

## *Dipetalonema dessetae* chez *Proechimys oris*

### Cycle biologique de la filaire et proposition d'un modèle de filariose expérimentale de rongeur <sup>(1)</sup>

Philippe GAYRAL <sup>(2)</sup>

Gilles DREYFUSS <sup>(2)</sup>

Jean-Charles GANTIER <sup>(2)</sup>

#### Résumé

*Dipetalonema dessetae* est une filaire de rongeur à microfilaries sanguicoles diurnes dont l'hôte définitif naturel est *Proechimys oris*. Elle a été adaptée au laboratoire avec le même hôte, la transmission étant assurée par le moustique *Aedes aegypti*. Les conditions d'entretien de ce cycle biologique ont été standardisées pour produire des rongeurs filariens reproductibles.

Infestés par une injection sous cutanée de 200 larves, les rongeurs présentent une microfilarémie 90 jours plus tard qui s'élève puis se maintient en plateau horizontal pendant près de 2 mois. Le nombre moyen de filaires adultes à cette période est de 8 femelles et 4 mâles, tous dans la cavité péritonéale. Le rendement en rongeurs filariens est supérieur à 90 % ; 70 à 90 % sont microfilarémiques, en particulier les mâles. Des observations complémentaires sont données sur la chronologie du cycle biologique de la filaire et la longévité des stades. Ce modèle expérimental pourra être évalué en pharmacologie antifilarienne.

**Mots-clés :** *Aedes* — rongeurs — filaire — biologie — transmission — parasitisme.

#### Summary

*Dipetalonema dessetae* IN *Proechimys oris*. BIOLOGICAL CYCLE OF THE FILARIA AND PROPOSAL FOR AN EXPERIMENTAL FILARIASIS MODEL OF RODENTS

The *Filaria* *Dipetalonema dessetae* has diurnal blood-circulating microfilaria (mf) and the Rodent *Proechimys oris* as natural final host. In the laboratory, transmission to this Rodent is obtained with the mosquito *Aedes aegypti*. After optimization and standardization of the life cycle, reproductible *Filaria*-infested Rodents are obtained.

After infection by 200 subcutaneously injected larva, Rodents exhibit a microfilaremia after 90 days. By day 150, mf count reach an horizontal plateau maintained for nearly two months. At the same time, the mean number of adult worms which are localized in the peritoneal cavity is 8 females and 4 males. More than 90 % of the *Proechimys oris* infected, and from them, 70 to 90 % are microfilaremic, more often male rodents.

Biological data are given on the chronology of the life cycle, mf and adult survival, and mf periodicity. This experimental filariasis should be evaluated as a model for antifilarial pharmacology.

**Key words :** *Aedes* — rodent — filaria — biology — Transmission — parasitism.

(1) Travail effectué avec l'aide de l'I.N.S.E.R.M. dans le cadre de l'Action Spéciale de Recherches sur les Parasitoses n° 3. Projet « Problèmes de Chimiothérapie Filaricide ».

(2) Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, 92290 Chatenay Malabry.

## INTRODUCTION

Une des conséquences de la très forte spécificité parasitaire des filaires de l'homme est l'absence de modèle expérimental facilement accessible. Adaptées à divers mammifères comme les primates, elles constituent des modèles sophistiqués dont la vulgarisation est peu envisageable. Les Rongeurs habituels de laboratoire sont de mauvais hôtes définitifs, ce qui conduit à des cycles très artificiels dont les résultats ne sont pas toujours transposables à l'homme. La sensibilité des filaires expérimentales aux chimiothérapies spécifiques diffèrent fréquemment de celle des filaires humaines.

Ces difficultés inhérentes à ce groupe de nématodes très évolués rendent compte du petit nombre d'études réalisées sur la biologie, la pathologie, l'immunologie et la pharmacologie des filarioses et d'autre part de l'absence de chimiothérapie spécifique acceptable. Ainsi, dans le Programme Régional de Lutte contre l'Onchocercose en Afrique, la lutte antivectorielle est la seule arme disponible, aucune thérapeutique de masse n'étant recommandable. Comparativement, dans une autre endémie tropicale majeure, les bilharzioses, où la spécificité des parasites est moins stricte, la diffusion de nombreux modèles a permis d'immenses progrès vers la connaissance de la biologie des vers, et la mise au point récente de plusieurs médicaments remarquables.

D'où la nécessité reconnue et répétée par les autorités internationales compétentes (O.M.S., 1979) de rechercher des foyers naturels de filarioses et de tenter d'en adapter les cycles en laboratoire pour déboucher sur d'éventuelles applications expérimentales du modèle.

Une des dernières filaires découvertes dans la nature est *Dipetalonema dessetae* (Bain, 1973) parasite d'un rongeur brésilien, *Proechimys oris* (Thomas) dont les divers éléments du cycle ont été rapportés et adaptés en Laboratoire au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (Laboratoire de Zoologie, Section Vers, Pr. A. G. Chabaud). Rapidement, cette filaire s'est avérée être extrêmement valable par ses possibilités d'adaptation, sa transmission par moustique, la prolificité du rongeur hôte définitif, et surtout par sa sensibilité à deux médicaments antifilariens humains (Gayral et Pommès, 1976).

Pour passer d'un cycle naturel maintenu en laboratoire à un véritable modèle expérimental, tous les paramètres d'entretien ont dû être améliorés et optimisés et les résultats sont présentés ici : rationalisation des élevages de moustique et de

rongeur, standardisation et contrôle des infestations. Différents modes d'infestation des rongeurs ont été comparés statistiquement pour obtenir un standard de rongeur filarien fiable et reproductible, défini par la microfilarémie et le nombre de filaires adultes.

L'obtention de ce modèle a permis de préciser certains paramètres biologiques de la filaire : développement, localisation et longévité des différents stades chez le rongeur, périodicité et niveau de la microfilarémie, nombre de filaires adultes. Ces valeurs serviront de référence dans les expérimentations pharmacologiques faisant l'objet de la suite de ce travail (Gayral *et al.*, 1982 ; Kani *et al.*, 1981).

## 1. ORIGINE ET DÉFINITION DES SOUCHES

Le complexe de la filariose *Dipetalonema dessetae* chez *Proechimys oris* a été découvert en zone forestière aux abords de Belem (Brésil). Trois rongeurs dont un couple ont été rapportés en France, et tous les descendants actuels en sont issus.

Les rongeurs avaient été initialement déterminés comme étant *Proechimys guyanensis* (Geoffroy) et l'identification a été rectifiée en *Proechimys oris* (Thomas) par F. Petter (Laboratoire de Mammalogie, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) (Gantier et Gayral, 1979).

La place taxonomique et la description des différents stades de développement de la filaire *Dipetalonema dessetae* ont été publiées dans plusieurs articles (Bain, 1973, 1974 ; Bain et Chabaud, 1975 ; Anderson et Bain, 1976 ; Chabaud et Bain, 1976).

Le vecteur naturel n'est pas connu ; cependant il peut s'agir d'un moustique et, en laboratoire différentes espèces ont été comparées, et la plus efficace est *Aedes aegypti* souche GKÉP (Ghana Kpedome) spécialement sélectionnée pour la transmission des filaires de reptiles, fournie par P. Mc Greevy (London School of Tropical Medicine).

