

**UTILISATION DES HÉMAGGLUTININES
POUR L'IDENTIFICATION DE L'ORIGINE SPÉCIFIQUE
DES HÉMATIES INGÉRÉES
PAR LES MOUSTIQUES HÉMATOPHAGES**

par A. GRJEBINE, A. EYQUEM et J. FINE (*).

*(Recherche scientifique d'Outre-Mer
et Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins.
Service du D^r R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. Institut Pasteur.)*

L'identification du sang ingéré par les insectes est d'un grand intérêt pour l'épidémiologiste en lui permettant d'établir le caractère anthropophile ou zoophile de l'insecte examiné, et de déterminer l'existence d'un écran animal protecteur pour l'homme. Cette identification a été réalisée jusqu'à maintenant à l'aide de la réaction de précipitation ; mais on sait que celle-ci a une sensibilité bien moindre que la réaction d'hémagglutination. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette dernière réaction et tenté de préciser les limites de sa sensibilité.

Rappelons en quelques mots comment se pose pour l'épidémiologiste le problème de l'identification du sang ingéré par les moustiques. Les femelles des moustiques hématophages ne piquent pas n'importe quel animal. Elles possèdent des préférences trophiques et piquent un ou plusieurs hôtes à leur portée en leur transmettant dans certaines conditions les agents des endémies tropicales, l'hôte fermant le cycle d'un parasite déterminé ou au contraire arrêtant son cycle évolutif. Dans une localité donnée les femelles peuvent se gorger sur un ou plusieurs hôtes suivant leur préférence trophique, l'attraction vers l'un des hôtes pouvant être augmentée ou diminuée ou même annulée par l'apparition d'un nouvel hôte, provoquant une véritable déviation qui est conditionnée non seulement par l'espèce, mais encore par son habitat diurne et nocturne. Toute déviation animale nécessite la proximité de l'hôte déviateur et de l'hôte dont le moustique a été dévié. On voit ainsi le grand intérêt de la détermination exacte de l'hôte puisque le facteur de préférence trophique vers une

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 février 1954.

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

30 OCT. 1963

Collection de Référence

n° / 2500. ex 1

espèce est lié à tout un complexe (habitat divers, comportement diurne ou nocturne, éventuel rapprochement ou éloignement des gîtes larvaires des moustiques).

De même est évident l'intérêt épidémiologique de détermination des hôtes au cours des différentes enquêtes malarialogiques pour expliquer la gravité d'une endémie ou épidémie.

DÉVIATION ANIMALES. ECRAN PROTECTEUR.

On connaît le rôle dans la transmission des parasites par les insectes hématophages, des écrans protecteurs réalisés par certains animaux qui, déviant le moustique de l'homme, protègent en fait celui-ci. Dans certaines régions pauvres en animaux sauvages et animaux domestiques, les moustiques se gorgent presque exclusivement sur l'homme, transmettant l'hématozoaire responsable des endémies locales. Dans d'autres régions, le cycle éventuel homme-moustique est plus ou moins interrompu, le parasite étant intercepté par un deuxième hôte (bœuf dans le cas des régions d'élevage). Dans ce dernier cas, l'hématozoaire humain transmis au bœuf voit son cycle interrompu par épuisement des sporozoïtes des glandes salivaires du moustique sur le bœuf. Dans d'autres cas, par contre, un deuxième hôte pourra servir de véritable réservoir de virus, comme certains singes de la forêt tropicale le font pour le virus amaril.

On peut voir, en effet, les tendances trophiques naturelles se modifier à un certain degré, soit à la suite de l'introduction d'un animal dans une région donnée, soit par la disparition d'une espèce, soit enfin par le changement d'habitat d'une espèce animale. Ces modifications peuvent à leur tour avoir pour conséquence une modification du comportement des moustiques augmentant ou diminuant leur anthropophilie ou leur zoophilie, c'est-à-dire rendant possible une déviation vers un animal donné ou au contraire faisant de l'homme un hôte exclusif.

