

Essais de transmission par *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linné, 1762)
d'une souche virale isolée à Bangui

par

C. CHIPPAUX-HYPPOLITE (1), F. X. PAJOT (2)
et A. CHIPPAUX (1).

(avec la collaboration technique de Mme P. DIÉDÉRICH)

D'emblée rattachée aux *Rickettsia*, l'étiologie des fièvres exanthématiques observées en Afrique Centrale a toujours fait l'objet de mises au point périodiques. Le rôle prépondérant des *Rickettsia* a été magistralement mis en lumière par de nombreux travaux parmi lesquels ceux de GIROUD, JADIN, PELLISSIER, LE GAC, GAUD; cependant, la participation probable de certains virus transmis par arthropodes a été suggérée dès 1921 par CLAPIER puis reprise par LEGENDRE, LEFROU, PIERAERTS, BOYE, LUMSDEN, SCHNEIDER.

Divers arguments cliniques, immunologiques, écologiques, plaident en faveur de l'absence d'unité étiologique des syndromes exanthématiques en Afrique Centrale.

Le travail présenté ici se limite à la recherche d'un chaînon épidémiologique possible à propos d'une souche isolée précisément au cours d'une fièvre contractée aux environs de Bangui.

La souche V 154 a été isolée sur Souriceaux d'un sérum humain à la période d'incubation d'une fièvre exanthématique

(1) Institut Pasteur de Bangui.

(2) O.R.S.T.O.M., Centre de Bangui.

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

Collection de Référence

n° 11017

9 OCT. 1988

11017

au cours de laquelle se sont développés des anticorps neutralisants et fixant le complément (C. CHIPPAUX-HYPPOLITE et A. CHIPPAUX, 1965). Le lieu de contamination se situe en lisière de forêt où de nombreux vecteurs possibles ont été capturés parmi lesquels *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNÉ, 1762). La souche V 154 présente des caractères des Arbovirus, mais ne donne pas d'antigène hémagglutinant, n'appartient ni au groupe A ni au groupe B ni au groupe Bunyamwera de CASALS, d'où l'intérêt de savoir si elle est ou non transmissible par Arthropode.

Pour effectuer un essai de transmission de Mammifère à Mammifère par des Moustiques d'élevage, nous avons étudié dans un premier temps la virémie du Souriceau, animal sensible d'élection, celle du jeune Cobaye et celle du jeune Cercopithèque sur lesquels se nourrit très volontiers *Aedes aegypti*. Les expériences de transmission ont ensuite été tentées selon deux modes :

— essai de cycle complet de Souriceau à Souriceau, de Cobaye à Cobaye et de Singe à Singe;

— essai de cycle incomplet : inoculation à des Souriceaux de broyats des Moustiques préalablement gorgés sur l'animal d'épreuve.

Devant les difficultés éprouvées par les femelles d'*Aedes* à se nourrir sur Souriceaux, nous avons effectué par élément des essais d'infection directe de Souriceaux par des broyats de Moustiques gorgés sur un liquide nutritif virulent.

MATERIEL ET METHODES

I. — MATÉRIEL.

Virus. La souche V 154, conservée à moins 20° C puis à moins 65° C a été entretenue exclusivement sur cerveaux de Souriceaux. Les expériences ont été faites à partir d'un stock-virus du 13^e passage dont la DL est $10^{-7,5}$ sur Souriceau nouveau-né inoculé par voie intra-cérébrale (i. c.), 10^{-3} sur Souriceau nouveau-né inoculé par voie sous-cutanée (s. c.); le temps moyen de survie est de trois jours à 10^{-2} . La Souris adulte n'est pas sensible mais permet d'obtenir des sérums immuns.

Moustiques. Les expériences de transmission ont été faites avec *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNÉ, 1762). Nous avons utilisé une souche élevée au laboratoire d'entomologie de l'Institut Pasteur de Bangui depuis plus de six mois, descendance d'un couple obtenu à partir de larves trouvées dans un gîte artificiel placé à l'Institut Pasteur même.

