

Note sur la technique de neutralisation de l'ixovotoxine permettant l'inoculation d'œufs de tiques au souriceau

Jean-Louis CAMICAS ⁽¹⁾, Jean-François SALUZZO ⁽²⁾,
Jean-Paul CORNET ⁽³⁾

Résumé

Les auteurs apportent quelques précisions et rectifications à la technique de neutralisation de l'ixovotoxine permettant l'inoculation de broyats d'œufs de tiques aux souriceaux, publiée par Cornet et al. en 1978. Ils montrent que l'immunisation obtenue est en réalité très faible et que seule compte la dilution du broyat d'œufs inoculé aux souriceaux qui doit être utilisé à une concentration ne dépassant pas 0,25 %. Dans ce cas il n'est pas nécessaire de faire subir un quelconque traitement préalable aux souris. Il faut seulement prendre la précaution d'inoculer plusieurs portées avec le même broyat en raison des grandes différences de sensibilité à la toxine observées d'une portée à l'autre.

Mots-clés : Ixovotoxine — Inoculation — Broyats d'œufs — Tiques — Souriceaux — Arborivirus.

Summary

ABOUT THE TECHNIQUE OF NEUTRALIZATION OF IVOTOXIN FOR THE INOCULATION OF TICK EGGS TO SUCKLING MICE. *The authors give some corrections to the technique of neutralization of the ixovotoxin for the inoculation of tick eggs to suckling mice published by Cornet et al. in 1978. There is only a very slight immunization of the mice and the only important point is the dilution of the egg-grinding injected to the suckling mice that must be used at a concentration not higher than 0.25 p. cent. It must be stressed that in this case it is not necessary to treat the mice. It is only necessary to inoculate several litters of mice because of great differences of sensibility to the toxin.*

Key words : Ixovotoxin — Inoculation — Egg grinding — Ticks — Suckling mice — Arbovirus.

En 1978, Cornet *et al.*, ont décrit une technique destinée à protéger les souriceaux nouveau-nés contre l'ixovotoxine présente dans les œufs de tiques.

Ayant essayé, à plusieurs reprises, d'utiliser cette technique à l'Institut Pasteur de Dakar, l'un d'entre nous s'est heurté à des échecs répétés. Elle a donc été reconsidérée en détail avec la collabo-

ration de son auteur principal et il ressort de nos contrôles que la publication citée plus haut contenait des erreurs portant sur la préparation de l'inoculum ainsi que diverses imprécisions, la plus importante tenant à la concentration du broyat d'œufs de tique pouvant être injectée aux souriceaux.

(1) Laboratoire d'Entomologie médicale, O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

(2) Laboratoire d'Écologie virale, Institut Pasteur, B.P. 220, Dakar.

(3) Laboratoire d'Entomologie médicale, O.R.S.T.O.M., B.P. 893, Bangui, R.C.A.

1. Technique d'immunisation corrigée de Cornet et al.

1.1. PRÉPARATION DE L'INOCULUM

Dix centigrammes (0,10 g) d'œufs prélevés dans une ponte de la tique *Amblyomma variegatum* (Fab.) sont broyés dans 2 ml de liquide de Hanks albuminé à 0,75 %. Le broyat est dilué au 1/10 puis filtré sur membrane Millipore de 450 nm. Le filtrat constitue l'inoculum.

1.2. IMMUNISATION DES SOURIS FEMELLES

Au jour Jo, on injecte par voie intrapéritonéale 0,05 ml d'inoculum à des jeunes femelles vierges âgées de 3 mois environ.

Au jour J18, les femelles sont mises en présence d'un mâle.

Au jour J21, on pratique une deuxième injection intrapéritonéale de 0,05 ml d'inoculum.

Ce protocole diffère de celui de Cornet *et al.* par la concentration de l'inoculum qui est ici le dixième de celle qu'ils préconisent.

Dans les conditions que prescrivaient ces auteurs (broyat d'œufs à 5 %), on observe une mortalité de plus de 50 % des souris inoculées.

2. Inoculation des œufs de tiques aux souriceaux nouveau-nés

Les souriceaux issus des femelles traitées ne supportent pas l'inoculation de n'importe quelle concentration de broyat d'œufs de tiques. Dans une publication ayant trait à l'isolement d'une souche de virus amaril à partir d'œufs d'*A. variegatum*, Saluzzo *et al.*, (1980) précisent au paragraphe des méthodes d'isolement qu' : « Une fraction de chaque ponte (0,1 g) a été broyée dans 4 ml de milieu de Hanks à 0,75 % d'albumine bovine additionné d'antibiotiques, diluée au 1/10 puis filtrée sur membrane Millipore de 450 nm et inoculée par voie mixte, en intracérébrale (0,02 ml) et en intrapéritonéale (0,01 ml) à 6 souriceaux immunisés ».

