incubation period, the transmission is more efficient with Zika virus. This could explain the lesser frequency of yellow fever epizootics observed in Eastern Senegal.

KEY WORDS : *Aedes* - Transmission - Arbovirus diseases - Ethiopian region.

Dans le cadre d'une étude sur la fièvre jaune selvatique menée au Sénégal Oriental de 1972 à 1977, deux poussées épzootiques provoquées par le virus Zika ont pu être observées, en 1973 et 1976; pendant la même période il n'a été enregistré qu'une seule poussée due au virus amaril, en 1976-77. Ces deux virus ne font intervenir dans leur cycle, au moins dans l'état actuel de nos

connaissances, que les primates et les mêmes vecteurs dont les principaux sont *Aedes (Stegomyia) luteocephalus*, *Aedes (Diceromyia) furcifer* et *Aedes (Diceromyia) taylori*. Malgré cette identité apparente de cycle, le virus Zika semble donc circuler plus facilement que le virus amaril; une explication de ce phénomène pourrait se trouver dans une différence d'efficacité de la transmission de ces deux

(1) Médecin du Service de Santé des Armées, Entomologiste médical à l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer. Adresse actuelle : Services Scientifiques centraux de l'O.R.S.T.O.M., 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

(2) Médecin du Service de Santé des Armées, Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar.

(3) Technicienne de l'Institut Pasteur de Dakar.

(4) Technicien d'Entomologie Médicale de l'O.R.S.T.O.M.

(5) Ce travail a été réalisé par la section d'Entomologie Médicale du Centre O.R.S.T.O.M. de Dakar et par l'Institut Pasteur de Dakar. Il a en outre bénéficié d'une aide de l'Organisation Mondiale de la Santé.

virus par les vecteurs; c'est cette hypothèse que nous nous sommes proposés de tester par cette étude expérimentale.

TECHNIQUES ET MÉTHODES

Trois séries d'expériences ont été réalisées, deux avec le virus amaril et une avec le virus Zika.

Les moustiques utilisés sont des *Aedes aegypti* appartenant à une souche domestique originaire de Kebemer, dans l'ouest du Sénégal, et colonisée depuis 1971.

Expérience A

Transmission du virus amaril par *A. aegypti* infecté par voie intrathoracique :

Un lot de femelles d'*A. aegypti* a été infecté par inoculation intrathoracique selon la technique de Rosen et Gubler (1974) reprise par Coz *et al.*, (1977). L'inoculum était le broyat initial de la souche amarile ArB 6039, c'est-à-dire un broyat d'*Aedes africanus* récoltés à Bozo, Empire Centrafricain, en 1974 (Germain *et al.*, 1976).

Neuf jours plus tard les moustiques ont été placés dans des tubes individuels et il leur a été présenté à chacun un souriceau de 24 heures. Les moustiques gorgés ont alors été isolés dans des cages numérotées et les souriceaux correspondants tatoués à l'encre de Chine de façon à pouvoir faire la relation entre le souriceau et le moustique qui l'avait piqué.

Cette opération a été répétée les 16^e, 24^e et 31^e jours ayant suivi l'inoculation. Chaque fois qu'un moustique refusait de se gorger, le souriceau correspondant était néanmoins conservé et un nouveau souriceau lui était présenté le lendemain et éventuellement le surlendemain.

Les moustiques ont été conservés à 27-28 °C dans une atmosphère humide (plus de 85 % d'humidité relative) et une source de jus sucré leur a été fournie régulièrement, sauf la veille des repas sanguins. Après le dernier repas les moustiques survivants ont été tués par le froid, broyés séparément et inoculés à des dilutions de 10 en 10 à des souriceaux nouveaux-nés sans que le broyat ait été congelé ni centrifugé (Cornet *et al.*, 1977); ceci permettait de titrer la quantité de virus contenue dans chaque moustique.

Les souriceaux piqués par les moustiques infectés ont été surveillés jusqu'au 21^e jour. Dès l'apparition de signes de paralysie le cerveau des souriceaux malades était prélevé; l'origine virale de ces troubles a été vérifiée soit par immuno-fluorescence sur des empreintes de cerveau, soit par des réactions de fixation du complément utilisant comme antigène une suspension de cerveau préparée en tampon véronal.

Expérience B

Transmission du virus Zika par *A. aegypti* infecté par voie intrathoracique :

L'inoculum utilisé était le broyat initial de la souche Zika ArD 24280, c'est-à-dire un broyat d'*Aedes luteocephalus* récoltés au Sénégal Oriental en octobre 1976.