La nécessité de l'identification de l'origine spécifique du sang ingéré par les moustiques s'est montrée de plus en plus indispensable à l'organisation de la lutte anti-paludique. En effet, l'introduction dans cette lutte des insecticides tels que le D. D. T. en Afrique Noire et à Madagascar a rendu de nouveau son acuité à la question des préférences trophiques des anophèles. Dans certaines régions de Madagascar, par exemple, on a vu la faune anophélienne presque disparaître des habitations humaines grâce à l'emploi des insecticides et persister à un certain degré dans les étables, bien que celles-ci aient été aussi bien traitées. La question de savoir si les anophèles se gorgeaient exclusivement sur les bœufs ou migraient dans les étables après s'être gorgés sur l'homme demandait à être éclaircie. La question des

différents aspects du paludisme à Madagascar s'est également posée à nous, demandant une solution qui pouvait entraîner l'intensification de la lutte imagocide ou une économie d'insecticides. En effet, seul le degré d'anthropophilie peut indiquer les régions dangereuses.

L'identification du sang ingéré par les moustiques devrait être normalement à la base de toute enquête entomologique. En effet, cette réaction d'identification, qui jusqu'ici utilisait la réaction de précipitation interfaciale, avait été peu à peu abandonnée par de nombreux chercheurs à cause de la difficulté de son exécution et de l'inconstance de ses résultats. Néanmoins, cette réaction de précipitation a permis de donner des explications justes et valables, notamment dans le cas d'endémie palustre grave par une simple démonstration de l'anthropophilie anophélienne, ou au contraire, dans le cas d'endémie palustre atténuée, de l'existence d'une zoophilie prononcée.

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE UTILISÉES.

La détermination de l'origine spécifique des hématies absorbées au cours du repas infectant par les insectes hématophages et en particulier par *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* peut se faire à l'aide de deux méthodes utilisant toutes deux la réaction antigène-anticorps dont l'une fait appel à la réaction de précipitation (les anticorps utilisés étant des précipitines spécifiques) et dont l'autre utilise la réaction d'agglutination due à l'union de l'hémagglutinogène porté par les hématies et d'un anticorps agglutinant contenu dans un immunosérum.

Cette méthode d'hémagglutination, par sa simplicité d'exécution et de lecture, par l'obtention de la conservation après lyophilisation des sérum-tests puissants rendant possible leur transport et leur emploi sous tous les climats, semble en tous points préférable, dans ce cas particulier, à la délicate réaction de précipitation utilisée en médecine légale pour l'identification des tachés de sang.

I. — RÉACTION DE PRÉCIPITATION INTERFACIALE.

Cette méthode consiste à mettre en contact par superposition dans des tubes de 3 mm de diamètre des dilutions d'anticorps en présence d'une solution concentrée d'antigène. Lorsque la réaction se produit, elle se traduit par l'apparition d'un anneau de précipitation à la limite des deux phases liquides. D'autres méthodes plus fines, telle que l'étude de la précipitation spécifique en milieu gélifié (Oudin, 1946), ont rendu possible l'analyse immuno-chimique et ont permis d'identifier certains antigènes.

Cette réaction peut se faire soit en tube par mélange de l'immunsérum et de la gélose, puis par diffusion de l'antigène dans ce mélange, soit en boîte de Petri, les deux antigènes à comparer étant mis dans deux réservoirs creusés dans de la gélose, l'immunsérum placé dans un troisième réservoir disposé au sommet d'un triangle équilatéral (technique d'Ouchterlony).

La méthode de précipitation interfaciale ne tient pas suffisamment compte des antigènes communs qui existent chez certains groupes d'animaux, et n'arrive à une spécificité relative que par de fortes dilutions des anti-sérums. En effet, tout anti-sérum insuffisamment dilué est susceptible de provoquer des réactions

immunisation d'animaux à l'aide de suspension de globules rouges lavés. L'immunisation a été réalisée d'abord par une série d'injections intraveineuses, puis une série d'injections intramusculaires et intrapéritonéales poursuivies pendant six à huit semaines. Lorsque les sérums présentaient un titre agglutinant suffisant, en moyenne 1/4 000 vis-à-vis de globules rouges mis en suspension dans l'eau physiologique, on a réalisé une absorption du sérum décomplémenté, à l'aide de globules rouges d'autres espèces animales pour lesquelles il y a eu apparition d'anticorps agglutinant due à une communauté antigénique.

Un titrage de l'immunsérum est réalisé au préalable dans une série de 12 tubes à hémolyse par exemple, où on met 0,3 ml d'eau physiologique et en plus, dans le premier tube, 0,3 ml du sérum ; après mélange dans le premier tube on reporte 0,3 ml dans le deuxième tube et on opère de même pour les tubes suivants ; on obtient ainsi des dilutions de sérum comprises entre 1/2 et 1/4 000 par exemple. Dans chaque tube on ajoute 0,05 ml d'une suspension en eau physiologique des globules rouges à étudier. On laisse les tubes quinze à trente minutes à la température du laboratoire et on centrifuge à 1 000 tours pendant une minute, puis on effectue la lecture à l'aide d'un miroir concave, la dernière dilution qui donne encore une agglutination exprime le titre.