Animaux d'expérience :

a) Souriceaux nouveau-nés de 24 à 48 heures de l'élevage de l'Institut Pasteur de Bangui; origine : souche B. C. G. de l'Institut Pasteur de Paris, acclimatée à l'Institut Pasteur du Cameroun, puis de Bangui.

b) Cobayes : jeunes Cobayes mâles, non sevrés, âgés de 10 à 20 jours provenant également de notre élevage.

c) Cercopithèques : deux *Cercopithecus nictitans nictitans*, âgés de quelques mois, capturés aux environs de Bangui, utilisés après plus de 15 jours d'observation, non immuns vis-à-vis des différentes souches d'Arbovirus de référence en notre possession et de la souche utilisée pour ce travail.

II. — MÉTHODES VIROLOGIQUES.

Les inoculations, les titrages, la surveillance, les prélèvements des cerveaux de Souriceaux, de même que les préparations de broyats de Moustiques ont été effectués selon les techniques préconisées par l'East African Virus Research Institute d'Entebbé. Le diluant utilisé pour l'ensemble du travail a été un tampon phosphaté albuminé à 0,75 % (fraction V d'Armour) de pH 7,4 (en abrégé : T. P. A.); pour recueillir les échantillons de sang, ce T. P. A. est additionné d'héparine à raison de 5 unités par ml de sang. Tous les animaux inoculés ont été gardés strictement sous double grillage moustiquaire (cages et salles).

Le contrôle immunologique des sérums de Cercopithèques effectué avant et après les essais de transmission a été fait par séro-neutralisation sur Souriceaux selon la méthode des 100 DL 50 (2 portées de six Souriceaux pour chaque sérum); deux sérums témoins positifs ont été joints au titrage : un sé-

rum très tardif du malade chez qui la souche a été isolée et un sérum hyperimmun préparé sur Lapin par trois inoculations intra-veineuses (I. V.) à 8 jours d'intervalle avec une suspension cérébrale virulente à 10^{-4} .

Etude de la virémie :

a) chez le Souriceau — inoculation par voie I. C. de plusieurs portées de souriceaux avec une suspension à 10^{-4} (0,02 ml) en T. P. A. de cerveau virulent (soit $10^{6,5}$ DL 50-Souriceau) : Toutes les 12 heures, deux Souriceaux de deux portées différentes sont ponctionnés au cœur.

b) chez le jeune Cobaye : inoculation de trois Cobayes par voie I. C. avec 0,2 ml de suspension virulente à 10^{-4} de cerveau (soit $10^{6,5}$ DL 50-Souriceau). Toutes les 24 heures pendant 10 jours chaque Cobaye est ponctionné au sinus oculaire.

c) chez le Cercopithèque : inoculation par voie S. C. avec 200 DL 50 sous-cutanée-Souriceau et ponction toutes les 24 heures à la veine saphène pendant 15 jours.

Dans les trois expériences, la virémie a été mise en évidence par réinoculation I. C. immédiate de chaque échantillon dilué à 10^{-4} en T. P. A. hépariné, à au moins deux portées de Souriceaux de 48 heures, avec titrage éventuel les jours suivants.

Etude de la transmission :

Aussitôt après le repas sanguin des Moustiques sur l'animal inoculé aux doses précisées ci-dessus, on contrôle la virémie en prélevant un échantillon de sang dans les conditions déjà définies. Chez les animaux neufs ayant servi à nourrir les femelles d'*Aedes* supposées infectées, la caractérisation du virus a été faite chez le Souriceau par la recherche de parésies ou de paralysies mortelles, chez le Cobaye et le Cercopithèque par la surveillance quotidienne, la recherche de la virémie qui sera titrée et identifiée sur Souriceau, et par l'apparition d'anticorps neutralisants par comparaison avec le sérum recueilli avant expérience.