Le protocole a été le même que celui de l'expérience A sauf en ce qui concerne la périodicité des repas sanguins qui ont eu lieu les 7^e, 14^e, 21^e et 28^e jours.

Expérience C

Transmission du virus amaril par *A. aegypti* infecté par voie digestive :

Le broyat utilisé est celui de la souche amarile ArB 5967, isolée à Bozo, Empire Centrafricain, en 1974 (Germain *et al.*, *loc. cit.*). Une suspension virale concentrée a été obtenue en utilisant le polyéthylène glycol (Fleury *et al.*, 1978); diluée au 1/5 dans du sang défibriné de lapin exempt d'anticorps pour les Flavivirus, elle a été placée dans des œufs préalablement vidés en laissant la membrane de la poche à air; les œufs étaient fixés à l'extrémité supérieure d'un cylindre en plastique contenant les femelles de moustiques mises à jeûner depuis 24 heures; la suspension virale était légèrement chauffée par une ampoule électrique de 3,5 volts (cette technique nous a été communiquée par le « Yale Arbovirus Unit »); le titre du repas ainsi offert aux moustiques était 10^{7.24} DL 50 souriceau par ml au début du repas et 10^{7.13} DL 50 à la fin du repas, 4 heures plus tard.

Le protocole est ensuite identique à celui des deux expériences précédentes, les repas ayant eu lieu les 7^e, 14^e et 21^e jours.

RÉSULTATS

Les résultats sont présentés aux tableaux I à VI, deux pour chaque expérience; le premier donne les résultats obtenus pour chaque moustique; le second ne concerne que les moustiques ayant survécu jusqu'à la fin de l'expérience, en fonction de la quantité de virus qu'ils contenaient.

Le nombre très faible d'observations ne permet pas une analyse statistique valable et il convient donc d'être très prudent dans l'interprétation des différences observées. Les résultats peuvent donc être divisés en deux groupes : résultats certains et résultats demandant confirmation par une expérimentation ultérieure.

Résultats certains

Trois constatations peuvent être faites :

– L'incubation chez le moustique est plus longue avec le virus amaril qu'avec le virus Zika, ceci n'étant pas

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE COMPARÉE DES VIRUS AMARIL ET ZIKA

TABLEAU I

Expérience A : Transmission du virus amaril par *Aedes aegypti*. Résultats moustique par moustique.

Repas-jour n° du moustique	1 ^{er} repas		2 ^e repas		3 ^e repas			4 ^e repas		J 33	Nombre de DL50 par moustique (en valeur logarithmique)					
	J 9	J 16	J 17	J 24	J 25	J 31	J 32									
1	G	N	G	N		G	N		G	N		2.64				
2	G	N	G	N		G	N		NG	N+		-				
3	G	P	G	P		NG	P	G	P	G	N	3.75				
4	G	N	NG	P	G	P	G	P	G	P		4.00				
5	G	N	G	N		NG	N+		-			-				
6	G	N	NG	N	G	P	NG	P+				-				
7	G	N	G	P		G	P		NG	N+		-				
8	G	N	G	P		G	P		G	N		4.43				
9	G	N	+			-			-			-				
10	G	N	G	P		NG	-+		-			-				
11	G	N	G	P		G	P		G	N		4.83				
12	G	N	G	P		NG	N+		-			-				
13	G	N	G	P		G	N		NG	P	NG	N	G	N	3.56	
14	G	N	G	N		NG	N	G	N	NG	N	NG	N	G	N	4.36
15	G	N	G	P		G	P		G	P						4.75
16	G	P	G	P		G	-		NG	N	NG	N	NG	N+		-
17	G	N	G	P		NG	P+		-							-
18	G	P	G	P		G	P		G	P						4.83
19	G	N	G	P		NG	N	G	P	NG	N+					-
20	G	N	G	P		G	P		G	P						5.64
21	G	N	G	N		NG	N+		-							-
22	G	N	G	P		NG	N	G	N	G	P					5.42
23	G	N	G	P		G	N		G	N						3.34
24	G	N	G	P		G	P+		-							-
25	G	N	G	P		G	N		G	P						P < 2.00
26	G	P	NG	P	G	N	+		-							-
27	G	-	G	-		NG	N	G	N	NG	N	G	N			3.83
28	G	N	+			-			-							-

Abréviations : NG : moustique non gorgé. G : moustique gorgé. P : transmission positive. N : transmission négative. + : moustique mort.

