

**NOTE TECHNIQUE SUR L'ISOLEMENT DES ARBOVIRUS
PAR INOCULATION AU SOURICEAU :
PRÉPARATION DES BROYATS DE MOUSTIQUES**

Par M. CORNET (1), J. DEJARDIN (2), C. JAN (3), J. COZ (4), C. ADAM (5)
et M. VALADE (6) (7).

La rareté des isollements de virus amaril obtenus à partir de broyats de moustiques capturés dans la nature pourrait avoir pour cause un manque de sensibilité du souriceau nouveau-né au virus. Pour en diminuer les effets, il convient d'éviter au maximum la perte de virus avant l'inoculation ; nous avons étudié en particulier les effets de la centrifugation et de la congélation-décongélation des broyats sur le taux de mortalité des souriceaux.

- (1) Médecin du Service de Santé des Armées, Entomologiste médical au Centre O. R. S. T. O. M. de Dakar-Hann, B. P. 1386, Dakar, Sénégal.
(2) Biométricien des Services Scientifiques Centraux de l'O. R. S. T. O. M., Bondy, France.
(3) Médecin du Service de Santé des Armées, Virologiste à l'Institut Pasteur de Dakar.
(4) Pharmacien du Service de Santé des Armées, Entomologiste médical au Centre O. R. S. T. O. M. de Dakar.
(5) Technicienne de laboratoire à l'Institut Pasteur de Dakar.
(6) Technicien d'Entomologie médicale au Centre O. R. S. T. O. M. de Dakar.
(7) Séance du 13 avril 1977.

IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. — LAVAL

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

17 FEV. 1978
M 9020 Ent-Ped
ex 1

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Le virus utilisé est une des souches isolée d'un malade lors de l'épidémie de Diourbel en 1965 (SH 1296) à son cinquième passage sur cerveaux de souris.

Les moustiques proviennent d'une souche d'*Aedes aegypti* (forme domestique) entretenus en insectarium depuis 1971.

Trente-huit *Aedes aegypti* ont été inoculés par voie intrathoracique à la minutie avec une suspension de virus amaril titrant $10^{-5,5}$. Après quinze jours d'incubation les moustiques ont été tués au froid (-70°C) et broyés un par un dans 2 ml. de solution tampon phosphatée albuminée à 0,75 0/0 (I).

(I) Préparation de la solution :

— Solution tampon phosphatée (T. P.) :

Phosphate disodique anhydre (Na^2HPO^4)	3 g. 20
Phosphate monosodique cristallisé ($\text{NaH}^2\text{PO}^4, 2\text{H}^2\text{O}$)	0 g. 39
Chlorure de sodium	6 g.
Eau distillée	1.000 ml.

— Solution tampon phosphatée albuminée à 0,75 0/0 (T. P. Alb.) :

Solution d'albumine bovine à 7 g. 5 pour 100 ml.	100 ml.
Solution tampon phosphatée.	900 ml.

Chaque broyat a été séparé en deux parties égales : la première a été inoculée par voie intracérébrale à une portée de neuf souriceaux nouveau-nés, sans aucun traitement préalable ; l'autre a été centrifugée (2.500 tours/minute pendant 10 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$), puis inoculée à une seconde portée de souriceaux.

Le reste des deux suspensions placé dans des tubes à hémolyse, a été congelé à -70°C pendant environ une semaine, puis décongelé rapidement sous le robinet et inoculé à deux nouvelles portées de souriceaux.

Il y a donc eu pour chaque broyat quatre inoculations :

- broyat non centrifugé, non congelé (pur) ;
- broyat centrifugé, non congelé (centri) ;
- broyat non centrifugé, congelé et décongelé (cg) ;
- broyat centrifugé, puis congelé et décongelé (centri-cg).

Les souriceaux ont été visités tous les jours et la mortalité notée. La spécificité de la mortalité a été vérifiée sur au moins un souriceau par broyat par le test de fixation du complément.

RÉSULTATS

Après examen, 13 broyats ayant provoqué une mortalité totale des souriceaux dans les 4 portées ont été éliminés de l'analyse ; le titre du virus était trop élevé et aucune information ne pouvait être recueillie sur l'effet des traitements.

La mortalité observée pour les 25 broyats restant est notée au tableau I. On remarque que le virus a été perdu 3 fois sur 25 après centrifugation, 8 fois après congélation-décongélation et 12 fois après centrifugation et congélation-décongélation. Comparées globalement par un test exact, ces trois proportions diffèrent ($P = 0,025$, significatif) sans que dans les comparaisons deux à deux on puisse mettre en évidence de différence entre centrifugation et congélation-décongélation d'une part et congélation-décongélation et centrifugation plus congélation-décongélation d'autre part.

TABLEAU I

Mortalité observée pour les 25 broyats analysés.