Absorption des agglutinines non spécifiques. — Pour obtenir un immunsérum doué d'une étroite spécificité, c'est-à-dire agglutinant, à l'exclusion de tout autre, les hématies d'une espèce animale et d'une seule, il faut débarrasser ces sérums des agglutinines hétéro-spécifiques qu'il contient. On peut obtenir cette spécificité en pratiquant une absorption dix-huit heures à + 4° par des globules appropriés. Par exemple, si l'on a obtenu par immunisation un sérum de chevreau anti-humain destiné à distinguer les globules humains des globules de bœuf et des globules rouges de cheval, il est évident que, si ce sérum n'est pas absorbé par des globules de bœuf et de cheval, il est capable d'agglutiner les trois catégories de globules rouges ; mais après absorption par des globules de bœuf et par des globules de cheval, il n'agglutine plus que des globules humains, permettant ainsi de distinguer l'origine humaine de l'origine animale (bœuf et cheval) des hématies examinées.

On réalise ces absorptions en mettant en présence le sérum à absorber avec une quantité convenable de culot de globules rouges lavés quatre fois, dans au moins cinq fois leur volume d'eau physiologique, par centrifugation, décantation et remise en

sérum par rapport à des globules rouges de la même espèce animale que ceux qui ont servi à réaliser l'absorption et par rapport à des globules rouges contre lesquels l'immunsérum est spécifiquement dirigé.

Les moustiques utilisés pour les expériences provenaient de l'élevage permanent et étaient gorgés dans de petites cages en tulle modèle Roubaud, sur lapin, cobaye, souris, bœuf et homme. Les moustiques appartenaient aux espèces suivantes : *Aedes aegypti* (Linné), *Anopheles stephensi* (Liston), *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* (Van Thiel).

Les moustiques gorgés sont pris avec un aspirateur à bouche et endormis au chloroforme. La dissection se fait avec deux épingles ou aiguilles lancéolées. L'abdomen est séparé d'abord du thorax, puis l'estomac est extrait de l'abdomen par simple pression sur l'incision abdominale. Une fois extrait, l'estomac est placé dans une grosse goutte d'eau physiologique à 8,5 p. 1 000, on presse alors avec une épingle sur la paroi stomacale pour que le sang qu'il contient émerge par la partie antérieure et postérieure dans la goutte d'eau. On peut aussi bien dilacérer les parois stomacales avec les épingles de façon à avoir le maximum de sang si le moustique est peu gorgé. De toute façon, une fois que le sang se trouve dans l'eau physiologique, il est absolument nécessaire de bien disloquer l'amas de globules rouges avec l'épingle jusqu'à disparition de ces pseudo-agglutinats. On vérifie microscopiquement que les globules rouges se trouvent bien dissociés dans l'eau physiologique. Si l'on veut pratiquer deux ou trois réactions avec des anti-sérums différents, on divise le sang ainsi recueilli en eau physiologique en deux ou trois gouttes.

Cette réaction d'agglutination peut se faire sur lame ou sur papier bristol. L'anti-sérum peut être employé à l'état pur ou dilué selon son avidité et son titre. Il est préférable pour avoir des réactions facilement lisibles d'utiliser une goutte de sérum pur dilué à moins de 1/10. Le sang et le sérum mis en présence, on agite légèrement la lame pour que le mélange soit bien homogène et on attend deux à cinq minutes avant la lecture directe suivie d'une lecture microscopique au faible grossissement. Les réactions positives sont toujours très nettes facilement lisibles à l'œil nu comme on peut le voir sur les photographies jointes.