3. Étude critique de la technique d'immunisation

Deux facteurs sont susceptibles d'expliquer le caractère non reproductible de la technique de Cornet *et al.* :

— la concentration de l'inoculum injecté aux souriceaux,

— une différence de sensibilité naturelle à l'ixovotoxine, de la part des souches de souris blanches des Instituts Pasteur de Bangui et de Dakar.

D'une façon générale, la mortalité des souriceaux due à l'ixovotoxine se manifeste très tôt et ne varie généralement plus au-delà du cinquième jour (J5) après l'inoculation. De ce fait, dans les expérimentations rapportées ci-après, nous n'avons attribué à l'ixovotoxine que la mortalité des souriceaux se produisant dans les cinq jours suivant l'inoculation.

Parallèlement à l'injection de broyats d'œufs de tiques, nous avons inoculé 100 souriceaux témoins avec du liquide de Hanks et n'avons noté que 17 % de mortalité.

3.1. EFFET DE LA CONCENTRATION DE L'INOCULUM INJECTÉ AUX SOURICEAUX J2

Broyat d'œufs à 5 % (0,10 g d'œufs broyés dans 2 ml de Hanks)

Les souriceaux testés appartiennent à la souche de souris blanches de Bangui traitées par la méthode de Cornet *et al.* (12 spécimens), à la souche de Dakar traitée (61) et à la souche Dakar non traitée (5) :

inoculés : 78
% mortalité : 100

Avec les autres concentrations d'inoculum, les souriceaux testés appartiennent tous à la souche Dakar non traitée.

Broyat d'œufs à 2,5 %

inoculés : 5
 survivants : 0

Broyat d'œufs à 1,25 %

inoculés : 8
 survivants : 0

Broyat d'œufs à 0,50 %

	expérience 1	expérience 2	moyenne
inoculés :	49	100	149
survivants :	16	8	24
morts :	33	92	125
% mortalité :	67	92	84

On note une nette différence dans le pourcentage de mortalité suivant les portées provenant d'une même souche de souris blanches.

Broyat d'œufs à 0,25 %

	expérience 1	expérience 2	moyenne
inoculés :	47	100	147
survivants :	20	64	84
morts :	27	36	63
% mortalité :	57	36	43

On remarque que cette concentration correspond à peu près à la DL 50 et l'on note de nettes différences de sensibilité entre les souris provenant d'une même souche.

Broyat d'œufs à 0,13 %

inoculés :	10
survivants :	7

Broyat d'œufs à 0,06 %

inoculés :	20
survivants :	17

3.2. VARIATION INDIVIDUELLE DE SENSIBILITÉ DANS LES PORTÉES DE SOURICEAUX

Les souriceaux J2 sont inoculés par voie intracérébrale avec 0,02 ml de suspension de broyat d'œufs à 0,25 % et l'on note, pour chaque portée, le nombre de morts à J5 rapporté au nombre d'individus inoculés.

Souris Bangui RFI traitées (1)

0/10, 0/3, 2/2, 0/1, 0/5, 1/8, 0/2, 0/3, 7/8, 4/7, 0/4, 0/5, 0/9, 0/6, 1/10, 0/3.

Souris Dakar non traitées expérience 1

2/9, 7/9, 9/9, 3/7, 2/6.

Souris Dakar non traitées, expérience 2

0/10, 3/10, 8/10, 3/10, 1/10, 8/10, 2/10, 0/10, 7/10, 5/10.

On constate, dans les portées, une très forte variation individuelle de la résistance à l'inoculation de broyats d'œufs de tiques. Celle-ci entraîne, chez les souriceaux inoculés, des différences de survie supérieures à celle qu'objective la pratique de l'immunisation préalable suivant la technique de Cornet *et al.*

3.3. EFFET DE LA TECHNIQUE D'IMMUNISATION DE CORNET *et al.*3.3.1. *Survie à J5 des souriceaux inoculés avec un broyat d'œufs à 0,50 %**Souris Bangui non traitées*

inoculés :	56
survivants :	11
morts :	45
% mortalité :	80

Souris Bangui immunisées par la technique de Cornet et al.

inoculés :	96
survivants :	29
morts :	67
% mortalité :	70

On note ici une faible différence de survie entre souriceaux traités et non traités. Cette différence est inférieure à celle que l'on observe entre les diverses souris d'une même souche (cf. 3.3.2 : souris Dakar non traitées).