N°	Pur	Centri	Cg	Centri-cg
1	3/8	0/5	1/3	0/7
2	2/4	3/7	0/6	1/6
3	3/3	1/3	0/7	1/8
4	5/8	1/4	0/8	0/6
5	5/5	7/7	9/9	8/9
6	1/6	1/9	0/3	0/8
7	3/3	7/9	1/9	0/3
8	4/9	0/9	0/5	0/7
9	9/9	3/4	8/8	3/9
10	6/6	3/9	5/5	1/8
11	2/4	0/9	0/5	0/7
12	9/9	8/9	2/8	0/9
13	9/9	9/9	1/9	0/9
14	9/9	5/9	0/8	0/9
15	6/8	1/8	3/9	3/9
16	6/8	7/8	3/9	2/9
17	8/9	1/4	1/9	1/9
18	9/9	7/9	2/8	4/4
19	8/9	5/8	4/9	0/9
20	7/9	7/9	0/9	7/9
21	9/9	8/9	9/9	8/8
22	9/9	9/9	7/7	4/9
23	7/9	1/9	1/8	0/8
24	4/9	1/9	2/8	0/7
25	9/9	7/8	4/9	7/9
Total	152/189	102/192	63/191	50/197

Le premier chiffre indique le nombre de souriceaux morts, le second le nombre de souriceaux observés.

Une première analyse grossière par le χ^2 montre que globalement les 4 traitements donnent des proportions de mortalité différents ($\chi^2 = 139,3$ à 3 d. d. l. : hautement significatif). Cette première analyse est bien incomplète car elle ne permet pas, d'une part, de tester l'hypothèse d'absence d'interaction entre les deux facteurs centrifugation et congélation-décongélation, ni, d'autre part, de tenir compte d'éventuelles réponses différentielles des moustiques. Une analyse plus fine est donc indispensable ; cette dernière doit partir des résultats fournis individuellement par chaque moustique.

La première méthode d'analyse détaillée retenue a été celle des logits empiriques (Cox, 1972). Cette méthode a exacerbé l'hétérogénéité des réponses individuelles des moustiques et n'a donné aucun résultat utilisable ; une analyse fine des résidus a montré l'existence de groupes différents qu'il n'a pas été possible de réunir en entités homogènes. De plus, et il semble que ce soit là l'origine de l'échec, la variance réelle des logits peut très bien être différente de celle calculée sous le modèle binomial.

Une autre transformation a été utilisée pour l'analyse détaillée des réponses : la modification proposée par CHANTER (1975) à la classique transformation des proportions $y = \text{Arcsin } \sqrt{p}$ inutilisable ici du fait de l'inégalité et de la faiblesse de certaines des tailles des portées due à la mortalité initiale non spécifique. La modification utilisée est :

$$y = \text{Arc sin } \sqrt{c + (1 - 2c)p}$$

avec $c = 1/4 n$ (n : moyenne harmonique des tailles des portées) ; l'unité d'arc utilisée est le radian. Cette transformation a tamponné l'hétérogénéité, l'étude des résidus a montré qu'ils étaient normaux et homogènes.

Comme le montre l'analyse de la variance (Tableau II), il y a :

1° un effet « moustique » : en valeur moyenne les moustiques diffèrent, c'est presque une évidence ;

2° un effet « centrifugation » : la centrifugation diminue la mortalité des souriceaux ;

3° un effet « congélation-décongélation » : elle diminue également la mortalité ;

4° une interaction entre les deux facteurs : leur application simultanée a un effet supérieur à la somme des effets obtenus avec chacun d'eux ;

TABLEAU II

Tableau d'analyse de la variance.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	d. d. l.	Carré moyen	F			Conclusions (*)	
				Calculé	tabulaire			
					d. d. l.	0,05		0,01
Moustiques	9,14413	24	0,38101	5,25	24/71	1,67	2,07	H. S.
Centrifugation	4,27937	1	4,27937	58,97	1/71	3,13	7,01	H. S.
Congélation	1,13479	1	1,13479	15,64	1/71	3,13	7,01	H. S.
Interaction	0,32714	1	0,32714	4,51	1/71	3,13	7,01	S.
Additivité	0,12452	1	0,12452	1,72	1/71	3,13	7,01	N. S.
Résidu	5,15201	71	0,07256					

H. S. = hautement significatif.
S. = significatif.
N. S. = non significatif.

5° pas de non-additivité : ceci signifie que malgré les différences moyennes tous les moustiques ont même profil de réponse aux traitements appliqués. Il y a donc pour les moustiques hétérogénéité des niveaux de réponse, mais homogénéité des profils de réponse.

La dispersion résiduelle observée (carré moyen résiduel = 0,072564) est de loin supérieure à celle qu'on attend théoriquement sous le modèle binomial (0,036028 ; $\chi^2 = 146,5$ à 72 d. d. l. : hautement significatif). Les réponses sont surdispersées ; ceci n'est pas gênant dans le cas présent puisque c'est la variabilité observée qui a été prise comme base de comparaison.

Il n'a pas été possible de tester l'homogénéité des réponses des portées à l'intérieur d'une répétition (broyat) puisqu'elle est confondue avec l'effet traitement. Toutefois le fait qu'on n'ait pas rejeté l'hypothèse de même profil conduit à penser que ces réponses sont homogènes.