La solution sucrée virulente a été préparée extemporanément avec des cerveaux de Souriceaux homogénéisés à 10^{-1} en T. P. A., légèrement centrifugés et dilués à 10^{-2} dans une solution de glucose à 5 %, soit environ 100 000 DL 50-Souriceau par ml. Le titrage du virus dans cette suspension a été fait selon la technique habituelle de REED et MUENCH sur Souriceau après deux heures et après quatre heures de séjour dans les conditions de température et d'humidité du laboratoire d'entomologie.

III. — MÉTHODES ENTOMOLOGIQUES.

Notre premier but était de faire gorgier des femelles d'*A. aegypti* nouvellement écloses, n'ayant donc jamais pris encore de repas de sang, sur des animaux infectés par la souche de virus V 154 et en phase virémique supposée. Les femelles gorgées ont été ensuite isolées et chaque jour certaines d'entre elles ont été sacrifiées pour être inoculées à des Souriceaux afin de suivre l'évolution du virus chez l'Insecte. D'autres femelles, après avoir mûri leurs œufs et pondu, ont pris alors un nouveau repas de sang, mais cette fois-ci sur un animal sain. L'apparition de V 154 chez ce dernier permettrait ainsi de mettre en évidence la transmission par ce Moustique du virus d'un animal à l'autre.

Des nymphes d'*A. aegypti* sont introduites dans une cage en voile de tergal, cubique de 35 cm de côté. On place aussi à l'intérieur de la cage, pour les mâles et les femelles qui n'auront pas pris de repas de sang, une solution de glucose dans un récipient composé d'un tube de 7,5 cm sur 2,5 cm renversé dans un autre tube légèrement plus large et mesurant 5 cm de haut. Le tube le plus étroit est recouvert d'une mousseline et le plus grand est rempli de la solution de glucose. La mousseline joue le rôle de mèche et reste constamment imprégnée de solution sucrée. Les animaux inoculés sont placés dans la cage 24 heures après l'éclosion des Moustiques adultes. Il y sont restés de deux à quatre heures. Les jeunes Cobayes ont été immobilisés par un système de bracelets en caoutchouc fixant l'animal sur le dos à une petite planchette de contre-plaqué. Les singes ont été préalablement anesthésiés (solution

de Nembutal à 20 % à la demande par voie i. v., vingt minutes après l'injection s. c. de 1/16 de mg de sulfate d'atropine). Leur séjour dans la cage, en contact avec les moustiques, n'a pas dépassé deux heures.

a) expériences faites avec les Souriceaux : 19 Souriceaux inoculés furent mis en sept jours à la disposition de 56 Moustiques femelles. Nous avons vu à de nombreuses reprises les femelles d'*Aedes* se poser sur les Souriceaux, les piquer et essayer de se gorger; pas une cependant ne réussit à se nourrir. Des traces de piqûres se voyaient parfaitement sur les Souriceaux mais nous pensons que l'apport de sang était trop faible pour que les Moustiques puissent se gorger. Peut-être l'agitation constante des souriceaux a-t-elle également joué un rôle dans cette impossibilité.

A la fin de cette série d'expériences, les Moustiques qui avaient été tués par congélation à moins 20° C ont été tous broyés et inoculés. Auparavant, un lot de femelles qui avaient piqué des Souriceaux inoculés a été alimenté sur Souriceaux sains, afin de mettre en évidence une éventuelle, quoique problématique, transmission.

b) expériences faites avec les jeunes Cobayes : nous avons repris la série d'expériences faites avec les Souriceaux en employant cette fois des jeunes Cobayes non-sevrés; les femelles d'*Aedes* se sont très bien nourries sur eux. Elles ont ensuite été tuées par congélation, broyées et inoculées suivant le protocole établi. Quelques femelles gorgées sur jeune Cobaye inoculé ont piqué un jeune Cobaye sain 4, 5, 6 et 7 jours après le premier repas de sang.

