

**Pouvoir infectieux des larves
de *Molinema dessetae*
(Nematoda : Filarioidea) obtenues
chez un hôte intermédiaire inhabituel :
Toxorhynchites amboinensis
(Diptera : Culicidae)**

Christian BORIES⁽¹⁾, Chantal GUEYOUCHE⁽¹⁾,
Jean-Charles GANTIER⁽¹⁾, Philippe MORARD⁽¹⁾,
Romain VALIK⁽¹⁾, Philippe GAYRAL⁽¹⁾

Résumé

Molinema dessetae est une filaire de rongeur à microfilaries sanguicoles dont l'hôte définitif naturel est *Proechimys oris*. Les microfilaries séparées du sang par filtration sur membrane sont injectées à des *Toxorhynchites amboinensis* mâles et femelles. Elles se développent en larves infectantes en 21 jours. Trois *P. oris* sains ont été infectés avec les larves infectantes. Deux sont devenus microfilarémiques 120 jours après et l'examen post mortem a mis en évidence des filaires mâles et femelles chez les trois animaux. Les larves L3 obtenues chez cet hôte intermédiaire inhabituel sont réellement infectantes pour l'hôte définitif.

Mots-clés : Larves — Filaires — Microfilaries — *Molinema dessetae* — *Toxorhynchites amboinensis*.

Summary

DEVELOPMENT OF *MOLINEMA DESSETAE* INFECTIVE LARVAE (NEMATODA : FILARIOIDEA) INTO AN UNUSUAL HOST : *TOXORHYNCHITES AMBOINENSIS* (DIPTERA : CULICIDAE). *Molinema dessetae* is a Rodent *Filaria* with blood circulating microfilaria, and the natural host is *Proechimys oris*. Microfilariae recovered from blood by membrane filtration were inoculated into male and female *Toxorhynchites amboinensis*. They developed into third stage larvae as early as 21 days. Three *Proechimys oris* were injected with these infective larvae. Two of them exhibit a microfilaremia after 120 days, and after autopsy all were infected by male and female filariae. L3 recovered from this unusual intermediate host are really infective.

Key words : Larvae — Filariae — Microfilariae — *Molinema dessetae* — *Toxorhynchites amboinensis*.

(1) Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

Dans l'entretien des cycles de filarioses, la production de larves infectantes (L3) reste le facteur limitant à un usage extensif de ces modèles. En effet, à côté de leur utilisation pour infecter des hôtes définitifs, ces larves sont nécessaires pour des études physiologiques et pharmacologiques *in vitro*, et pour la production d'antigènes parasitaires. Le nombre de larves infectantes se développant chez un vecteur est nécessairement dépendant du volume sanguin prélevé par l'arthropode et contrôlé par les mécanismes de limitation bien établis chez les moustiques vecteurs de filaires (Bain, 1971 ; Petit et Spitalier-Kaveh, 1978). Enfin les larves obtenues, considérées comme infectantes sur des critères morphologiques doivent être placées en situation de développement chez un hôte définitif adéquat afin de prouver la réalité de leur pouvoir infectant. Disposant d'un modèle de filariose *in vivo* dont, en plus, les larves infectantes constituent une cible pharmacologique privilégiée, nous avons voulu étudier la production de ces larves chez un hôte intermédiaire original : *Toxorhynchites amboinensis* (Doleschall, 1857). *Molinema dessetae* (Bain, 1973) est une filaire de rongeur à microfilaries (mf) sanguicoles ; l'hôte naturel est *Proechimys oris* Thomas, 1904 et le cycle en a été établi par Bain en 1974. La standardisation de cet ensemble a permis de développer différents modèles pour étudier les substances antifilariennes tant *in vivo* sur les *P. oris* filariens (Gayral *et al.*, 1982) qu'*in vitro* sur les larves infectantes récupérées chez *Aedes aegypti*, le vecteur utilisé en laboratoire (Bories *et al.*, 1986). *T. amboinensis* présente l'avantage d'être un gros moustique d'un élevage relativement facile. Il est utile comme multiplicateur de virus après inoculation intrathoracique dans le diagnostic des arboviroses où l'avantage de ne pas être hématophage réduit les risques de dissémination (Coz *et al.*, 1977). Ce travail a donc pour premier objectif l'obtention de larves infectantes de *M. dessetae* après inoculation traumatique des microfilaries ; ensuite la virulence de ces larves sera contrôlée par injection chez le *P. oris*, l'hôte définitif naturel et autopsie après quatre mois.