TABLEAU III

Pourcentages de mortalité (Moyennes retransformées corrigées).

Centrifugation			
	—	+	moyenne
congélation —	79,2	51,3	66,0
congélation +	33,1	25,0	29,0
moyenne	57,1	37,6	

TABLEAU IV

Pourcentages de mortalité (Moyennes observées).

Centrifugation			
	—	+	moyenne
congélation —	80,4	53,1	66,7
congélation +	33,0	25,4	29,1
moyenne	56,6	39,1	

Le tableau III donne, après retransformation en pourcentage et correction du biais introduit par la transformation, les moyennes fournies par l'analyse : elles diffèrent toutes entre elles. Pour comparaison le tableau IV fournit les pourcentages bruts observés.

CONCLUSIONS

La centrifugation et la congélation-décongélation font baisser le titre en virus d'un broyat de moustiques. Ceci peut suffire à empêcher un isolement lorsque la quantité de virus initiale est très faible. Cela semble être le cas pour le virus amaril : aucune des 6 souches récemment isolées en République Centrafricaine n'a tué à l'isolement la totalité des souriceaux inoculés (GERMAIN *et al.*, 1976) ; la mortalité s'est échelonnée entre 13 0/0 et 58 0/0.

Il faut toutefois remarquer que les résultats seraient peut être différents en utilisant un autre diluant que le T. P. Alb. ; il est en effet probable que, lors de la décongélation, ce sont les sels minéraux qui détruisent le virus, alors qu'ils se trouvent concentrés dans une partie aqueuse réduite.

Quoi qu'il en soit, tous les diluants utilisés renfermant des sels minéraux, il semble utile de supprimer la centrifugation des broyats et de diminuer au minimum le nombre de congélations-décongélation. Toutefois la non-centrifugation des broyats entraîne une augmentation de la toxicité pour le souriceau, ce qui oblige à réduire le volume des lots de moustiques et ceci n'est pas un inconvénient négligeable dans des enquêtes de masse.

Nous proposons donc la technique de préparation des broyats suivante :

- 1° préparer les lots monospécifiques de trente moustiques maximum ;
- 2° broyer sommairement dans un mortier refroidi à -20°C ;
- 3° attendre le réchauffement du mortier ;
- 4° dès que le broyat commence à décongeler, broyer très finement en ajoutant au besoin une ou deux gouttes de diluant ; on doit obtenir une pâte homogène, non granuleuse ;
- 5° ajouter 3 ml. de diluant et bien mettre en suspension le broyat ;
- 6° répartir en trois tubes de un millilitre environ :
 - le premier sera inoculé de suite au souriceau en ayant soin de remettre en suspension un éventuel dépôt,
 - les deux autres seront congelés à -70°C pour une éventuelle réinoculation.

Cette technique permet de faire :

- 1 inoculation sans centrifugation ni congélation-décongélation ;
- 3 réinoculations avec 1 congélation-décongélation ;
- 2 réinoculations avec 2 congélations-décongélation

RÉSUMÉ

Se proposant d'étudier les effets de la centrifugation et de la congélation sur la quantité de virus amaril contenue dans un broyat de moustiques, les auteurs ont noté la mortalité dans des portées de souriceaux inoculés avec

vingt-cinq moustiques artificiellement infectés et traités selon quatre protocoles. L'analyse statistique des résultats montre que la centrifugation et la congélation ont toutes deux un effet néfaste sur le titre de virus et que la superposition des deux traitements a un effet supérieur à l'addition des effets de chacun d'eux appliqués séparément.

Les auteurs proposent une nouvelle technique de préparation des broyats de moustiques, évitant au maximum les inconvénients de la centrifugation et de la congélation.

ABSTRACT

Studying the effects of centrifugation and deep freezing on the quantity of yellow fever virus in a grinded pool of mosquitoes, the authors followed the mortality rate of inoculated baby mice with twenty five artificially infected mosquitoes treated in four different ways. The statistical analysis of the results show that centrifugation and deep freezing have both an effect on the titer of virus and that the addition of the two treatments have an effect superior to the addition of the separate effects of each of them.

The authors propose a new technic for the preparation of pools of mosquitoes, without centrifugation or deep freezing.

*Office de la Recherche Scientifique
et Technique Outre-Mer
et Institut Pasteur de Dakar*

BIBLIOGRAPHIE

- CHANTER (D. O.). — Modifications of the angular transformation. *Appl. Stat.*, 1975, XXIV, 354-359.
- COX (D. R.). — *Analyse des données binaires*. Traduction française J. LARRIEU, Paris, Dunod, 1972, VIII + 122 p.
- GERMAIN (M.), SUREAU (P.), HERVÉ (J. P.), FABRE (J.), MOUCHET (J.), ROBIN (Y.) et GEOFFROY (B.). — 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 amaril. *Cah. O. R. S. T. O. M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 1976, XIV (2), 125-139.