c) expériences faites avec les singes : réalisées selon le même principe avec deux jeunes *Cercopithecus nictitans nictitans*, sur lesquels les femelles d'*A. aegypti* se sont pleinement gorgées. Deux lots d'*A. aegypti* ont été gorgés l'un 24 heures, l'autre 12 jours après l'inoculation expérimentale au Singe; chacun des deux lots a pris un repas sur le Singe « neuf », puis a été broyé et inoculé séparément, l'un 8 jours après, l'autre 6 jours après le repas supposé infectant.

d) expériences faites avec une solution sucrée contenant du virus : nous avons donné aux Moustiques pour toute nour-

riture une solution de glucose à 5 % contenant la suspension de virus. Celle-ci était placée dans la cage aux Moustiques pendant deux heures. L'activité du virus après deux et quatre heures dans cette solution imbibant la mousseline de coton avait été préalablement vérifiée à partir du liquide obtenu par expression de la partie supérieure de la mousseline. Nous avons isolé les femelles qui s'étaient pleinement gorgées de cette solution et les avons inoculées à des Souriceaux après 24, 48, 72 heures.

RESULTATS

I — ÉTUDE DE LA VIRÉMIE.

a) chez le Souriceau, une virémie transitoire existe à la 24^e heure (la *DL* 50 est alors inférieure à $10^{-3,5}$ par ml) puis, après une phase d'éclipse elle reparait à la 60^e heure (phase paralytique pré-agonique) et persiste jusqu'à la mort qui survient vers la 72^e heure. La *DL* 50 est alors habituellement supérieure à $10^{-5,5}$ par ml.

b) chez le jeune Cobaye non-sevré aucune virémie n'a été décelée à aucun moment; la température, le poids, le comportement sont restés normaux. A l'issue de l'expérience (15^e jour), un des trois Cobayes inoculés a été sacrifié bien portant, un autre a été sacrifié cachectique : le virus n'a été isolé d'aucun des organes de ces Cobayes; le dernier, conservé pour les tests immunologiques, a été trouvé mort deux jours plus tard, et l'autopsie n'a pas permis d'attribuer cette mort à V 154. Nous savons néanmoins par des essais antérieurs que le Cobaye développe des anticorps neutralisants.

c) chez le Cercopithèque la virémie a été décelée dans les prélèvements effectués 24, 48 et 96 heures après l'inoculation. Le titre du virus circulant reste faible : la *DL* 50 est inférieure à 10^{-3} par ml dans les trois cas; l'absence de virémie décelable le troisième jour peut aussi s'expliquer par ce titre limite de virus circulant. Les jours suivants aucune virémie n'a été relevée et cliniquement le Singe inoculé n'a présenté aucun phénomène pathologique (poids, température, comportement);

il a survécu et les prélèvements de sérum nécessaires à l'étude immunologique ont été faits aux 10^e, 15^e et 21^e jours. L'étude de ces sérums par la méthode de séro-neutralisation sur Souriceau contre environ 100 DL 50 de virus V 154 a confirmé l'absence d'anticorps spécifiques avant l'expérience, l'apparition d'anticorps neutralisants n'a pu être précisée chez le singe inoculé.

II. — ETUDE DE LA TRANSMISSION.

Nous ne pouvons tirer aucune conclusion des résultats des expériences réalisées chez le jeune Cobaye où l'absence de virémie décelable suffit à expliquer l'absence de virus, aussi bien chez les Moustiques que chez le Cobaye « neuf » sur lequel ces Moustiques se sont gorgés après 4 à 7 jours d'incubation.

L'essai de réalisation de cycle complet chez le Souriceau a été négatif : 4 portées de six Souriceaux sains mis en contact pendant environ 4 heures avec les femelles d'*Aedes aegypti* susceptibles d'être infectées n'ont présenté aucun signe pathologique.