*D. dessetae* est donc une filaire de rongeur transmise par moustique. Le rongeur est *P. oris*, hôte définitif naturel du parasite qui est lui-même entretenu au laboratoire. Les filaires adultes sont libres et mobiles dans la cavité péritonéale et les microfilaires (mf) sont sanguicoles et périodiques diurnes. Le moustique s'infeste par piqûre sur un rongeur microfilarémique et les mf devenues larves de 1<sup>er</sup> stade (L 1) gagnent le tissu adipeux du moustique où elles muent en larve de 2<sup>e</sup> (L 2) puis 3<sup>e</sup> stade (L 3) vers 7-8 et 13-14 jours. Lors

d'un nouveau repas sanguin, le moustique devenu infestant par la présence de larves L 3 infestantes dans ses pièces buccales va permettre à ces larves de sortir par effraction et de pénétrer dans la peau du rongeur. Les premières mf apparaissent dans le sang périphérique 80 à 90 jours après la piqûre infestante (Bain, 1974).

La disponibilité de cette filariose en laboratoire implique donc l'élevage des *P. oris*, des *A. aegypti*, la production de moustiques infestants et enfin l'infestation des rongeurs.

## 2. ÉLEVAGES DES HÔTES DE LA FILAIRE

Les améliorations apportées aux conditions d'élevage des rongeurs et des moustiques visent à une standardisation pour réduire les manipulations et produire des animaux homogènes et reproductibles avec lesquels une étude objective des modes d'infestation des rongeurs sera possible.

### 2.1. Le rongeur

*P. oris* est un rongeur de taille moyenne pesant de 200 à 300 g, facile à manipuler. Ses caractères morphologiques et biologiques, son élevage et sa reproduction ont été décrits précédemment (Gantier et Gayral, 1979).

### 2.2. Le moustique

L'élevage d'*Aedes aegypti* est facile et se fait selon les techniques en usage dans les laboratoires d'entomologie (Gerberg, 1970). Les principales modifications ont visé à obtenir des adultes de belle taille assurant au mieux leur infestation lors du repas de sang, et à simplifier les manipulations.

L'éclosion des nymphes est plus synchronisée lorsque la durée d'immersion des œufs est limitée. Le volume d'eau doit être de 4 ou 5 ml par larve, avec adjonction de levure de bière dans l'alimentation (Smith, 1966 ; Gerberg, 1970).

D'où le protocole d'élevage suivant :

Les œufs embryonnés sont immergés pendant 2 heures dans une infusion de foin stérilisée et 60 à 70 % des œufs vont éclore. Les larves sont nourries sur poudre de biscuit pour chien donné 2 fois par jour. Le 3<sup>e</sup> jour après l'éclosion, les larves sont réparties en cuvettes plastiques blanches de 0,23 × 0,35 m à raison de 500 larves pour 2 litres d'eau. Leur alimentation est supplémentée en extrait de levure de bière.

L'élevage des stades préimaginaux et des adultes se fait dans un insectarium dont les conditions climatiques sont régulées à 26-28°C pour la température, 80 % pour l'humidité relative, et 12 heures pour la photopériode.

La nymphose se déroule de façon synchrone sur 24 heures le 7<sup>e</sup> jour. Les nymphes sont récoltées à la pipette. Les techniques de sédimentation en eau froide permettant de séparer les nymphes qui flottent des larves qui coulent ne nous ont pas donné satisfaction, la séparation étant imparfaite (Weathersby, 1963 ; Hazard, 1967).

Les nymphes sont mises à éclore dans des cages d'adultes en tulle à raison de 500 dans une cage de 0,25 × 0,25 × 0,25 m ou de 1 000 dans une cage de 0,35 × 0,35 × 0,50 m.

Dès l'éclosion, les adultes ont à leur disposition des cotons imbibés d'une solution de saccharose. A partir de 4 ou 5 jours après l'éclosion le premier repas de sang a lieu sur lapin préalablement anesthésié au Nembutal injectable. Le repas de sang dure quelques minutes ; il est renouvelé deux fois par semaine, et la ponte qui suit s'effectue sur une bande de papier filtre placée dans un récipient cylindrique rempli d'eau. Les pontes sont déposées régulièrement au niveau du ménisque eau-papier et se trouvent à sec au fur et à mesure que le niveau de l'eau baisse par évaporation. Les bandes de papier sont récupérées toutes les semaines dans l'insectarium, elles sont conservées à température ambiante du laboratoire, restant viables plusieurs mois. Les cages d'élevage sont renouvelées tous les mois.

Les moustiques destinés à être nourris sur rongeur filarien sont élevés dans les mêmes conditions, à l'exception des repas sanguins sur lapin, et des pontes qui ne sont pas conservées.

## 3. PRODUCTION DE LARVES INFESTANTES CHEZ LE MOUSTIQUE

Les femelles d'*Aedes aegypti* destinées à être infestées par *D. dessetae* seront nourries sur rongeur microfilariémique pour leur premier repas sanguin.

Ce repas infestant sera pris entre 11 et 16 h du fait du caractère périodique diurne de la microfilariémie. Le niveau de la microfilariémie chez le rongeur intervient dans le niveau et la probabilité d'infestation du moustique. En effet le pourcentage de mf passant de l'intestin moyen vers la cavité générale du moustique est inversement proportionnel au nombre de mf ingérés. Cette limitation de

l'infestation du moustique serait due à une réaction de l'épithélium intestinal au passage des mf (Bain et Chabaud, 1975 ; Petit, 1978). Le volume du repas de sang d'un moustique étant de l'ordre de 2,9  $\mu$ l (Wharton, 1957), le meilleur rendement théorique serait obtenu avec une microfilarémie de 200 mf pour 10  $\mu$ l de sang soit 60 mf ingérées donnant environ 18 larves infestantes dans la cavité générale du moustique. Les résultats obtenus en production de masse sont nettement inférieurs, mais ce seuil de 200 mf a néanmoins été retenu comme microfilarémie minimale des rongeurs servant à infester les moustiques.

Petit *et al.*, (1977) ont montré la nécessité de repas sanguins supplémentaires pour permettre aux larves d'assurer leur maturation. C'est pourquoi, après le repas infestant à J 1, les moustiques sont nourris 3 fois sur lapin à J 4, J 7, et J 10. On ne donne pas de 4<sup>e</sup> repas pour éviter une éventuelle perte en larves infestantes qui auraient été très précoces dans leur maturation.

Comparativement aux moustiques sains, la survie des moustiques infestés est plus courte : en effet 21 jours après le repas infestant sur 2 lots de moustiques de même origine nourris le même nombre de fois, il restait 91 % des témoins et 61 % des infestés.

Les L 3 sont observées vers 14 jours après l'infestation et elles vont achever leur maturation et migrer de l'abdomen vers les parties antérieures du moustique, tête et pièces buccales, où on les retrouve infestantes pour le rongeur vers le 18<sup>e</sup> jour (Bain, 1974).

La phase suivante du cycle d'entretien est la récolte de ces L 3 pour infester les rongeurs.

Deux techniques principales ont été comparées :

- La dissection individuelle des moustiques femelles ;
- l'extraction des larves par un protocole proche de la méthode de Baermann pour extraction des nématodes.

Pour les disséquer, on dilacère les moustiques dans un liquide de survie pour invertébrés<sup>(1)</sup> et on prélève les larves libérées au bout de quelques minutes. On peut disséquer séparément tête, thorax, abdomen.