1. Matériel et méthode

1.1. DÉVELOPPEMENT DU PARASITE

L'hôte intermédiaire utilisé au laboratoire est *Aedes aegypti*, souche Gkep. Les conditions de cet élevage ont été exposées précédemment (Gayral *et al.*, 1982). Les *A. aegypti* femelles s'infectent par piqûre sur *P. oris* microfilariémiqes. Les larves se développent dans le tissu adipeux de l'insecte. Les mues I et

II ont lieu respectivement vers 7-8 et 13-14 jours. Les larves infectantes (L3) sont récupérées par dissection des *A. aegypti* aux 19^e ou 20^e jours. Les rongeurs utilisés sont des *P. oris* descendant de la souche originale antérieurement décrite (Gantier et Gayral, 1979). Lorsque leur âge est d'environ six semaines, ils sont infectés par injection sous-cutanée de 200 larves infectantes. Les premières microfilaries apparaissent dans le sang périphérique 80 à 90 jours plus tard.

1.2. L'HÔTE INTERMÉDIAIRE ARTIFICIEL : *T. AMBOINENSIS*

La souche provient du service d'Entomologie médicale de l'ORSTOM à Bondy. L'élevage de ce moustique se fait selon la technique utilisée dans ce laboratoire (Coz et Désenfant, communication personnelle). L'insectarium est réglé à 80 % d'humidité relative, à une température de $27 \pm 1^\circ \text{C}$, avec une photopériode de 12 heures. Les femelles pondent à la surface de l'eau contenue dans des récipients noirs. Le niveau de l'eau affleure le bord supérieur du récipient pour éviter la noyade de l'imago. Les œufs embryonnés blancs, hydrofuges, flottent à la surface. Un jour sur deux, l'eau des pondeurs est vidée dans un petit bac à fond blanc laissé dans l'insectarium. Les larves apparaissent en 45 à 48 heures ; elles sont placées individuellement dans des pots de plastique (diamètre : 3 cm, hauteur : 5 cm) remplis avec 10 ml d'eau du robinet préalablement équilibrée à la température de l'insectarium. Ces larves carnivores sont nourries à satiété avec des larves stade 1 ou 2 d'*Aedes aegypti*. La nymphose se produit environ 26 à 28 jours après. Les nymphes sont récupérées, réunies par 15 à 20 dans un récipient rempli aux deux tiers d'eau du robinet propre placé à l'intérieur d'une cage en tulle (0,50 × 0,35 × 0,35 m). L'émergence des imagos a lieu quatre à six jours plus tard. Les adultes mâles et femelles se nourrissent d'eau glucosée à 20 % et d'une tranche de fruit frais, pomme ou orange. Un pondeur est introduit dans la cage cinq jours après la formation du premier couple. Lors des expériences nous utilisons des *T. amboinensis* de même génération et même taille avec un nombre égal de mâles et de femelles.

1.3. PRODUCTION DES LARVES INFECTANTES CHEZ *T. AMBOINENSIS*

1.3.1. Isolement et préparation des microfilaries

Les mf sont séparées du sang par une technique de filtration sur membrane. Le sang est prélevé par

ponction sinusale chez le rongeur. L'anticoagulant utilisé est une solution de citrate de sodium à 3,6 %. Le prélèvement est ensuite dilué dix fois avec du RPMI 1640 tamponné par 25 mmol d'Hepes par litre (GIBCO) et filtré sur une membrane en polycarbonate de porosité 5 μm , diamètre 13 mm (Nucléopore) à l'aide d'un appareil Swinnex Q10 (Millipore). Les microfilaires retenues sur le filtre sont remises en suspension dans 100 μl du milieu de dilution. Cette méthode concentre environ quatre fois les microfilaires.