Ce résultat négatif a été corroboré par le fait que 17 de ces femelles d'*Aedes* broyées et inoculées ne contenaient pas de virus. Toutefois l'impossibilité matérielle qu'elles ont eu à se gorger au cours de l'expérience nous empêche de conclure sans réserve à l'absence de transmission de V 154 de Souriceau à Souriceau par *A. aegypti*.

Les deux lots d'*Aedes* gorgés sur le Cercopithèque inoculé, dont l'un pendant la période virémique, ne contenaient de virus ni l'un ni l'autre. Le Singe « neuf » n'a présenté ni signe pathologique ni virémie. Ces résultats, au moins pour le premier lot d'*Aedes*, viennent à l'appui de l'expérience précédente en établissant l'absence de multiplication et même de conservation du virus V 154 chez *Aedes aegypti*.

L'expérience réalisée à l'aide de repas pris sur une solution glucosée virulente permet d'éliminer plusieurs des causes d'échec liées à la succession d'aléas que comporte la réalisa-

tion au laboratoire d'un cycle biologique complexe et de confirmer certains des résultats négatifs obtenus *in vivo*. Dans la solution glucosée, le titre du virus se maintient constant pendant toute la durée de l'expérience et au-delà; 5 femelles d'*Aedes* pleinement gorgées de cette solution ont été broyées et inoculées une par une, après des délais d'incubation différents; aucune n'a assuré le passage du virus chez le Souriceau. Il semble donc qu'une femelle pleinement gorgée prélève au cours d'un repas complet une quantité de virus insuffisante pour contenir une dose infectante de virus et qu'il ne puisse y avoir de transmission mécanique. De plus, si la période d'incubation n'est pas supérieure au délai maximal que nous avons utilisé (8 jours), si le seuil infectant pour le Moustique n'est pas supérieur au titre de la suspension virulente, on peut conclure de ces différentes expériences qu'il n'y a aucune multiplication du virus V 154 chez *A. aegypti*.

CONCLUSIONS.

Une première conclusion de ce travail sur la transmission du virus V 154 est la sélection du Souriceau et du jeune Cercopithèque comme animaux d'expérience. Le Cobaye est à rejeter car il ne présente aucun signe clinique et la virémie n'a pu être mise en évidence. Les Souriceaux représentent un matériel de choix en raison de l'importance et de la durée de la virémie et du fait de leur sensibilité au virus; toutefois, il sera nécessaire de modifier les conditions matérielles d'expérimentation de façon à permettre aux femelles de Moustiques de se gorger sur l'animal virémique et de piquer plus aisément l'animal sain. Le jeune Cercopithèque est intéressant par sa virémie durable, sa manipulation simple et ces premiers résultats appellent un complément d'expérience dans lequel pourraient être modifiées les doses et les voies d'inoculation du virus.

Un second point a pu être précisé : au laboratoire, *Aedes aegypti* n'est pas vecteur de la souche V 154. L'un des objectifs de ce travail étant de chercher si V 154 est ou non transmissible par Arthropode, il conviendra donc d'essayer un autre

vecteur en s'appuyant sur les données recueillies lors de ces premiers travaux. L'essai d'une autre espèce élevée au laboratoire pourrait permettre d'aborder plus en détail les différents points que l'absence d'adaptation vecteur-virus-animal test ne nous a pas permis de réaliser ici.

En résumé, nous avons précisé au cours de ce travail la virémie chez le Souriceau, le jeune Cobaye et le jeune Cercopithèque inoculés avec une souche virale (V 154) isolée à la période d'incubation d'une fièvre exanthématique humaine au cours de laquelle se sont développés des anticorps fixant le complément et neutralisants. Cette souche présente certains caractères des Arbovirus mais ne donne pas d'antigène hémagglutinant et n'appartient, selon les premiers travaux d'identification, ni au groupe A ni au groupe B ni au groupe Bunyamwera de CASALS. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNÉ, 1762) ne semble pas susceptible d'assurer la multiplication intrinsèque de ce virus et de le transmettre au laboratoire, *a fortiori* dans la nature.