L'anti-sérum, par exemple anti-sérum anti-globules rouges humains, choisi pour la réaction sera être absorbé par les globules rouges des animaux qui entourent l'homme dans la localité donnée. En général, il suffira de l'absorber par des globules rouges des animaux domestiques, notamment bœuf, cheval, chien, et porc. Pour une localité donnée, il sera bon de faire une réaction avec les anti-sérums pour l'animal présumé être le véritable hôte des moustiques et, aussi, des réactions avec les anti-sérums

pour les animaux domestiques (mammifères ou oiseaux suivant que les globules rouges sont nucléés ou non) présents dans la localité. Par exemple, on effectuera 100 réactions avec le sérum anti-globules rouges humains absorbé par les globules rouges des autres animaux, 100 avec le sérum anti-globules rouges de bœuf absorbé de la même façon, etc.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de nos expé-

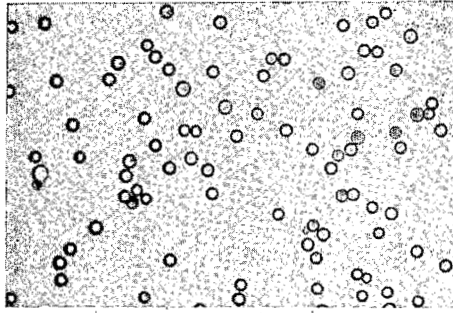
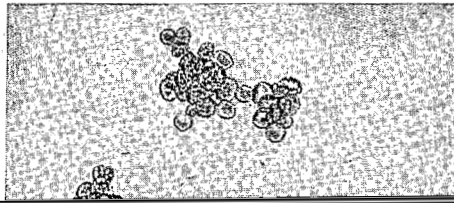


FIG. 1. — Microphotographie de réaction négative : Les globules sont libres.



CONCLUSIONS TIRÉES DES EXPÉRIENCES EFFECTUÉES.

1° Temps de survie des hématies à l'intérieur de l'estomac des

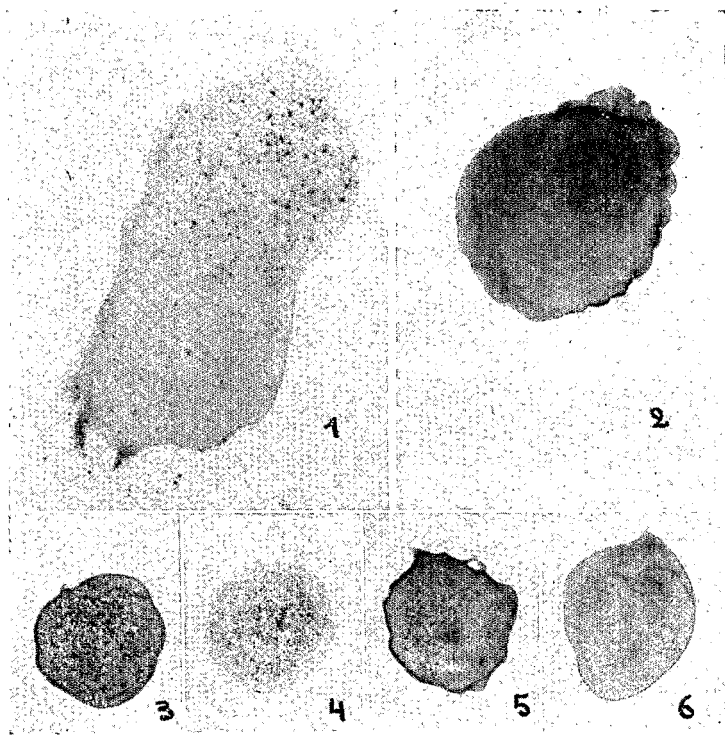


FIG. 3 (macrophoto) 1. *Anopheles maculipennis* variété *atroparrus*, sang lapin plus sérum de cobaye anti-lapin après six heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 2. Réaction témoin : même sang, sans sérum anti-lapin, réaction d'agglutination négative; 3. *Aedes ægypti* gorgé de sang humain appartenant au groupe A plus sérum test anti-A après six heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 4. *Aedes ægypti* gorgé avec du sang de souris plus sérum de lapin anti-globules rouges de souris après cinq heures de digestion, réaction d'agglutination positive; 5. *Aedes ægypti* gorgé de sang humain plus sérum chevreau anti-homme après vingt-trois heures de digestion, réaction positive; 6. *Aedes ægypti* gorgé de sang humain plus sérum de lapin anti-globules rouges de souris absorbé par des glob. les rouges humains de groupe AB après sept heures de digestion, réaction d'agglutination négative.

moustiques. — a) D'après les expériences 4 et 8 nous voyons que non seulement les hématies survivent plus de douze heures, mais aussi qu'un agglutinogène de groupe sanguin humain tel

que l'agglutinogène A reste facilement décelable au moins douze heures.

b) D'après les expériences du n° 25 à 48, nous voyons que les réactions restent positives et facilement lisibles à l'œil, sans microscope au moins pendant les douze heures qui suivent la piqure du moustique, qu'il s'agisse d'*Anopheles stephensi* ou *Aedes aegypti*.