TABLEAU II

Expérience A : Transmission du virus amaril par *Aedes aegypti*.
Résultats en fonction du titre de virus chez le moustique.

n° de moustique	Titre de virus (logarithme)	Transmission				% de transmission au cours des 3 derniers repas
		1 ^{er} repas	2 ^e repas	3 ^e repas	4 ^e repas	
25	< 2.00	N	P	N	P	
1	2.64	N	N	N	N	33
23	2.34	N	P	N	N	
13	3.56	N	P	N	P	
3	3.75	P	P	P	N	45
27	3.83	-	-	N	N	
4	4.00	P	P	P	P	
14	4.36	N	N	N	N	
8	4.43	N	P	P	N	72
15	4.75	N	P	P	P	
11	4.83	N	P	P	N	
18	4.83	P	P	P	P	
22	5.42	N	P	N	P	
20	5.64	N	P	P	P	83

Abréviations : P : transmission positive. N : transmission négative. - : résultat non observé.

TABLEAU III
Expérience B : Transmission du virus Zika par *Aedes aegypti*. Résultats moustique par moustique.

Repas-jour n° du moustique	1 ^{er} repas		2 ^e repas		3 ^e repas			4 ^e repas			Nombre de DL50 par moustique (en valeur logarithmique)
	J 7	J 8	J 14	J 15	J 21	J 22	J 25	J 28	J 29	J 30	
1	G -		G P		G P			G P			4.21
2	G P		G P		G P			G P			3.25
3	G -		G N		G P			G N			3.90
4	G P		G P		NG P	NG P	NG P	G P			4.33
5	G N		G P	+	-			-			-
6	G P		G P	+	-			-			-
7	G P		G P		G P			G P			2.90
8	G -		G P		NG P	+		-			-
9	G P		NG P	G P	G P	+		-			-
10	G P		G P		G P			G P			2.83
11	G P		G P		G P			G P			4.35
12	G P		G P		G P			NG P	NG P	G P	2.71
13	G P		G P		G P			G P			3.53
14	G P		G -		G P			G P			3.48
15	G P		G P		G P			G N			2.00
16	G N		NG N	+	-			-			-
17	G P		NG N	+	-			-			-
18	G P		G N		NG N	NG N	NG N	+			-
19	G P		G P		NG P	+		-			-
20	G -	+	-		-			-			-
21	G N		G P		NG P	NG N	NG N	NG N	+		-
22	G P		NG P	+	-			-			-
23	G P		NG N	G P	NG N	NG N	G P	NG N	+		-
24	G P		NG P	+	-			-			-
25	G P		G -		G P			G P			4.50
26	G P	+	-		-			-			-
27	G P		NG P	+	-			-			-
28	G P		NG N	+	-			-			-
29	NG N	G -	G P		G P			G P			5.44
30	NG P	G -	G P		G N			G N			6.00
% transmission positive	88		91		95			79			moyenne 5.00

Abréviations : NG : moustique non gorgé. P : transmission positive. + : moustique mort. G : moustique gorgé. N : transmission négative.

TABLEAU IV
Expérience B : Transmission du virus Zika par *Aedes aegypti*.
Résultats en fonction du titre de virus chez le moustique.

N° du moustique	Titre de virus (logarithme)	Transmission				% de transmission au cours des 4 repas
		1 ^{er} repas	2 ^e repas	3 ^e repas	4 ^e repas	
15	2.00	P	P	P	N	94
12	2.71	P	P	P	P	
10	2.83	P	P	P	P	
7	2.90	P	P	P	P	
2	3.25	P	P	P	P	86
14	3.48	P	-	P	P	
13	3.53	P	P	P	P	
3	3.90	-	N	P	N	
1	4.21	-	P	P	P	100
4	4.33	P	P	P	P	
11	4.35	P	P	P	P	
25	4.50	P	-	P	P	
29	5.44	-	P	P	P	71
30	6.00	P	P	N	N	

Abréviations : P : transmission positive. - : résultat non observé. N : transmission négative.

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE COMPARÉE DES VIRUS AMARIL ET ZIKA

TABLEAU V

Expérience C : Transmission du virus amaril par *Aedes aegypti* infecté par voie orale. Résultats moustique par moustique.