L'autre méthode va consister à écraser légèrement les moustiques, à disposer cette purée enve-

loppée d'une feuille de cellulose (type Kleenex), dans une passoire à fond arrondi, et à placer cette passoire sur un entonnoir rempli de liquide de survie. Les larves vont migrer et sédimenter vers le fond de l'entonnoir où on les récupère. Cette technique est améliorée en disposant une lampe de 60 W à 15 cm au dessus de l'entonnoir ; le temps de contact varie de 30 mn à 3 heures.

La dissection individuelle peut être considérée comme méthode de référence mais elle est très fastidieuse compte tenu du nombre de larves nécessaire aux infestations des Rongeurs. L'extraction est beaucoup plus simple, son rendement varie entre 50 et 80 % et atteint 90 à 95 % des dissections individuelles avec la lampe et un contact d'une heure.

Le résultat de la standardisation des techniques d'élevage et d'infestation des moustiques est une augmentation du nombre moyen de L 3 par moustique, de  $2,93 \pm 2,37$  chez 510 femelles avant, à  $5,44 \pm 0,43$  chez 12 170 après, déterminé par dissection individuelle entre J 17 et J 23. La réduction de l'écart-type reflète la meilleure homogénéité des résultats, et la stabilité du nombre de L 3 entre J 17 et J 23 visible sur la figure 1 permettant d'effectuer les dissections sur une période de 6 à 7 jours.

#### 4. INFESTATION DES RONGEURS

Dans son biotope naturel, *D. dessetae* est transmise vraisemblablement par piqûre de moustique ; en laboratoire divers modes de transmission sont envisagés, l'infestation naturelle par piqûre d'*Aedes aegypti* infestants, l'injection de larves L 3 infestantes ou parfois la transplantation de filaires adultes d'un rongeur filarien à un non infesté. Ces trois techniques ont été évaluées sur un ensemble de 375 *P. oris*, et on les a comparées statistiquement pour déterminer un protocole d'infestation permettant de produire un rongeur filarien standard défini par :

- son parasitisme c'est à dire le profil ou le niveau de sa microfilarémie, et le nombre de filaires adultes hébergées à un temps donné ;
- une reproductibilité et une fiabilité dans ces résultats et donc dans les infestations ;

(1) Formule : Na<sub>2</sub> H PO<sub>4</sub> 120 mg ; K Cl 300 mg ; Ca Cl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 100 mg ; Mg Cl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O 300 mg ; Mg SO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 400 mg ; eau distillée qsp 100 ml. Ajuster à pH 6, 4 avec KOH et ajouter avant emploi : glucose 2500 mg (origine : Lab. des Vers MNHN).

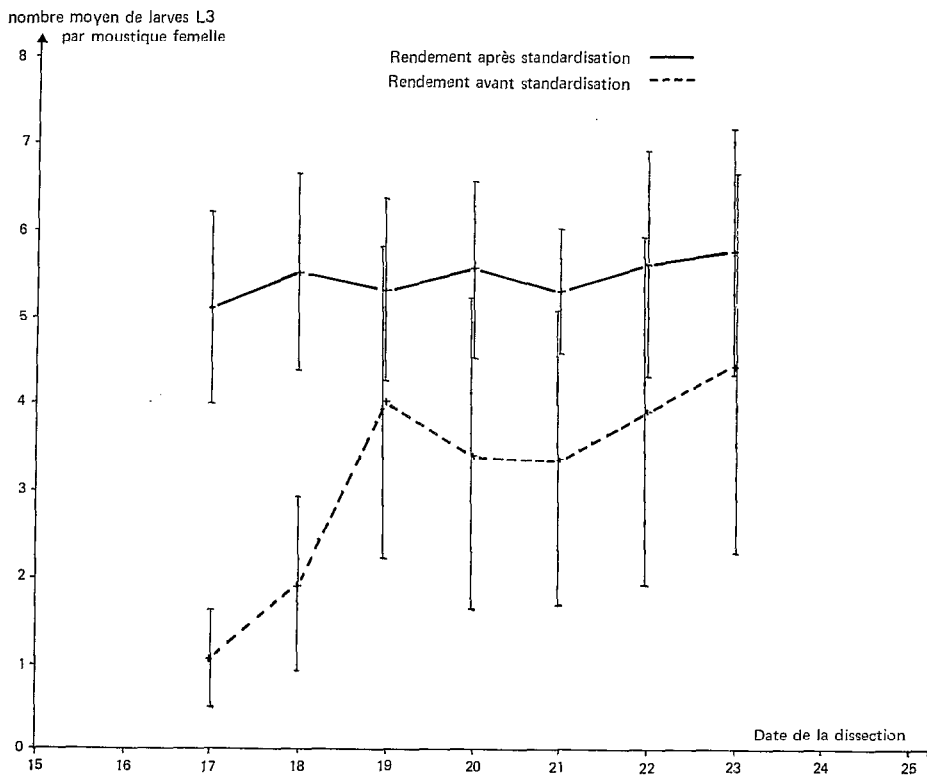


FIG. 1. — Rendement en larves L 3 par moustique

— un rendement acceptable en rongeurs filariens si possible à un coût limité.

#### 4.1. Techniques d'infestation

Elles font appel à des *P. oris* standards âgés de 6 à 10 semaines.

L'infestation naturelle consiste à placer un rongeur dans une cage contenant des *A. aegypti* infestants (18 à 21 jours après infestation). Le nombre de moustiques dans la cage peut avoir été fixé en fonction du nombre moyen de L 3 par femelle qu'on aura déterminé au préalable sur un échantillon.

La transplantation d'adultes a été préconisée dans certaines filarioses de rongeurs où le nombre de vers adultes est important et permet à partir d'un hôte définitif normal, d'infester de nombreux hôtes d'espèce différente mais plus faciles à manipuler (Denham, 1979). Par autopsie de *P. oris* filarien on récupère les filaires adultes dans la

cavité péritonéale et on les réimplante stérilement dans la cavité péritonéale d'un *P. oris* sain.

L'injection parentérale de L 3 infestantes a été la technique la plus étudiée car, plus standardisable, elle a servi de référence. Les larves sont obtenues par dissection ou extraction des moustiques (cf § 3), isolées et comptées. Le nombre prévu est injecté dans un volume de liquide de survie d'invertébré ne dépassant pas 0,5 ml. L'injection est effectuée sous anesthésie en sous-cutanée au niveau de l'aîne ou de la nuque, avec une aiguille fine de 0,5 mm de diamètre.

Des observations préliminaires ayant montré que 100 était un minimum, il a été injecté entre 100 et 200 larves, en une ou plusieurs fois à intervalle de 4 à 10 jours.

#### 4.2. Contrôle du parasitisme

Les filaires adultes sont récoltées par rinçage de la cavité péritonéale du *P. oris*.

Les mf sanguicoles sont dénombrées par la technique classique de la goutte épaisse.

Le prélèvement de sang se fait au sinus rétro-orbitaire sous légère anesthésie du rongeur à l'éther anesthésique. Une goutte calibrée de 10 µl est déposée sur une lame dégraissée. Après séchage, hémolyse à l'eau, séchage, fixation et coloration au colorant de Giemsa, les mf sont décomptées. Cette technique classique est précise et reproductible. Nous ne trouvons pas d'empreinte indiquant un décollement des mf lors de ces manipulations. D'autre part les techniques d'hémolyse et de comptage dans une chambre d'observation n'ont pas donné satisfaction car les mf sont rapidement tuées par l'agent hémolytique, et plus difficiles à repérer.