Si l'on rapproche ces résultats de ceux obtenus avec des souris non traitées de la souche Dakar (cf. 3.1.), on peut noter qu'il n'y a pas de différence significative dans la résistance des souches de souris, qu'elles soient originaires de Dakar ou de Bangui.

3.3.2. *Survie à J5 des souriceaux inoculés avec un broyat d'œufs à 0,25 %**Souris Dakar non traitées*

	expérience 1	expérience 2	moyenne
inoculés :	47	100	147
survivants :	20	64	84
morts :	27	36	63
% mortalité :	57	36	43

Souris Dakar immunisées par la technique de Cornet et al.

inoculés :	82
survivants :	56
morts :	26
% mortalité :	32

Il n'y a pas de différence très significative entre les résultats obtenus avec les souriceaux nés de souris non traitées lors de la deuxième expérience

(1). Souris RFI : souris adultes correspondant à d'anciens souriceaux ayant survécu à l'inoculation de suspension de broyat d'œufs à 0,25 %.

(36 % de mortalité) et ceux obtenus avec les souriceaux immunisés par la technique de Cornet *et al.* (32 % de mortalité).

3.4. EFFET DE LA SÉLECTION DES SOURIS

Survie à J5 des souriceaux inoculés avec un broyat d'œufs à 0,25 %

souche Dakar immunisée

inoculés : 82
survivants : 56
morts : 26
% mortalité : 32

souche Bangui RFI immunisée

inoculés : 87
survivants : 71
morts : 16
% mortalité : 18

Les résultats rapportés ici le sont à titre indicatif car la sélection n'a porté que sur une génération et l'on se doit donc d'être prudent dans les conclusions. Il semble néanmoins que l'on puisse espérer améliorer la survie des souriceaux en sélectionnant les souches de souris.

4. Conclusion

A la suite de cette étude on peut affirmer que, si l'on veut inoculer des broyats d'œufs de tiques à des souriceaux de 2 jours pour mettre en évidence d'éventuels virus dans les œufs, il faut avant tout utiliser une suspension de broyat d'œufs à 0,25 % (0,10 g d'œufs broyés dans 4 ml de liquide de Hanks, puis dilution au 1/10). Il est prudent d'inoculer plusieurs portées de souriceaux en raison de la grande variabilité dans la survie d'une portée à l'autre.

C'est ici le lieu de remarquer que l'isolement d'une souche de virus de la fièvre jaune à partir d'une ponte d'*A. variegatum* (Germain *et al.*, 1979) a été obtenue à la suite de l'inoculation aux souriceaux d'une suspension de broyat d'œufs à 0,25 % (Saluzzo *et al.*, *op. cit.*).

Il n'est pas nécessaire d'utiliser la technique d'immunisation de Cornet *et al.* car la diminution du pourcentage de mortalité des souriceaux, si elle semble mériter une étude statistique pour juger de sa réalité, est beaucoup trop faible pour justifier les manipulations assez fastidieuses qu'elle introduit dans la pratique virologique. De plus, il faut insister sur le fait que la sensibilité de cette technique apparaît faible en raison de la dilution nécessaire du broyat initial. En effet, on dilue 0,10 g d'œufs (soit 600 à 800 œufs) dans un volume total de 40 ml de liquide de Hanks albuminé et l'on inocule 0,02 ml de cette solution au souriceau ce qui représente 1/2000 de la masse d'œufs initiale. Ceci nécessite en conséquence un titre supérieur ou égal à 10 000 DL50 souriceau dans une ponte d'*A. variegatum* afin de permettre la détection du virus.

Pour pallier cet inconvénient, nous mettons actuellement au point une technique d'enrichissement par inoculation de 0,5 à 1 microlitre de suspension de broyat d'œufs à 5 % à des imagos d'*A. variegatum*.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Dr Max Germain qui a bien voulu faire une critique constructive de notre manuscrit.

*Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.
le 6 octobre 1983*

BIBLIOGRAPHIE

- CORNET (J. P.), HERVÉ (J. P.), FABRE (J.) *et al.*, 1978. — Technique de neutralisation de l'ixovotoxine permettant l'inoculation d'œufs de tiques au souriceau. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVI, n° 1 : 53-54.
- GERMAIN (M.), SALUZZO (J. F.), CORNET (J. P.) *et al.*, 1979. — Isolement du virus de la fièvre jaune à partir de la ponte et des larves d'une tique *Amblyomma variegatum*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* (sér. D), 239 : 635-637.
- SALUZZO (J. F.), HERVÉ (J. P.), SALAÜN (J. J.) *et al.*, 1980. — Caractéristiques des souches du virus de la fièvre jaune isolées des œufs et des larves d'une tique *Amblyomma variegatum* récoltée sur le bétail à Bangui (Centrafrique). *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 131E : 155-165.