1.3.2. Inoculation des *T. amboinensis*

Les aiguilles d'injection sont préalablement préparées à partir de tube à hématocrite en verre (Hyland, 0.35" i.d. \times 3.55") selon la technique de Coz *et al.* (1977). Les adultes immobilisés par un séjour à + 4°C pendant dix minutes, sont maintenus au froid lors de l'inoculation sur une boîte de Petri contenant de la saumure congelée. L'insecte étant maintenu sur le dos, l'injection est faite en introduisant l'aiguille sous la membrane au niveau du cou (Coz *et al.*, 1977). Un volume de 0,6 μl est poussé par de l'air comprimé et injecté (Rosen et Gubler, 1974). Remis dans l'insectarium, les insectes ayant bien résisté à cette inoculation se remettent sur pattes et volent dans l'heure qui suit. Par convention le jour de l'inoculation est appelé J1.

1.3.3. Récupération des larves et inoculation au *Proechimys oris*

Les *T. amboinensis* sont disséqués individuellement en dénombrant les larves obtenues dans la tête, le thorax et l'abdomen. Ensuite, celles-ci sont regroupées et injectées à de jeunes *P. oris* selon le protocole habituel. Le contrôle de l'infection est fait par la recherche des mf dans le sang circulant et des filaires adultes dans la cavité péritonéale lors de l'autopsie pratiquée 120 jours après l'inoculation (Gayral *et al.*, 1982).

2. Résultats

Les *T. amboinensis* au nombre de 68 ont été inoculés en deux lots à trois jours d'intervalle (expérience n° 1 : n = 32, expérience n° 2 : n = 36). Les mf proviennent de *P. oris* différents pour chaque expérience. Le nombre de mf injectées est estimé en les comptant dans 0,6 μl mesuré avec l'aiguille d'injection puis déposé sur une lame. Ce nombre est 86 ± 44 (déviations standard) lors de la première expérience (huit mesures) et de 134 ± 78 (six mesu-

res) lors de la deuxième. La mortalité des *T. amboinensis* a été de 62 % dans la première expérience et de 61 % dans la deuxième. Les dates de dissection des moustiques survivants ont été choisies en fonction d'expériences préliminaires (tabl. I). Dans le premier lot, les moustiques sont numérotés de 1 à 12 ; un mâle et une femelle ont été disséqués respectivement à J20 et J21, le reste à J22. Le deuxième lot, n° 13 à n° 26, a été disséqué à J24. Les larves infectantes récupérées ont été injectées à trois jeunes *P. oris*. Le rongeur 1955 B a été infecté en deux temps avec les larves infectantes récupérées chez les *T. amboinensis* 1 et 2. Les L3 récupérées à J22 chez les moustiques 3 à 12, et à J24 chez les moustiques 13 à 24 ont été respectivement injectées à 1958 B et 1959 B.

Les résultats de la dissection individuelle des insectes sont portés dans le tableau I. Le tableau II montre la durée du développement des stades larvaires de *Molnema dassetae* chez *T. amboinensis*. Le sex-ratio des survivants (mâles/femelles) dans les expériences n° 1 et n° 2 est respectivement de 1,4 et de 1,33. La répartition des larves infectantes dans le corps des insectes est détaillée par sexe et par date de dissection dans le tableau III.

Les résultats des autopsies des *P. oris* infectés sont présentés dans le tableau IV ; les trois rongeurs inoculés sont effectivement parasités par des filaires de l'un et l'autre sexe.

3. Discussion

Les résultats démontrent que, à travers *T. amboinensis*, il est possible d'obtenir des L3 de *M. dassetae* réellement infectantes. Le développement chez *P. oris* est normal avec obtention d'adultes et ponte de mf par les femelles. Le développement des mf injectées est complet et à peine allongé par rapport aux 19-20 jours nécessaires chez des femelles d'*A. aegypti* infectées par voie naturelle et élevées dans les mêmes conditions d'environnement (Gayral *et al.*, 1982). Il devrait être possible de raccourcir ce délai en modifiant le régime alimentaire des *T. amboinensis* adultes par un apport protidique palliant l'absence de repas sanguin. Ce temps est pourtant plus court que celui obtenu chez *Anopheles stephensi* : 27 jours à 25°C (Bain, 1974). Le rendement des inoculations L3 récupérées/mf injectées est de 21 % dans la première expérience et de 6 % dans la deuxième. Une dissection tardive (J26) au cours de la dernière expérience pourrait être la cause de cette différence de pourcentage, les L3 étant infectantes dès J21 (tabl. IV).