Les numérations de mf effectuées tous les mois sont présentées en histogramme avec en ordonnées les microfilarémies en valeurs réelles à droite, en pourcentages par rapport à J 150 à gauche (fig. 2 à 6).

4.3. Résultats : infestation et microfilarémie

Les résultats généraux des essais sont présentés dans le tableau I avec les pourcentages de *P. oris* filariens selon le mode d'infestation et selon la présence ou non de microfilaires et de filaires adultes.

Ces résultats concernant les microfiliariens sont repris et détaillés dans le tableau II, et à nouveau

TABLEAU I  
Résultats généraux des infestations

Mode d'infestation	Injection sous-cutanée 200 L <sup>3</sup>		Injection sous-cutanée 100 à 160 L <sup>3</sup>		Plusieurs inj. sous-cutanées successives		Piqûre des <i>Aedes</i>		Transplantation d'adultes	
	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%
mf + Adultes +	158	81	17	63	30	57	50	55	9	90
mf - Adultes +	17	9	4	15	14	26	18	20		
mf - Adultes -	19	10	6	22	9	17	23	25	1	10
Population globale 375 <i>P. oris</i>	194		27		53		91		10	

TABLEAU II  
Microfilarémie selon le mode d'infestation

Mode d'infestation	Injection sous-cutanée 200 L <sub>s</sub> ± 20 %		Injection sous-cutanée moins de 160 L <sub>s</sub>		Plusieurs injections sous-cutanées successives		Piqûre naturelle des <i>Aedes</i> femelles		Transplantation de Filaires adultes		Résultats cumulé	
	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%	<i>P. oris</i>	%
Microfilarémie (> 50 mf/10 µl)	27	30	4	33	15	68	8	31	1	20	55	35
Microfilarémie (< 50 mf/10 µl)	46	49	5	42	6	27	15	58	4	80	76	48
Microfilarémie précocement nulle	20	21	3	25	1	5	3	11	0	0	27	17
Total étudié	93		12		22		26		5		158	

classés selon le mode d'infestation. Les microfilarémies indiquées correspondent aux maxima atteints. Certains rongeurs ne sont microfilarémiques que transitoirement pendant 1 à 2 mois ; ils sont appelés précocement nuls, par rapport aux autres dont la microfilarémie persiste plusieurs mois.

Dans le tableau III sont regroupés les éléments permettant la comparaison des moyennes des microfilarémies et de leurs variances. Pour chaque type d'infestation on a la moyenne à la même date des microfilarémies de tous les rongeurs. On comparera donc d'une part les moyennes entre elles (test t) d'autre part leurs variances (test F) ce

qui renseignera sur la fiabilité de chacun des types d'infestation.

4.3.1. INJECTION SOUS CUTANÉE UNIQUE

D'emblée ce protocole a donné les résultats les plus intéressants à interpréter. Des essais préliminaires avaient montré qu'au-dessous de 100 L 3 les infestations étaient irrégulières avec un pourcentage de filariens inférieur à 40 %. Entre 100 et 160 L 3 ce pourcentage atteint donc 78 % et 90 % ; c'est pourquoi le nombre de 200 L 3 a été retenu comme base de comparaison. A nombre de larves égal, l'injection multiple est moins rentable que l'injection unique, puisque le nombre de

TABLEAU III

Moyennes de la microfilarémie en fonction du mode d'infestation et intervalle de confiance

Mode d'infestation	Jours d'infestation										
	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
Injection sous-cutanée unique de 200 larves (94 Pr)				11,15	45,32	73,73	71,97	71,44	74,38	119,26	207,10
				+	+	+	+	+	+	+	+
Injection sous-cutanée unique de moins de 160 larves (19 Pr)				F *	F	F				F *	F *
				4,25	73,00	95,33	157,66	118,62	163,12	4,14	11,14
Injections sous-cutanées répétées (21 Pr) (2 fois 50 à 100 larves)				+	+	+	+	+	+	+	+
				6,38	66,36	97,56	143,94	145,98	232,68	5,08	17,80
Piqûres d'Aedes (26 Pr)				F	F	F				F	F *
				10,48	35,23	50,40	54,07	67,46	78,33	84,35	74,05
Transplantation de filaires adultes (27 Pr)				+	+	+	+	+	+	+	+
				8,92	29,44	43,48	53,28	60,14	79,42	85,46	95,94
Transplantation de filaires adultes (27 Pr)	3,37	7,55	13,77	23,36	24,61	34,27	32,10	21,60	19,37	9,16	10,33
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2,44	2,66	10,98	22,30	35,16	56,04	54,38	29,78	21,60	12,52	16,82

\* : Moyenne significativement différente entre l'injection sous-cutanée unique de 200 larves et les autres modes d'infestation (test t)

F : Variance significativement différente entre l'injection sous-cutanée unique de 200 larves et les autres modes d'infestation (test F). (sauf transplantation)

rongeurs microfilariens n'est pas augmenté, au contraire ; de plus, ce mode d'infestation multiplie les manipulations de rongeurs.

Ces résultats bruts peuvent être complétés par la comparaison des profils de microfilarémie (fig. 2, 3, 4).

Après une injection unique de 200 larves, la microfilarémie croît de J 90 à 150 puis marque un plateau pendant 90 jours. Ce plateau est observé avec l'ensemble des 94 *P. oris* microfilariens, à une moyenne de 73 mf pour 10  $\mu$ l. On le retrouve avec 20 rongeurs sélectionnés pour leur microfilarémie un peu plus élevée de moyenne, 140 mf pour 10  $\mu$ l (tabl. VII).

Ce plateau remarquable est régulièrement observé mais à des niveaux différents. Cette particularité est un des éléments qui nous a fait retenir ce mode d'infestation, car cette période permet facilement l'évaluation pharmacologique d'activité microfilaricide.

Avec un nombre inférieur de larves infestantes (fig. 3) l'aspect général de la courbe est moins régulier ; comme le rendement en rongeurs microfilarémiques est plus faible ce protocole n'est pas retenu.

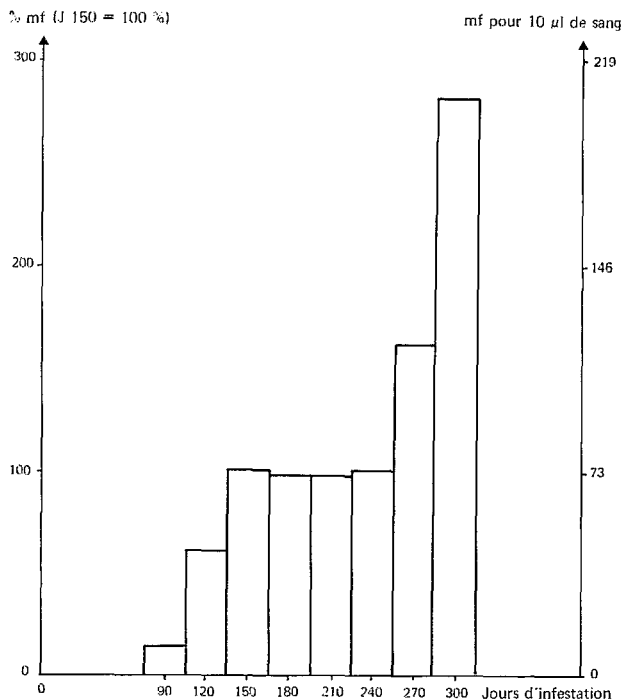


FIG. 2. — Microfilarémie des rongeurs infestés par 200 larves en une seule injection (94 animaux)

