

# Emploi du polyéthylène glycol pour l'obtention d'une suspension concentrée de virus amaril sauvage utilisable pour l'étude du pouvoir vecteur des Moustiques

Hervé FLEURY \*  
Catherine ADAM \*  
Michel CORNET \*\*  
Michel VALADE \*\*\*

## RÉSUMÉ

Une souche sauvage du virus amaril, cultivée sur cellules de rein de porc PS-2, a été concentrée par la méthode de « précipitation » au polyéthylène glycol avant d'être utilisée avec succès dans l'infection par voie digestive d'*Aedes aegypti*.

MOTS CLÉS : *Aedes* — Transmission — Fièvre jaune.

## ABSTRACT

A wild strain of yellow fever virus, cultivated in pig kidney cells PS-2, was concentrated by the polyethylene glycol "precipitation" method and successfully used for infection of *Aedes aegypti* by the digestive route.

KEY WORDS : *Aedes* — Transmission — yellow fever.

L'étude du pouvoir vecteur des moustiques pour le virus amaril et leur infection par voie digestive nécessitent l'obtention de suspensions de souches sauvages du virus amaril à des titres élevés et connus.

La « précipitation » par le polyéthylène glycol, décrite par Hebert en 1963 comme une excellente méthode de concentration de virus des plantes a été ensuite appliquée aux bactériophages (Yamamoto *et al.*, 1970) puis largement étendue aux virus animaux, parmi lesquels des arbovirus tels que le virus de l'Encéphalite japonaise (Igarashi *et al.*, 1973) et le virus Sindbis (Inglot *et al.*, 1973). C'est cette méthode que nous avons utilisée pour la concentration d'une souche sauvage du virus amaril.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Souche sauvage de virus amaril

Il s'agit de la souche Ar B 5967 isolée à Bozo (Empire Centrafricain) en 1974 (Germain *et al.*) d'un mélange

d'*Aedes africanus* et *opok*. Cette souche a été passée sur *Aedes aegypti* par inoculation intrathoracique, puis inoculée au souriceau nouveau-né par voie intra-cérébrale; une suspension à 10 % de matière cérébrale a été préparée par broyage dans un tampon isotonique à pH 7,4 supplémenté avec 0,75 % d'albumine bovine puis centrifugée pendant 15 minutes à 2 500 g; le surnageant, titrant 10<sup>6</sup>,<sup>45</sup> DL 50 souriceau/ml a été réparti en ampoules de 0,3 ml (contenant donc chacune 10<sup>4</sup>,<sup>93</sup> DL 50) qui ont été placées à —80 °C jusqu'à leur utilisation.

### Culture du virus amaril sur cellules PS-2 et concentration par le PEG

Les cellules de la lignée continue PS-2 (Westaway, 1966), reçues à leur 18<sup>e</sup> passage, ont été utilisées en effectuant moins de 50 passages à partir des ampoules de réserve conservées à —70 °C; le milieu de culture est le Leibovitz L 15 supplémenté avec 3 % de sérum foetal

\* Laboratoire des arbovirus, Institut Pasteur, B.P. 220, Dakar, Sénégal.

\*\* O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

de veau (SFV) et additionné d'antibiotiques (25 µg de fungizone, 10 000 unités de pénicilline et 10 000 µg de streptomycine pour 100 ml de milieu).

Au cours d'une première expérimentation visant à déterminer l'importance de l'inoculum viral et du jour de prélèvement pour l'obtention du meilleur titre de virus dans le surnageant de PS-2 infectées, nous avons inoculé 4 flacons de Roux présentant un tapis cellulaire continu ( $400 \times 10^6$  cellules/flacon) avec 1 ampoule, 2, 4 et 8 ampoules de virus amaril (c'est-à-dire,  $10^{-3,7}$ ,  $10^{-3,4}$ ,  $10^{-3,1}$  et  $10^{-2,8}$  DL 50/cellule). Après mise en contact du virus et du tapis cellulaire pendant 1 heure à 37 °C, le tapis cellulaire a été lavé et 45 ml de milieu L 15 3 % SFV ajoutés dans chaque flacon avant incubation à 37 °C; aux 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours post-inoculation (PI), le surnageant a été prélevé, congelé à -80 °C et remplacé par 45 ml de milieu neuf; puis, après décongélation, les surnageants ont été clarifiés à 4 000 g, 4 °C, pendant 20 minutes avant d'être titrés sur PS-2 par la méthode des plages.