Repas - jour N° du moustique	1 ^{er} repas		2 ^e repas		3 ^e repas		Nombre de DL50 par moustique (valeur logarithmique)
	J 7	J 8	J 14	J 21	J 22	J 22	
1	GN		GN	GN +			—
2	GN		GN	GN			3.00
3	GN		GP +	—			—
4	GN		GN	GN			P < 2.00
5	GN +		—	—			—
6	GN		GN	GP			3.30
7	GN +		—	—			—
8	GN		GN	GN			2.71
9	GN +		—	—			—
10	GN +		—	—			—
11	GN +		—	—			—
12	GN		GP	GP			4.26
13	GN		GN	GP			3.66
14	GN		NGP +	—			—
15	GN +		—	—			—
16	G- +		—	—			—
17	GN		GN	GN +			—
18	GN		GN	GN			P < 2.00
19	GN +		—	—			—
20	GN		GN	GN			4.75
21	GN		GP	GP			3.71
22	NGN	GN	GP	NGP	GP		2.69
% transmission positive	0		36		42		Moyenne 3.95

Abréviations : NG : moustique non gorgé. P : transmission positive. + : moustique mort. G : moustique gorgé. N : transmission négative.

TABLEAU VI

Expérience C : Transmission du virus amaril par *Aedes aegypti* infecté par voie orale. Résultats en fonction du titre de virus chez le moustique.

N° du moustique	Titre du virus (logarithmique)	Transmission			% de transmission au cours des deux derniers repas
		1 ^{er} repas	2 ^e repas	3 ^e repas	
4	< 2.00	N	N	N	0
18	< 2.00	N	N	N	
22	2.69	N	P	P	50
8	2.71	N	N	N	
2	3.00	N	N	N	50
6	3.30	N	N	P	
13	3.66	N	N	P	
21	3.71	N	P	P	
20	4.75	N	N	N	0

Abréviations : P : transmission positive. — : résultat non observé. N : transmission négative.

une nouveauté : la transmission du virus amaril est nulle au 7^e jour chez les moustiques infectés par voie digestive, faible au 9^e jour chez les moustiques infectés par voie parentérale (15 %); par contre avec le virus Zika, la transmission est élevée dès le 7^e jour (88 %). Dans la nature la transmission du virus amaril nécessitera donc une longévité plus grande des vecteurs, ce qui diminue évidemment ses chances de succès.

– Un moustique infecté ne transmet pas obligatoirement; ceci est particulièrement net dans l'expérience C où moins de 50 % des moustiques ont transmis pendant les 3 semaines qui ont suivi l'infection.

– Un moustique ayant déjà transmis ne transmettra pas obligatoirement au cours des repas ultérieurs. Avec le virus amaril (expérience A) et en se référant au 2^e repas où la transmission a été maximale, 30 % des repas ultérieurs n'ont pas permis la transmission; avec le virus Zika (expérience B), en se référant au 1^{er} repas, ce pourcentage n'est que de 11 %. De plus la transmission apparaît comme irrégulière, certains moustiques ayant transmis aux 2^e et 4^e repas n'ont pas transmis au 3^e repas. Ces constatations s'inscrivent donc en faux contre l'hypothèse parfois émise qu'un moustique infecté reste infectant pendant toute la durée de sa vie.

Résultats demandant confirmation

– Le taux de transmission semble baisser avec le temps écoulé après l'infection du moustique. Dans l'expérience A le taux de transmission maximum au 2^e repas (80 %) a ensuite diminué au cours des 3^e (60 %) et 4^e repas (50 %); avec le virus Zika il a été sensiblement identique au cours des trois premiers repas (88 %, 91 % et 95 %) pour s'abaisser légèrement au 4^e repas (79 %). Si cette observation se trouvait confirmée, elle signifierait que, passé le délai d'incubation, la transmission est beaucoup moins efficace avec le virus amaril qu'avec le virus Zika. Cette baisse du taux de transmission avait déjà été observée par Chamberlain et Sudia (1955) pour l'encéphalite équine orientale (EEE) et par McIntosh et Jupp (1970) pour le virus chikungunya.

Cette baisse du taux de transmission permet de se demander si le virus n'aurait pas un certain pouvoir pathogène sur le moustique; il n'est pas impossible que la multiplication du virus provoque la destruction de certaines cellules des glandes salivaires, ce qui pourrait entraîner la diminution ou la suppression de la fabrication de la salive; ceci aurait évidemment un effet sur la transmission. Notons que dans les expériences B et C les moustiques les plus infectés (B 30 et C 20) ont peu ou pas transmis : peut-être la grande quantité de virus a-t-elle entraîné une destruction rapide des glandes salivaires !

– Avec le virus amaril (expérience A), il semble que la recharge en virus de la salive demande un certain délai : quatre moustiques ont transmis par simple son-

dage, sans qu'il y ait eu repas de sang; deux de ces moustiques ont également transmis le lendemain en se gorgeant (moustiques A 3 au 3^e repas, A 4 au 2^e repas); par contre les deux autres n'ont pas transmis le lendemain (A 26 au 2^e repas) ou le surlendemain (A 13 au 4^e repas), malgré un repas de sang complet. Ce phénomène n'a pas été observé avec le virus Zika que deux moustiques ont transmis régulièrement pendant trois jours consécutifs (B 4 au 3^e repas, B 12 au 4^e repas).