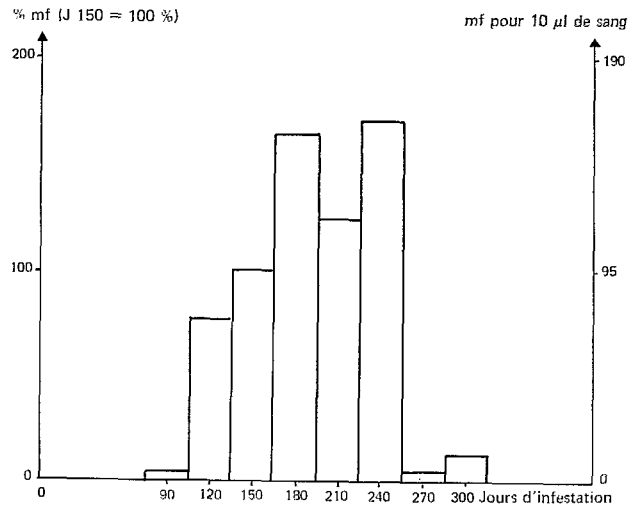


FIG. 3. — Microfilarémie des rongeurs infestés par 100 à 160 larves en une seule injection (19 animaux)

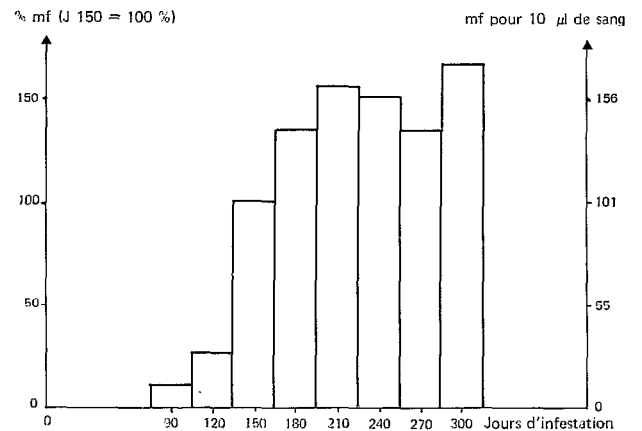


FIG. 4. — Microfilarémie des rongeurs infestés par 100 à 200 larves en plusieurs injections (21 animaux)

Enfin, à la suite d'injection multiples (fig. 4) on a une microfilarémie plus élevée atteinte plus progressivement, avec un plateau entre J 200 et 300. Les éléments favorables sont tempérés par le délai trop long de survenue de ce plateau. A partir des tableaux I, II et III, la technique la plus rentable est l'injection unique de 200 larves car elle donne un fort pourcentage de rongeurs microfilariens allié à une microfilarémie rapidement constante.



La comparaison des moyennes des microfilarémies en un temps donné (tabl. III) ne montre que peu de différences significatives entre les 3 techniques d'injection unique ou multiple. D'autre part, en comparant individuellement la variance de l'injection unique de 200 larves à celles des deux autres (tabl. III) on observe des différences significatives indiquant une dispersion plus grande des moyennes avec ces 2 autres techniques. L'injection unique de 200 larves est donc plus fiable tout en étant de réalisation plus facile.

4.3.2. PIQÛRE DE MOUSTIQUE

Sur 91 *P. oris* infestés par piqûre, 75 % sont parasités, et 55 % seulement sont microfilarieux. Le pourcentage élevé de rongeurs non infestés ou amicrofilarémiques peut s'expliquer par le faible nombre de larves infestantes déposées lors de la piqûre. En effet les numérations de L 3 sur des échantillons de moustiques pris dans des cages avant et après piqûre ont montré que 30 % seulement des L 3 disparaissent de chez le vecteur.

L'évolution de la microfilarémie déterminée sur 26 *P. oris* (fig. 5) suit une montée lente n'atteignant son maximum que vers 270 jours après l'infestation, et sans présenter de plateau.

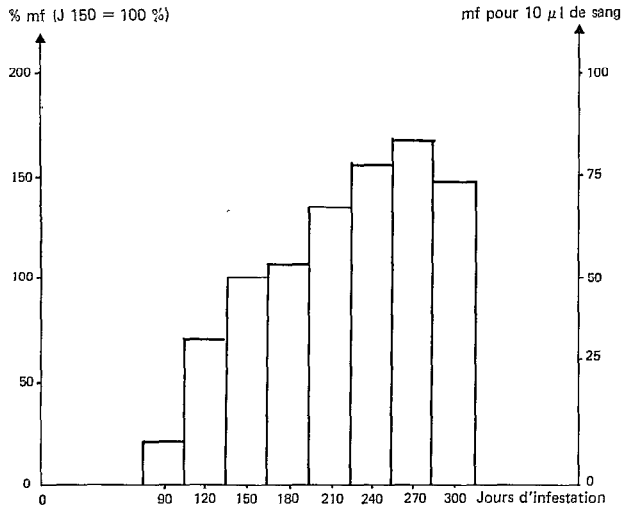


FIG. 5. — Microfilarémie des rongeurs infestés par piqûre d'*Aedes aegypti* (26 rongeurs)

La dispersion des données obtenues dans cette technique apparaît dans l'analyse de variance des microfilarémies moyennes (tabl. III); elle est significativement plus importante dans les trois

premiers mois de la microfilarémie, comparative- ment à la technique d'une injection unique de 200 larves. L'infestation naturelle est plus aléatoire et ne peut être envisagée dans une modélisation.

4.3.3. TRANSPLANTATION DE FILAIRES ADULTES

La microfilarémie est toujours basse et de nombreux rongeurs se négativent très vite, ce qui donne à la courbe de la moyenne une allure régulière (fig. 6), et ce qui est reflété par les valeurs élevées des intervalles de confiance de la moyenne (tabl. III). Ce protocole ne convient donc pas pour préparer des *P. oris* microfilarémiques.

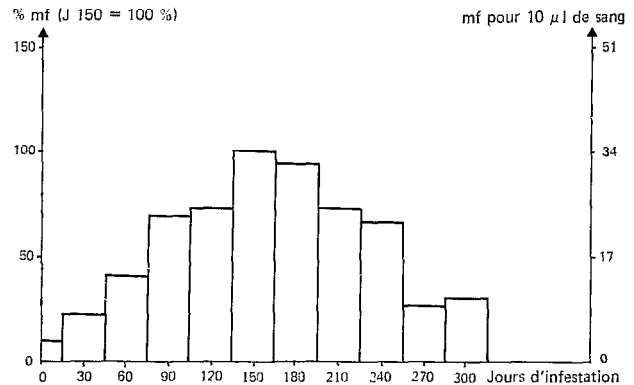


FIG. 6. — Microfilarémie des rongeurs infestés par transplantation de filaires adultes (27 animaux)

4.3.4. INFLUENCE DU SEXE SUR LA MICROFILARÉMIE

Pour préciser l'influence du sexe du rongeur hôte sur la microfilarémie, nous avons repris les observations d'une série de 343 rongeurs infestés sur une période de deux années, qui ont été classés par sexe et selon leur microfilarémie (tabl. IV). Globalement, 88,8 % des mâles et 76,8 % des femelles sont microfilarémiques. Le reste est constitué de quelques rongeurs qui n'ont jamais présenté de mf dans leur sang et qui, à l'autopsie, quand ils ne sont pas négatifs n'hébergent qu'un très petit nombre de vers adultes souvent du même sexe.