Au cours de la deuxième manipulation, 12 flacons plastiques de 250 ml, présentant un tapis continu de PS-2, ont été ensemencés par la souche sauvage du virus amaril à un titre de  $10^{-3,7}$  DL 50/cellule. Après mise en contact de la suspension virale et du tapis cellulaire pendant 1 heure à 37 °C, le tapis a été lavé et 11 ml de milieu L 15 3 % SFV ajoutés dans chacune des boîtes avant incubation à 37 °C; aux 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours PI, les surnageants ont été recueillis, groupés en lots de 132 ml (A: 5<sup>e</sup> jour, B: 6<sup>e</sup> jour et C: 7<sup>e</sup> jour), congelés à -80 °C et remplacés par 11 ml de milieu neuf. Les 3 lots ont été ultérieurement décongelés et les suspensions centrifugées à basse vitesse (4 000 g) pendant 20 minutes à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires; 0,5 ml de chaque lot (A 1, B 1, C 1) ont alors été congelés à -80 °C. 120 ml des lots A, B et C ont reçu 2,5 g de NaCl afin d'obtenir une suspension à 0,5 M/l de NaCl (8 g de NaCl sont déjà présents dans 1 litre de milieu L 15 c'est-à-dire  $\approx 1$ g/120 ml; 0,5 M/l de NaCl correspond à la présence de  $\approx 29$  g de NaCl/litre donc 3,5 g de NaCl/120 ml; on a donc rajouté la différence entre 3,5 g et 1 g soient 2,5 g de NaCl). Puis on a ajouté à A, B et C respectivement 9 g, 12 g et 15 g de PEG de PM 6 000 (correspondant à une concentration finale de 7,5, 10 et 12,5 % de PEG). Après agitation à 4 °C pour dissoudre le PEG, les suspensions ont été abandonnées à 4 °C pendant 5 heures avant d'être centrifugées à 10 000 g pendant 30 minutes à 4 °C; après élimination du surnageant, le culot a été repris dans 1 ml de milieu L 15 et congelé à -80 °C (suspensions A 2, B 2, C 2).

TABLEAU I. — Importance de l'inoculum viral et du jour de prélèvement pour l'obtention du meilleur titre de virus amaril dans le surnageant de cellules PS-2 infectées.

	(1)	(2)	(3)	(4)
3 J PI	$10^{2,3}$	$10^{2,3}$	$10^{2,5}$	NT
4 J	$10^{4,2}$	$10^{4,1}$	$10^{4,3}$	$10^{4,7}$
5 J	$10^{5,2}$	$10^{5,0}$	$10^{5,6}$	$10^{5,4}$
6 J	$10^{5,8}$	$10^{5,5}$	$10^{5,5}$	$10^{5,8}$
7 J	$10^{5,7}$	$10^{6,1}$	$10^{5,0}$	$10^{5,1}$
8 J	$10^{4,8}$	$10^{4,6}$	$10^{4,4}$	$10^{4,5}$

PI : post-inoculation.

Inoculum viral :

(1)  $10^{-3,7}$  DL 50/cellule

(2)  $10^{-3,4}$  DL 50

(3)  $10^{-3,1}$  DL 50

(4)  $10^{-2,8}$  DL 50

NT : non testé.

Les titres viraux sont exprimés en UFP/ml.

Les suspensions A 1, B 1, C 1 et A 2, B 2, C 2 ont été ultérieurement décongelées et titrées sur PS-2 par la méthode des plages.

#### Titration des suspensions virales par la méthode des plages sur PS-2 en microplaques

0,05 ml des dilutions virales sont répartis dans les cupules de plaques Linbro FB 96 TC à raison de 4 cupules par dilution. On ajoute alors 0,05 ml d'une suspension de PS-2 en milieu Leibovitz (600 000 cellules/ml) dans chaque cupule. Les plaques sont recouvertes et incubées pendant 4 heures à 37 °C. Après incubation, on ajoute 0,1 ml de milieu recouvrant (L 15 47 %, SFV 3 % et carboxyméthyl cellulose à 3,2 %, 50 %). On incube à 37 °C. La lecture est effectuée 5 jours plus tard après coloration du tapis cellulaire au noir amido. Le logarithme décimal du titre est calculé sur 2 à 3 dilutions consécutives.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

La première expérimentation dont les résultats sont consignés dans le tableau I indique que la production de virus amaril sauvage par les cellules PS-2 est supérieure à  $10^5$  UFP/ml au cours des 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours

## EMPLOI DU POLYÉTHYLÈNE GLYCOL

PI et ce quel que soit l'importance de l'inoculum viral. En outre, l'inoculum ne semble pas avoir une grande incidence sur l'obtention du titre le plus élevé. En conséquence, devant la nécessité de ne pas épuiser le stock de virus amaril propagé sur cerveau de souriceau, les inoculums viraux utilisés seront faibles ( $10^{-3,7}$  DL 50/cellule); la récolte des surnageants de cellules PS-2 infectées aura lieu aux 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours PI.

