

**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 souche 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 minute 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 (1).

(1) Préparation de la solution :

— Solution tampon phosphatée (T. P.) :

Phosphate disodique anhydre (Na^2HPO_4)	3 g. 20
Phosphate monosodique cristallisé ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0 g. 20

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 :

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 pu être isolée à l'isolement la totalité des sources inoculées (Cnatty et al).

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