TABLEAU I

Répartition des larves infectantes de *Molinema dessetae*. E.P. : Essai préliminaire

Nombre des <i>T. amboinensis</i> (M ou F)	Date de la dissection	Stade et nombre de larves			TOTAL
		Tête	Thorax	Abdomen	
E.P. M	J 17	1L ₂	4L ₂	0	5L ₂
E.P. M	J 18	0	0	8L ₂	8L ₂
E.P. F	J 21	2L ₃	4L ₃ +1L ₂	9L ₃	15L ₃ +1L ₂
E.P. M	J 21	1L ₃	0	0	1L ₃
1 M	J 21	1L ₃	4L ₃ +1L ₂	8L ₃ +1L ₂	13L ₃ +2L ₂
2 F	J 22	7L ₃	11L ₃ +1L ₂	4L ₃	22L ₃ +1L ₂
3 F	J 24	1L ₃	7L ₃	4L ₃	12L ₃
4 M	J 24	1L ₃	2L ₃	8L ₃	11L ₃
5 F	J 24	0	5L ₃	22L ₃ +2L ₂	27L ₃ +3L ₂
6 M	J 24	2L ₃	7L ₃	10L ₃	19L ₃
7 M	J 24	2L ₃	5L ₃ +1L ₂	1L ₃	8 L ₃
8 F	J 24	13L ₃	10L ₃	2L ₃	25L ₃
9 M	J 24	5L ₃	1L ₃	13L ₃ +1L ₂	19L ₃ +1L ₂
10 F	J 24	0	0	0	0
11 M	J 24	3L ₃	14L ₃	20L ₃	37L ₃
12 M	J 24	1L ₃	2L ₃	1L ₃	4L ₃
Moyenne 1er Exp. n = 10	J 24	2,8	4,8	8,1	15,7
13 M	J 26	0	0	0	0
14 M	J 26	4L ₃	6L ₃	8L ₃	18L ₃
15 F	J 26	0	4L ₃	3L ₃	7L ₃
16 M	J 26	3L ₃	3L ₃	6L ₃	12L ₃
17 F	J 26	0	0	0	0
18 F	J 26	0	0	1L ₃	1L ₃
19 M	J 26	0	0	0	0
20 M	J 26	0	2L ₃	1L ₃	3L ₃
21 F	J 26	2L ₃	1L ₃	3L ₃	6L ₃
22 M	J 26	0	0	0	0
23 M	J 26	0	0	0	0
24 F	J 26	3L ₃	0	0	3L ₃
25 M	J 26	6L ₃	9L ₃	8L ₃	23L ₃
26 F	J 26	5L ₃	1L ₃	0	6L ₃
Moyenne 2e Exp. n = 14	J 26	1,64	1,86	2,7	6,2

TABLEAU II

Stades larvaires de *Molinema dessetae* présents chez *T. amboinensis*. Entre parenthèses pourcentage relatif de L₂ et de L₃

Nombre de <i>T. amboinensis</i> disséqués	Date	Nombre total de larves présentes	L ₂	L ₃
1	J17	5	5 (100%)	0 (0%)
1	J18	8	8 (100%)	0 (0%)
3	J21	31	3 (9,4%)	28 (90,6%)
1	J22	23	1 (4,3%)	22 (95,7%)
9	J24	166	4 (2,4%)	162 (97,6%)
10	J26	81	0 (0%)	81 (100%)

TABLEAU III

Répartition des larves infectantes de *Molinema dessetae* selon le sexe et la localisation anatomique

Sexe et Nombre de <i>T. amboinensis</i> "infectantes"	Nombre de mf injectées	Date	Tête	Thorax	Abdomen	TOTAL
M n = 6	84	J24	2,33	5,17	8,33	16,33
F n = 3	84	J24	4,67	7,33	9,33	21,33
M n = 5	134	J26	2,6	4,00	5,00	11,60
F n = 5	134	J26	2,00	1,20	1,40	4,60