2° *Spécificité des réactions, problèmes de la modification antigénique de la structure des hématies.* — Les réactions pratiquées avec différents sangs d'animaux à l'aide des anti-sérums spécifiques absorbés ou non par les globules rouges correspondants nous ont montré que les hématies ingérées n'ont pas subi de modification antigénique pendant les douze premières heures de digestion.

Les quatre expériences faites avec les moustiques gorgés sur homme, bœuf, cobaye, lapin, souris, montrent bien que la structure antigénique des hématies n'est pas modifiée et permet les réactions d'agglutination spécifique.

3° *Degré de spécificité de ces réactions d'agglutination en rapport avec le taux de dilution des anti-sérums.* — Nous voyons que des réactions peuvent garder leur spécificité même à des taux pouvant atteindre 1/200, mais évidemment variables suivant les sérums utilisés. Dans le cas des sérums non absorbés, on atteint rapidement la spécificité dans un groupe d'animaux apparentés par simple dilution du sérum, mais cette spécificité doit être garantie par de nombreux témoins. Il est à noter que les groupes d'animaux éloignés du point de vue antigénique ne présentent pas de réaction mixte avec les sérums non absorbés à l'état pur ou faiblement dilués selon la parenté plus ou moins grande entre les hématies ingérées et les globules rouges qui ont servi à fabriquer les anti-sérums. Dans le cas où l'on voudrait pratiquer des réactions sur des sérums non absorbés il serait indispensable de prendre comme témoins les différents animaux de la localité qu'on étudie.

4° *Rapport entre les taux d'hémagglutination des hématies ingérées et le titre du sérum obtenu par la méthode d'agglutination d'hématies intactes par centrifugation.* — Les taux d'agglutination sur lame des hématies ingérées est inférieur de 2 à 4 dilutions au titre réel. Expériences 9 et 12, 13 à 22, 52 à 62.

CONCLUSIONS.

La méthode immunologique d'identification des origines spécifiques des hématies ingérées par les moustiques, méthode utilisant la réaction d'agglutination, est rendue possible par l'emploi d'anti-sérums dont la spécificité a été obtenue par absorption des hétéro-

<u>N°</u>	<u>Espèce de moustique employée</u>	<u>Animal hôte</u>	<u>Temps de digestion</u>	<u>Anti-sérum employé</u>	<u>Titre du sérum</u>	<u>Réaction d'agglutination</u>
I	A.stephensi	Homme A	6 h.	Cheval anti-G.R. humains	1/2048	positive

agglutinines par des globules rouges d'animaux différents de l'espèce qui a servi à la fabrication des anticorps agglutinants. Nous avons vu de plus que la survie des hématies à l'intérieur de l'estomac du moustique est suffisamment longue pour que les réactions puissent être pratiquées même douze heures après l'ingestion de sang, la structure antigénique des hématies n'ayant subi pendant ce temps aucune modification.

Du point de vue application pratique, cette méthode d'identification des hématies ingérées par les moustiques ou divers insectes hématophages peut rendre de grands services, dans différentes enquêtes épidémiologiques, au cours des endémies tropicales dont les vecteurs sont des moustiques ou d'autres insectes hématophages (Phlébotomes, Cératopogonides, Tiques, etc.).

Cette méthode peut éventuellement rendre service dans l'orientation de la recherche du cycle de certains parasites ou virus dont les hôtes intermédiaires sont encore inconnus, permettant l'identification des réservoirs de virus et même souvent des vecteurs. Dès maintenant, il nous semble qu'on doive utiliser la réaction d'hémagglutination dans le cas où les hématies ingérées par les insectes hématophages ont conservé leur morphologie et, dans les cas intermédiaires, associer cette réaction à la réaction de précipitation. Cette dernière conserve toutes ses indications dans le cas où les hématies ont été digérées.

Nous tenons à remercier le D^r Toumanoff qui a mis son insectarium à notre disposition, et M^{lle} Lapiéd pour son aide technique.

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Juin 1954. — Tome 86.)

UTILISATION DES HÉMAGGLUTININES
POUR
L'IDENTIFICATION DE L'ORIGINE SPÉCIFIQUE
DES HÉMATIES INGÉRÉES
PAR LES MOUSTIQUES HÉMATOPHAGES

PAR

A. GRJEBINE [A. EYQUEM] et [J. FINE]



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

B12500