Ces différences bien que faibles sont dans l'ensemble statistiquement significatives (test du Chi carré, au risque 0,05) et les *P. oris* mâles paraissent plus fréquemment microfilarémiques que les femelles. Par ailleurs, la proportion de rongeurs précocement nuls qui, a priori, ne sont pas utilisables du point de vue pharmacologique, est plus faible chez les mâles.

TABLEAU IV

Influence du sexe du rongeur sur la microfilarémie

	<i>P. oris</i>	
	mâle	femelle
Microfilarémie +		
> 50 mf p 10 µl	89 41,8 %	47 36,1 %
1-50 mf p 10 µl	79 37,1 %	36 27,7 %
précocement nuls	21 9,9 %	17 13,1 %
total mf +	88,8 %	76,8 %
mf — adulte +	15 7 %	15 11,5 %
total parasités	95,8 %	88,5 %
négatifs	9 4,2 %	15 11,5 %
total	213 100 %	130 100 %

C'est pourquoi ces résultats bien que ne devant pas faire exclure les *P. oris* femelles des essais, nous ont incité à préférer les rongeurs mâles lors des infestations. Ce choix apparaît à l'évidence

dans les données du tableau IV, où 62 % des 343 *P. oris* utilisés sont des mâles.

## 4.4. Rendement en filaires adultes

Le protocole d'infestation par injection sous-cutanée unique de 200 larves infestantes a été retenu pour plusieurs raisons dont les caractéristiques de la microfilarémie. La période du plateau étant favorable aux évaluations pharmacologiques d'antifilariens, il fallait connaître le nombre d'adultes hébergés par les *P. oris* au cours de cette période pour que ces données servent de référence.

On a déterminé la charge parasitaire de 75 rongeurs microfilarémiques, infestés depuis  $200 \pm 30$  jours. Les résultats sont présentés dans le tableau V selon le sexe de la filaire et du *P. oris* hôte.

Chez le rongeur mâle, on obtient 13 filaires adultes soit 4,8 mâles et 8,2 femelles, et chez le rongeur femelle 12,6 vers adultes dont 4,4 mâles et 8,2 femelles.

Il n'y a pas de différence significative selon le sexe du rongeur et on trouve près de 2 fois plus

TABLEAU V

Nombre de filaires adultes par *P. oris* selon le sexe. (autopsie à  $J200 \pm 20$ )

Résultat de l'autopsie	<i>P. oris</i> mâles	<i>P. oris</i> femelles	Total <i>P. mâles et P. femelles</i>
Nombre de rongeurs autopsiés	40	35	75
Nombre de filaires mâles présentes	192	154	346
Nombre moyen de filaires mâles par rongeur	$4,80 \pm 1,34$	$4,40 \pm 1,35$	$4,60 \pm 1,34$
Nombre de filaires femelles présentes	328	288	616
Nombre moyen de filaires femelles par rongeur	$8,20 \pm 1,76$	$8,23 \pm 1,92$	$8,21 \pm 1,84$
Nombre total de filaires présentes	520	442	962
Nombre moyen de filaires des deux sexes par rongeur	$13,00 \pm 1,55$	$12,63 \pm 1,63$	$12,81 \pm 1,59$

de filaires femelles que de mâles. Ces résultats ne reflètent qu'une situation moyenne à J 200 qui peut évoluer dans le temps ; la dispersion du nombre de filaires mâles peut indiquer une longévité moyenne plus courte, certaines ayant déjà disparu de chez le rongeur.

## 5. PRÉSENTATION DU MODÈLE

### 5.1. Définition

Les souches utilisées sont *Dipetalonema dessetae*, *Proechimys oris* et *Aedes aegypti* GKEP dont les origines ont été données au § 1. Les moustiques sont infestés par piqûre d'un *P. oris* dont la microfilarémie est de l'ordre de 200 mf p 10  $\mu$ l. Après 18 à 21 jours, les moustiques sont dilacérés et les larves infestantes sont récupérées par extraction d'une heure avec éclairage sur le prélèvement. Deux cents larves sont prévues par rongeur.

Ceux-ci sont âgés de 6 à 10 semaines, et de sexe indifférent. Les larves sont introduites par une injection sous-cutanée au niveau de la nuque ou de la face interne de la cuisse.

90 % des rongeurs sont parasités et 81 % sont microfilarieux 90 jours après l'infestation. De ceux-ci 15 % deviendront amicrofilarémiques dès 150 jours. La microfilarémie des autres s'élèvera pour atteindre un plateau ou elle se maintiendra pendant 60 à 90 jours soit jusqu'à 210 à 240 jours après l'infestation. S'ils sont autopsiés au terme de cette période, ils hébergent en moyenne 4 à 5 filaires mâles et 8 à 9 femelles.

### 5.2. Cycle et observations biologiques

A partir de ce modèle, plusieurs points ont pu être précisés sur la biologie et la chronologie des différents stades de la filaire chez *P. oris* (fig. 8).

#### 5.2.1. ADULTES

Les filaires adultes se tiennent exclusivement dans la cavité péritonéale, libres et mobiles ; dans quelques très rares cas, elles ont été retrouvées dans le thorax. Leur longévité maximale observée est supérieure à 570 jours tant pour les mâles que les femelles.

#### 5.2.2. MICROFILAIRES

La microfilarémie est traditionnellement évaluée par la concentration en mf dans le sang prélevé

au sinus rétroorbitaire. On en sait néanmoins si cette valeur reflète les concentrations dans les capillaires sanguins où se nourrissent les moustiques.

La longévité des mf a été évaluée chez des *P. oris* traités par un médicament antifilarien spécifique des adultes le Mel W ou Mélarsoprol (100 mg/kg/j pendant 5 jours). Elle est supérieure à 560 jours.

Chez un rongeur infesté, la microfilarémie débute vers J 80 et elle va persister pendant une durée très variable de quelques mois à 3 ou 4 ans, le maximum observé étant de 1 140 jours, ceci compte tenu du fait que peu de *P. oris* sont conservés aussi longtemps. La durée moyenne évaluée sur 24 rongeurs suivis pendant 3 ans est de  $620 \pm 62$  jours. Comme il a déjà été indiqué, certains rongeurs ont une période de microfilarémie très courte, de l'ordre de 1 à 2 mois (J 90 à J 150 après l'infestation). Une fois amicrofilarémiques, ces *P. oris* restent pendant des mois en deçà de la limite de sensibilité des techniques de numération des mf bien que les filaires adultes soient présentes et vivantes. Ces rongeurs appelés précocément nuls représentent environ 15 % des effectifs, taux qui peut être réduit en injectant en plusieurs fois les 200 larves infestantes et en préférant des mâles.

Les variations individuelles sont donc importantes. De même le niveau et l'évolution de la microfilarémie varient d'un *P. oris* à l'autre de façon imprévisible surtout à partir de J 250. Aucune étude immunologique n'est actuellement disponible qui pourrait être corrélée à ces observations.