La deuxième manipulation (tabl. II) montre qu'en présence de 0,5 M/l de NaCl, le polyéthylène glycol permet de concentrer le virus amaril; pour 7,5 % et 10 % de PEG 6 000, l'augmentation du titre est de 1,8 logarithme décimal et la concentration pratique de 64 (concentration théorique : 120); pour 12,5 %, l'augmentation de titre est de 2 logarithmes et la concentration pratique de 100. Sans pouvoir affirmer sur la base de cette seule expérimentation que la différence entre 1,8 et 2 logarithmes est significative, il est cependant intéressant de noter que l'utilisation du PEG, que ce soit à 7,5 %, 10 % ou 12,5 %, permet et doit permettre l'obtention de suspensions virales à des titres compris entre  $10^7$  UFP/ml et  $10^{8,5}$  UFP/ml après décongélation, donc directement utilisables pour l'infection de moustiques par voie digestive.

Nous avons d'ailleurs voulu étudier la possibilité d'utiliser une telle solution concentrée de virus amaril pour l'évaluation du pouvoir vecteur d'*Aedes aegypti*. Cette solution, tirant  $10^{7,9}$  UFP/ml après concentration par 10 % de PEG, a été diluée au  $1/5^e$  dans du sang défibriné de lapin et placée dans des œufs préalablement ouverts aux deux extrémités et vidés en laissant la membrane de la poche à air; les œufs ont été placés sur un cylindre de plastique transparent contenant des moustiques mis à jeûner depuis 24 heures; la suspension était chauffée par une petite ampoule électrique de

4,5 volts (1). Le titre de la suspension était de  $10^{7,40}$  DL 50 souriceau/ml au début du repas et  $10^{7,00}$  DL 50/ml à la fin du repas, 4 heures plus tard.

Nous avons obtenu 29 moustiques gorgés ou semi gorgés qui ont été conservés vivants à 28 °C et 80 à 90 % d'humidité relative. Le lendemain, 7 de ces moustiques étaient morts et on ne peut éliminer une éventuelle toxicité du PEG. Les moustiques restants ont piqué individuellement des souriceaux nouveau-nés après 7 jours, 14 jours et 21 jours, les souriceaux ayant été surveillés pour étudier la transmission. Au 26<sup>e</sup> jour, les moustiques encore vivants ont été tués, broyés individuellement dans 2 ml de solution tampon phosphatée albuminée à 0,75 % et inoculés à des dilutions décimales à des souriceaux nouveau-nés.

Au 26<sup>e</sup> jour, le taux d'infection observé chez les 10 moustiques restant était de 100 %. Ces moustiques contenaient entre moins de  $10^2$  DL 50 souriceau et  $10^{4,75}$  DL 50 avec une moyenne de  $10^{3,21}$ .

Le pourcentage de transmission a été de 0 % au 7<sup>e</sup> jour, 36 % au 14<sup>e</sup> jour, 42 % au 21<sup>e</sup> jour. Dans l'ensemble, ce sont les moustiques contenant plus de  $10^3$  DL 50 qui ont transmis. Toutefois, le moustique contenant  $10^{4,75}$  DL 50 n'a transmis à aucun des 3 repas.

Cette expérience montre donc que la solution de virus concentrée par le PEG peut rendre de grands services dans l'étude du pouvoir vecteur des différentes espèces de moustiques.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'O.R.S.T.O.M.  
le 29 septembre 1977.

## BIBLIOGRAPHIE

GERMAIN (M.) *et al.*, 1976. — Isolements du virus de la fièvre jaune à partir d'*Aedes* du groupe *A. africanus* (Theobald) en République centrafricaine. Importance des savanes humides et semi-humides en tant que zone d'émergence du virus amaril. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIV, n° 2 : 125-139.

HEBERT (T.T.), 1963. — Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology*, 53 : 361-366.

(1) Cette technique nous a été communiquée par les chercheurs du « Yale Arbovirus Research Unit ».

TABLEAU II. — Résultats de la concentration du virus amaril par 7,5 %, 10 % et 12,5 % de PEG.

Concentration de PEG	Titre avant et après PEG	Différence de logarithmes	Concentrations théorique et pratique
Lot A : 7,5 %	A1 $10^{5,7}$ UFP/ml A2 $10^{7,5}$	1,8	120,64
Lot B : 10 %	B1 $10^{6,1}$ B2 $10^{7,9}$	1,8	120,64
Lot C : 12,5 %	C1 $10^{5,1}$ C2 $10^{7,1}$	2,0	120,100

- IGARASHI (A.) *et al.*, 1973. — Purification of Japanese encephalitis virus grown in BHK 21 and Singh's *Aedes albopictus* cells by PEG précipitation. *Biken J.*, 16 (2) : 67-73.
- INGLOT (A.D.), CHUDZIO (T.), ALBIN (M.), 1973. — Analysis of Sindbis Virus and its soluble antigens in preparations concentrated by precipitation with PEG or ammonium sulfate. *Acta Virol.*, 17 (5) : 416-425.
- WESTAWAY (E.G.), 1966. — Assessment and application of a cell line from pig kidney for plaque assay and neutralization test with twelve groupe B arboviruses. *Amer. J. Epid.*, 84 : 439-456.
- YAMAMOTO (K.R.) *et al.*, 1970. — Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40 : 734-744.