TABLEAU IV

Résultat de l'inoculation des *P. oris* lors de l'autopsie effectuée à J120

<i>P. oris</i> infectés			Nombre de L ₃ injectées	RÉSULTATS	
Numéro	Sexe	Age		Microfilarémic à J 120	Filaires adultes
1955 B	F	90 j	35	0	Un mâle, deux femelles
1958 B	M	30 j	162	12/10 ul	Quatre mâles, six femelles
1959 B	M	45 j	81	5/10 ul	Huit mâles, cinq femelles

Le *T. amboinensis* n° 11 contenait 37 L₃, montrant la possibilité d'obtenir des L₃ en grande quantité. Trois moustiques mâles et deux femelles sont restés sans larves. Ceci peut être lié aux aléas d'une technique délicate et incomplètement possédée. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour

améliorer la technique d'inoculation et préciser le nombre optimal de mf à injecter.

Les L₃ obtenues sont infectantes pour l'hôte définitif. Des expériences de même nature réalisées avec *B. malayi* chez *T. amboinensis* n'avaient permis d'obtenir que des adultes mâles chez *Meriones unguicu-*

latus (Cross et al., 1980). Nos résultats confirment ce que l'on sait déjà sur la manque de spécificité parasitaire des filaires vis-à-vis de leur hôte intermédiaire, et sur les avantages qu'un gros moustique non piqueur présente en matière de production de L3 et d'absence de risques de dissémination accidentelle. L'utilisation de ce moustique avec les espèces de filaires pathogènes pour l'homme pourrait ainsi améliorer la production de larves et des antigènes fila-

riens nécessaires pour un immunodiagnostic ou un futur vaccin.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement MM. Coz et Désenfant du Centre ORSTOM de Bondy pour leurs conseils et la fourniture de la souche de *T. amboinensis*.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 25 juin 1986

BIBLIOGRAPHIE

- BAIN (O.), 1971. — Transmission des Filaires. Limitation des passages des microfilaires ingérées vers l'hémocèle du vecteur. Interprétation. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 46 : 613-631.
- BAIN (O.), 1973. — Une nouvelle Filaire de Rongeur sud-américain, *Dipetalonema dessetae* n. sp. (Nematoda, Filarioidea). *Bull. Mus. nat. Hist. nat. (Paris)*, 3^e série, 116 : 309-316.
- BAIN (O.), 1974. — Développement larvaire de *Dipetalonema dessetae*, Filaire de Rongeur entretenue au laboratoire. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 49, 4 : 457-466.
- BORIES (C.), LOISEAU (P.), GUEYOUCHE (C.), et GAYRAL (P.), 1986 — Utilisation des larves infectantes de *Dipetalonema dessetae* en survie pour l'étude et la recherche de substances filaricides. *J. Pharmacol.* (Paris), sous presse.
- COZ (J.), VALADE (M.), CORNET (M.), LEMOINE (M. O.), et LORANI (A.), 1977. — Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 15, 3 : 209-212.
- CROSS (H. J.), HSU (M. K.) et LIEN (J. C.), 1980. — Preliminary observation on the development of larval filariae in *Toxorhynchites* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 1 : 46-49.
- GANTIER (J. C.) et GAYRAL (Ph.), 1979. — Élevage et constantes biologiques d'un nouveau rongeur de laboratoire *Proechimys oris*, Thomas 1904. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 4, 4 : 233-244.
- GAYRAL (Ph.), DREYFUSS (G.) et GANTIER (J. C.), 1982. — *Dipetalonema dessetae* chez *Proechimys oris* : cycle biologique de la filaire et proposition d'un modèle de filariose expérimentale de rongeur. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 20, 1 : 81-94.
- PETIT (G.) et SPITALIER-KAVEH (H.), 1978. — La filaire *Dipetalonema dessetae* : phénomène de régulation et rendement parasitaire chez l'*Aedes* vecteur. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 54 : 81-92.
- ROSEN (L.) et GUBLER (D.), 1974. — The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23 : 1153-1160.