– Avec le virus amaril (expérience A), il semble y avoir une relation entre la transmission et la quantité de virus contenue dans le moustique. Cette relation, si elle se confirme, n'est que statistique car elle comporte des exceptions : le moustique A 25 peu infecté a bien transmis et le moustique A 14 bien infecté, n'a jamais transmis; il pourrait également y avoir une limite supérieure à cette relation, lorsque le moustique contient beaucoup de virus (B 30 et C 20).

CONCLUSIONS

L'incubation chez le moustique du virus amaril est plus longue que celle du virus Zika. Passé ce délai d'incubation, la transmission n'a pas obligatoirement lieu à chaque piqûre et il semble qu'elle soit sensiblement moins efficace avec le virus amaril.

On ne peut évidemment extrapoler ces résultats, obtenus dans des circonstances expérimentales très particulières, à ce qui se passe dans la nature où les vecteurs et les modes de contamination sont différents. Cette faible efficacité de la transmission du virus amaril expliquerait cependant assez bien la moindre fréquence des poussées dues à ce virus au Sénégal Oriental; rappelons que cette région est caractérisée par une courte saison d'activité des vecteurs et un nombre important de singes qui ne reçoivent de ce fait que relativement peu de piqûres (Cornet *et al.*, 1978); dans ces conditions le virus Zika aurait un cycle d'amplification plus rapide et les poussées épizootiques pourraient se produire même avec une proportion importante de singes immunisés, comme cela a été le cas en 1976; avec le virus amaril le cycle d'amplification, plus lent, ne pourrait aboutir à une poussée épizootique que si la quasi-totalité des singes est réceptive, ce qui allongerait la périodicité de ces poussées.

Il nous semble donc utile de poursuivre ce type d'expérimentation en se rapprochant le plus possible des conditions naturelles. Les résultats obtenus, joints aux observations recueillies sur le terrain, devraient nous permettre de mieux saisir les mécanismes de circulation des virus.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. J. Dejardin, Biométricien des Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M., qui a

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE COMPARÉE DES VIRUS AMARIL ET ZIKA

bien voulu se charger de la lourde tâche consistant à essayer d'analyser statistiquement les résultats de cette expérimentation.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'O.R.S.T.O.M. le 11 juin 1979.

BIBLIOGRAPHIE

- CHAMBERLAIN (R. W.) & SUDIA (W. D.), 1955. — The effects of temperature upon the extrinsic incubation of eastern equine encephalitis in mosquitoes. *Am. J. Hyg.*, 60: 269-277.
- CORNET (M.), CHATEAU (R.), VALADE (M.), DIENG (P. L.), RAYMOND (M.) & LORAND (A.), 1978. — Données bioécologiques sur les vecteurs potentiels du virus amaril au Sénégal Oriental. Rôle des différentes espèces dans la transmission du virus. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVI, n° 4: 315-341.
- CORNET (M.), DEJARDIN (J.), JAN (C.), COZ (J.), ADAM (C.) & VALADE (M.), 1977. — Note technique sur l'isolement des arbovirus par inoculation au souriceau. Préparation des broyats de moustiques. *Bull. Soc. Path. exot.*, 70, 2: 137-143.
- COZ (J.), VALADE (M.), CORNET (M.), LEMOINE (M. O.) & LORAND (A.), 1977. — Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XV, n° 3: 209-212.
- FLEURY (H.), ADAM (C.), CORNET (M.) & VALADE (M.), 1978. — Emploi du polyéthylène glycol pour l'obtention d'une suspension concentrée de virus amaril utilisable pour l'étude du pouvoir vecteur des moustiques. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVI, n° 1: 29-32.
- GERMAIN (M.), SUREAU (P.), HERVÉ (J. P.), FABRE (J.), MOUCHET (J.), ROBIN (Y.) & GEOFFROY (B.), 1976. — Isolements du virus de la fièvre jaune à partir d'*Aedes* du groupe *africanus* (Theobald) en République Centrafricaine. Importance des savanes humides et semi-humides en tant que zone d'émergence du virus. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIV, n° 2: 125-139.
- McINTOSH (B. M.) & JUPP (P. G.), 1970. — Attempts to transmit chikungunya virus with six species of mosquitoes. *J. med. Ent.*, 7: 353-356.
- ROSEN (L.) & GUBLER (D.), 1974. — The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 23: 1153-1160.