SUMMARY

In this work, time and end-point of viraemia for baby-mice, baby-guinea-pig and young *Cercopithecus nictitans* have been established for virus strain — V 154 — isolated in Bangui from human exanthematic fever. This strains perhaps belonging to Arbovirus group and has some characteristic Arbovirus aspects, but it has no hemagglutinating antigen and no antigenic relations to A, B, or Bunyamwera in CASALS' group.

According to the results of first transmission experiences realized by our team, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNÉ, 1762) is not a potential vector for V 154.

Institut Pasteur de Bangui,
(Directeur : Dr A. CHIPPAUX)
Laboratoire d'Entomologie de l'O.R.S.T.O.M.
à Bangui.

BIBLIOGRAPHIE

- VAUCEL (M.) — *Médecine tropicale*. Collection médico-chirurgicale à révision annuelle. Edit. Méd. Flammarion, Paris, T. II, p. 1185.
- BOYE — La fièvre rouge congolaise et le test de protection amaril en A.E.F. *Off. Internat. Hyg. Publ.* (Bull. mens.), 1935, 27, (7), pp. 1319-1321.
- CHIPPAUX (A.), CHIPPAUX-HYPPOLITE (C.), GUERIN (J.), PETERS (J.) et CHAPPELLE (P.) — Syndromes exanthématiques et « fièvres inexplicées » en Centrafrique. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, 58, (1), pp. 34 à 47.
- CHIPPAUX-HYPPOLITE (C.) et CHIPPAUX (A.) — Isolement d'une souche virale à partir d'un cas de fièvre exanthématique (Note préliminaire). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, 58, (2), pp. 160-164.
- CLARKE (D.H.) et CASALS (J.) — Technics for hemagglutination and hemagglutination — inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, pp. 561-573.
- DEPOUX (R.) et MERVEILLE (P.) — Sur une petite épidémie de fièvre exanthématique observée à Brazzaville. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955, 48, pp. 610-615.
- GIROUD (P.), LE GAC (P.), ROUBY (M.), LAGARDE (J.) et GAILLARD (J.A.) — Contribution à l'étude des Rickettsioses en Oubangui-Chari consécutives aux feux de brousse. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1951, 44, pp. 571-579.
- JADIN (J.) — Les Rickettsioses en Afrique Centrale. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1963, 56, pp. 571-586.
- LE GAC (P.) — Un cas de typhus murin observé chez un européen à Bangui (Oubangui-Chari). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1942, 35, pp. 202-205.
- LE GAC (P.) — Recherche sur le typhus des savanes de l'Oubangui-Chari. La maladie des Bougbous. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1946, 39, pp. 97-103.
- LE GAC (P.) et GIROUD (P.) — Trois cas de fièvre exanthématique provoqués par *Rickettsia burneti* en Oubangui-Chari (A.E.F.). *C. R. Acad. Sc.*, 1950, 230, pp. 1711-1713.
- LE GAC (P.) et GIROUD (P.) — La fièvre rouge congolaise, forme exanthématique de la fièvre Q ? *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, 46, pp. 976-985.
- LUMSDEN (W.H.R.) — The etiology of « dengue ». *East Afr. med. J.*, 1958, 35.
- PELLISSIER (A.) — Fièvre rouge congolaise et Rickettsioses en Afrique Equatoriale française. *Bull. Path. exot.*, 1954, 47, pp. 310-320.
- SCHNEIDER (J.) — Réunions d'information sur les Rickettsioses et leurs complications vasculaires, Paris, 7 et 8 mai 1963. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1963, 56, p. 589 (discussion). *East African Virus Research Institute*. Rapports annuels de 1958 à 1965.

Essais de transmission par *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linné, 1762)
d'une souche virale isolée à Bangui

par

C. CHIPPAUX-HYPPOLITE (1), F. X. PAJOT (2)
et A. CHIPPAUX (1).

(avec la collaboration technique de Mme P. DIEDERICH)