Enfin la microfilarémie est périodique diurne. Cette observation a été confirmée à 2 reprises par des mesures de microfilarémies toutes les 2 heures ou toutes les 4 heures sur 2 groupes de rongeurs de microfilarémies très différentes les unes des autres (fig. 7).

La microfilarémie suit une courbe sinusoïde avec un maximum diurne de 10 à 18 h et un minimum nocturne à 20 %, de 22 h à 4 h (GMT + 1). Cette périodicité n'a pas varié en 1976 et 1979, dates des dernières observations ; le vecteur est élevé avec une photopériode de 12 heures, le rongeur à la lumière du jour pour éviter actuellement toute perte de spécialisation dans ce domaine.

#### 5.2.3. AUTRES STADES

Déposées par le moustique, les larves infestantes vont immédiatement pénétrer dans les tissus et on les retrouve dès J 14 dans la cavité péritonéale, toujours au stade L 3. La 3<sup>e</sup> mue (L 3 — L 4) est observée vers J 20, 21 et la 4<sup>e</sup> mue

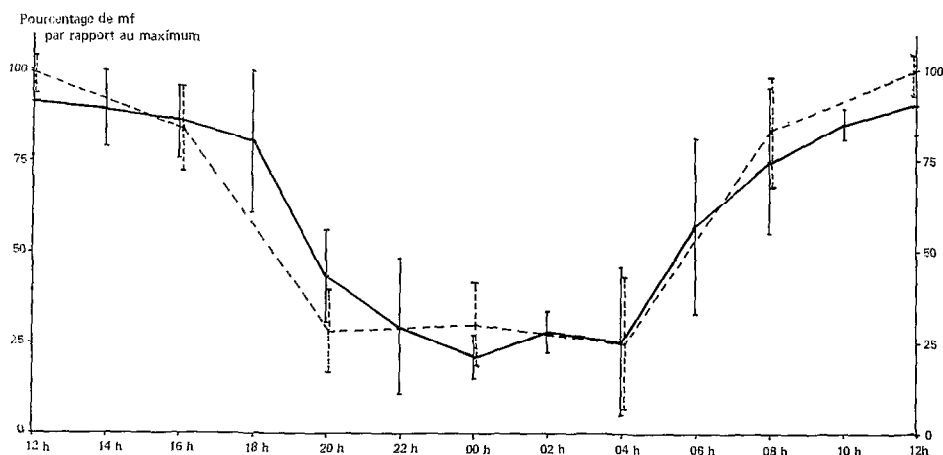


FIG. 7. — Variations de la microfilarémie sur 24 heures

— 4 *P. oris* en 1979  
 - - - 7 *P. oris* en 1976

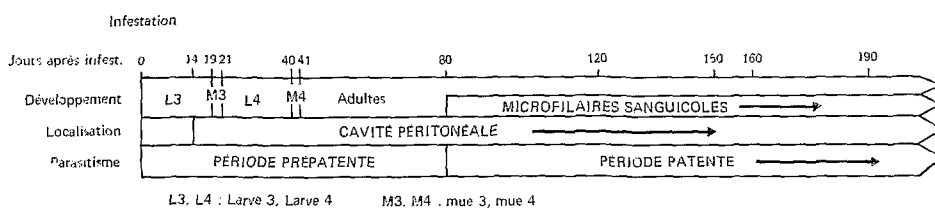


FIG. 8. — Chronologie du cycle biologique de *D. dessetae* chez *P. oris*.

(L 4 — adulte) vers J 40-41. On a donc une vingtaine de jours pour la maturation de chaque stade larvaire chez le rongeur. Les premières mf apparaissent dans le sang vers J 80 ou 90.

Le cycle biologique de *D. dessetae* chez *P. oris* est résumé sur la fig. 8, avec indication chronologique des différents stades, de leur localisation et de l'extériorisation du parasitisme. Cette succession va permettre de déterminer les dates des traitements pour l'évaluation des activités filaricides sur différents stades du cycle biologique de cette filaire : L 3, L 4, jeunes adultes, adultes mûrs, mf.

## 6. DISCUSSION

Parmi les divers modes d'infestation évalués, l'injection unique de 200 L 3 en sous-cutanée apporte une simplicité technique et l'obtention d'un modèle naturel et reproductible.

Il est en effet rare de pouvoir utiliser une filariose expérimentale qui soit restée naturelle pour maintenir l'acquis évolutif responsable de son adaptation, et qui soit suffisamment reproductible pour des études de biologie et de pharmacologie expérimentale.

La reproductibilité du parasitisme a pu être définie en termes de microfilarémie et de vers adultes. Le développement dans le temps de la microfilarémie est identique d'un groupe de rongeurs à l'autre avec une montée régulière, un plateau pendant 2 mois puis des variations plus anarchiques. A 200 jours après l'infestation, le nombre moyen d'adultes est suffisamment constant pour que l'on puisse définir une « normale » et l'utiliser en référence.

Nous disposons donc de deux éléments objectifs, nombre de filaires et microfilarémie, dont on pourra déceler des variations qui ne seront pas seulement aléatoires.

L'hôte définitif en laboratoire est donc l'hôte

TABLEAU VI

Filarioses expérimentales de rongeurs (d'après Lämmler, 1977 modifié)

Espèce	Vecteur	Rongeur	Jours après infestation		Durée prépatente moyenne	Localisation des filaire adultes
			3 <sup>e</sup> mue	4 <sup>e</sup> mue		
<i>Litomosoides carinii</i>	acarien	<i>Sigmodon hispidus</i> <i>Mastomys natalensis</i> <i>Meriones unguiculatus</i>	8 — 12	23 — 24	52 j	Cavité pleurale
<i>Dipetalonema viteae</i>	acarien	<i>Meriones unguiculatus</i> <i>Mastomys natalensis</i>	7 10—	21 — 23	56 j	Tissu sous-cutané et conjonctif
<i>Dipetalonema dessetae</i>	moustique	<i>Proechimys oris</i>	20 — 21	40 — 41	90 j	Cavité péritonéale
<i>Brugia malayi</i>	moustique	<i>Meriones unguiculatus</i> <i>Mastomys natalensis</i>	7 — 9	29 — 34	91 j	Lymphatiques

naturel ; cette notion nous est apparue importante car l'équilibre immunitaire subtil entre hôte et parasite intervient dans le mécanisme de l'activité antifilarienne de certains médicaments comme la diéthylcarbamazine (Hawking, 1979 ; Zahner *et al.*, 1978) ou la suramine sodique (Hawking, 1978) ; d'ailleurs une éventuelle substance immunostimulante dont l'activité serait sous la dépendance d'effecteurs immunitaires, aurait une forte probabilité d'être découverte avec un tel modèle plutôt qu'avec des filaires implantées chez des hôtes anormaux qui se rapprochent plus des techniques *in vitro* que de modèles parasitaires.

Enfin la sensibilité aux chimiothérapies des différents stades d'une filaire dépend de l'hôte définitif chez lequel on l'a introduite (Lämmler, 1977). Le modèle avec l'hôte naturel aura d'autant plus de valeur pour l'étude des réactions immunitaires, que le parasitisme de *P. oris* par *D. dessetae* est bien supporté, sans modifications évidentes de son comportement ni de son état général. Néanmoins des déviations métaboliques existent dont le reflet est une perturbation de la pharmacocinétique et de l'excrétion de médicaments comme la diéthyl-carbamazine, (Kani *et al.*, 1981), indiquant une pathologie réelle mais très discrète, actuellement en cours d'études.

Dans le tableau VI ont été résumées les principales données permettant de comparer *D. dessetae* aux filaires expérimentales de rongeur utilisées (Lämmler, 1977 ; Denham, 1979). La transmission par moustique est un facteur qui rapproche *D. dessetae* des filaires humaines à l'inverse de celles qui sont transmises par acarien. La durée de ses stades

TABLEAU VII

Microfilariémie moyenne entre J 120 et J 210 chez *P. oris*. On a choisi 20 rongeurs de microfilariémie élevée, et le 100 % est fixé à J 150, début du plateau horizontal

	J 120	J 150	J 180	J 210
mf	80,8 ± 28,9	124,6 ± 36,0	143,4 ± 44,0	142,9 ± 41,4
% réel	64,7 ± 12,0	100	112,7 ± 10,6	118,8 ± 16,5
% plafonné	62,5 ± 9,5	100	97,2 ± 3,6	95,4 ± 4,1

larvaires chez le rongeur est plus longue qu'avec les autres espèces, ce qui peut présenter un avantage pour l'évaluation d'une activité prophylactique sur des larves 3 ou 4, en particulier avec des substances à action prolongée, mais peut être un handicap lors d'études sur la microfilarémie. La localisation des adultes varie selon l'espèce, et, à l'exception d'un cycle artificiel par implantation avec *B. malayi* chez le mérien (Denham, 1979), *D. dessetae* est la seule à être péritonéale. Une localisation péritonéale ou pleurale est intéressante dans la mesure où les chimiothérapies diffusant rapidement dans le sang atteindront facilement les filaires dans ces tissus richement vascularisés.

*D. dessetae* a sa place parmi les filarioses expéri-

mentales de rongeur car elle apporte plusieurs éléments complémentaires favorables de par sa transmission et sa localisation anatomique. L'évaluation de sa sensibilité aux filaricides permettra de confirmer cet intérêt.

#### REMERCIEMENTS

M<sup>lle</sup> Lamy et M<sup>me</sup> Lecoustiller pour leur aide constante dans la surveillance et l'entretien du cycle de la filaire, et M<sup>lle</sup> O. Bain pour les informations et les aides fournies dans l'étude de cette filariose.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.  
le 2 novembre 1981

#### BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON (R. C.), BAIN (O.) in ANDERSON (R. C.), CHABAUD (A. G.) et WILLMOTT (S.), 1976. — Commonwealth Institute of Helminthology Keys to the Nematode parasites of Vertebrates, n° 3. Keys to genera of the order spirurida. Part 3 : Diplostriaenoidea, Aproctoidea and Filarioidea.
- BAIN (O.), 1973. — Une nouvelle Filaire de Rongeur sud-américain *Dipetalonema dessetae* n. sp. (Nematoda, Filarioidea). *Bull. Mus. Hist. nat. Paris*, 3<sup>e</sup> 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.
- BAIN (O.) et CHABAUD (A. G.), 1975. — Le mécanisme assurant la régularisation de la traversée de la paroi stomacale du vecteur par les microfilaries (*Dipetalonema dessetae* — *Aedes aegypti*). *C.R. Acad. Sci., Paris*, D 281 : 1199-1202.
- CHABAUD (A. G.) et BAIN (O.), 1976. — La lignée *Dipetalonema*. Nouvel essai de classification. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 51, 3 : 365-397.
- DENHAM (D. A.), 1979. — A review of methods for testing compounds for filaricidal activity. *J. Helminth.*, 53, 2 : 175-187.
- GANTIER (J.-C.) et GAYRAL (Ph.), 1979. — Élevage et constantes biologiques d'un nouveau rongeur de laboratoire : *Prochimys oris*, Thomas 1904. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 4 : 4 : 233-244.
- GAYRAL (Ph.) et POMMIES (M.), 1976. — Résultats préliminaires sur l'utilisation d'une nouvelle filaire de rongeur *Dipetalonema dessetae* (Bain 1973) dans l'évaluation des antifilariens. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 283 D : 861-864.
- GAYRAL (Ph.), PFAFF (M. C.), MAHUIZIER (G.), PRADEAU (F.) et LECOUSTILLIER (M.), 1978. — Action de la DEC sur les microfilaries de *Dipetalonema dessetae* chez son hôte définitif. *Ann. Parasit. hum. comp.* 53, 6 : 669-675.
- GAYRAL (Ph.), DREYFUSS (G.), GANTIER (J.-C.), 1982. — *Dipetalonema dessetae* chez *Prochimys oris*. II Validation du modèle pour l'évaluation pharmacologique des antifilariens. *J. Pharmacol.* (sous presse).
- GERBERG (E. J.), 1970. — Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Am. Mosquito Control Assn. Inc. Bull.* n° 5.
- HAWKING (F.), 1978. — Suramin : with special reference to onchocerciasis. *Adv. in Pharm. and Chem.*, 15 : 289-322.
- HAWKING (F.), 1979. — Diethylcarbamazine and new compounds for the treatment of filariasis. *Adv. in Pharm. and Chem.* 16 : 129-194.
- HAZARD (E. I.), 1967. — Modification of the ice water method for harvesting *Anopheles* and *Culex* pupae. *Mosq. News*, 27 : 115-116.
- KANI (F.), GAYRAL (Ph.), JACQUOT (C.), PFAFF (M. C.) et MAHUIZIER (G.), 1981. — Experimental filariasis of *Dipetalonema dessetae* in *Prochimys oris*. III — Incidence of the parasitism on the pharmacokinetics of diethylcarbamazine (DEC). *Eur. J. Drug. Metabolism Pharmacokinetics.* (à paraître).
- LAMMLER (G.), 1977. — Experimental chemotherapy and chemoprophylaxis of filariasis. *Pestic. Sci.*, 8 : 563-576.
- PETIT (G.), 1978. — La filaire *Dipetalonema dessetae* : phénomène de régulation et rendement parasitaire chez l'*Aedes* vecteur. Thèse de doctorat de 3<sup>e</sup> cycle (sciences).
- PETIT (G.), BAIN (O.) et SPITALIER-KAVEH (H.), 1977. — Facteurs favorables à la transmission de la filaire de laboratoire *Dipetalonema dessetae*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 52, 5 : 585-586.
- SMITH (L. N.), 1966. — Insect colonization and mass production. Academic Press New York and London.
- WEATHERSBY (A. B.), 1963. — Harvesting mosquito pupae with cold water. *Mosq. News*, 23 : 249-251.
- WHARTON (R. H.), 1957. — Studies on filariasis in Malaya, notes on the breeding of *Mansonia (Mansonioides)* mosquitoes in the laboratory. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 51 : 297-300.
- World Health Organization Scientific Working Group on Filariasis, 1979. — Report of the 3<sup>rd</sup> meeting of the SWG on filariasis : filaricide screening. *TDR/FIL — SWG (3)* 79.3. 38 pp. Geneva 5-7 Feb.
- ZARNER (H.), SOULSBY (E. J. L.), WEIDNER (E.) et LAMMLER (G.), 1978. — Effect of DEC on the microfilariae of *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis* : dynamics of cell adhesion, immobilization and elimination of microfilariae. *Tropenmed. Parasit.*, 29, 1 : 15-26.