ÉTUDE DE L'EFFET PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL DES SPIROPLASMES ISOLÉS A PARTIR DE MOUSTIQUES SUR L'ÉCLOSION D'ŒUFS D'*Aedes Aegypti* ET LE DEVENIR DES LARVES ISSUES DE CES ŒUFS

A. M. SIMITZIS-LE FLOHIC*, B. DEVAU**, Y. PRIGENT*, R. GRUFFAZ**,
F. LE GOFF****, B. GILOT***, C. CHASTEL****

RÉSUMÉ. Nous avons soumis des œufs d'*Aedes aegypti* à l'action de différentes souches de spiroplasma isolées de moustiques, tant en Savoie française qu'à Taïwan. Seule la souche de spiroplasma SP7, originaire d'*Armigeres subalbatus* de Taïwan, témoigne d'un réel effet pathogène sur l'évolution des larves issues des œufs d'*Ae. aegypti*, sans altération apparente du sex-ratio, ni transmission du pouvoir infectieux aux imago issues des lots exposés. Les auteurs, après avoir présenté les différents résultats obtenus, évoquent les difficultés, notamment culturelles liées à l'emploi des spiroplasmes.

Mots-clés : Moustiques. *Aedes aegypti*. Œufs. Spiroplasmes.

Survey of the experimental pathogenic effect of *Spiroplasmas* sp. isolated from mosquitoes on the hatching of *Aedes aegypti* ova and their larval evolution.

SUMMARY. The authors did study the experimental effects on *Aedes aegypti* ova of different *Spiroplasma* strains, isolated from mosquitoes in french Savoie and in Taiwan. The SP7 strain, from *Armigeres subalbatus* (Taiwan), demonstrates a true pathogenic effect on the larval evolution, without sex-ratio modifications, nor bacterial transmission to the adult mosquitoes. The authors present their results and emphasize the difficult use of *Spiroplasmas* sp.

Key-words : Mosquitoes. *Aedes aegypti*. Ova. *Spiroplasmas*.

Introduction

Les spiroplasmes, bactéries spiralées appartenant à la classe des Mollicutes, apparaissent très largement liés aux arthropodes terrestres, que ce soit comme contaminants, commensaux ou pathogènes (2).

* Unité de Parasitologie-Mycologie et **** Unité de Bactériologie-Virologie du Laboratoire de Microbiologie et Santé Publique (Pr C. Chastel), Faculté de Médecine, 22, avenue Camille-Desmoulins, B. P. 824, F 29285 Brest Cedex.

** Entente Interdépartementale pour la Démoustication, B. P. 2, F 73310 Chindrieux.

*** Adresse actuelle : Laboratoire de Parasitologie (Pr M. Quilici), 27, boulevard Jean-Moulin, F 13385 Marseille Cedex 5.

Accepté le 9 novembre 1987.

Ce pouvoir pathogène potentiel apparaît intéressant dans l'éventualité de leur utilisation en lutte antivectorielle intégrée, et ce d'autant plus que plusieurs spiroplasmes ont été isolés de moustiques (1, 4, 5, 6) et que nombre de moustiques sont des vecteurs d'endémies graves, actuellement en pleine ré-extension, comme la dengue et la fièvre jaune transmises par *Aedes aegypti*, ou encore la fièvre à virus Chikungunya. Il nous a donc paru intéressant de vérifier l'effet pathogène expérimental de différentes souches de spiroplasmes isolées de moustiques sur l'éclosion et le devenir d'œufs d'*Aedes aegypti* originaires de Bora Bora.

Matériel et méthodes

1 — « Aedes aegypti »

La souche d'*Aedes aegypti* utilisée pour cette étude nous a été aimablement fournie par le Centre ORSTOM de Bondy (Drs Coz et Mouchet). Elle est entretenue selon la méthode classique en cage de Roubaud avec de l'eau sucrée à 30 % et, pour les femelles la possibilité de se gorger sur un cobaye 8 heures par jour et 5 jours sur 7. Les femelles gravides déposent leurs pontes sur du papier buvard à demi immergé dans un cristallisateur d'eau pure. Les pontes sont relevées chaque semaine et conservées à l'abri de la lumière et de la chaleur dans une enveloppe. Elles sont conservées au maximum 2 mois.

2 — LES SPIROPLASMES

Nous avons utilisé les 5 souches suivantes :

— AR 1343 (*Spiroplasma sabaudiense*), originaire de Savoie française (*Aedes sticticus* et *Aedes vexans*) ;

— AR 1357 (*Spiroplasma cantharicola*) également isolée en Savoie française ;

— SP 2 et CT 1, toutes deux appartenant à l'espèce *Spiroplasma taiwanense* et isolées respectivement à partir d'*Anopheles sinensis* et *Culex tritaeniorhynchus* de Taïwan par Rosen ;

— SP 7, également isolée à Taïwan par Rosen, cette fois-ci à partir d'*Armigeres subalbatus*.

Toutes ces souches sont entretenues en milieu SP 4 selon la technique d'ensemencement par dilutions d'ordre 10, avec incubation à 30° C ou 37° C selon la température optimale de pousse.

3 — EXPÉRIMENTATION SUR LES ŒUFS D' « Aedes aegypti »

Nous verrons successivement : la préparation des spiroplasmes, la préparation des œufs d'*Aedes* et enfin la mise en œuvre du pouvoir pathogène expérimental des spiroplasmes sur les œufs.

a — LES SPIROPLASMES

Pour l'expérimentation, chaque souche de spiroplasma est repiquée en milieu SP 4 et en gamme de dilutions d'ordre 10 (10^{-1} à 10^{-6}), puis incubée à sa température optimale de croissance (30°C , sauf pour SP 7 : 37°C).

La dilution choisie pour la contamination des œufs d'*Aedes* est la dilution optimale, c'est-à-dire celle pour laquelle la morphologie du spiroplasma est parfaite. Cette dilution est le plus souvent la dilution 10^{-3} , très rarement la dilution 10^{-4} (exclusivement pour la souche SP 7). A partir de cette dilution optimale, la souche est fractionnée en deux aliquots : — le premier est dilué de 10 en 10 en milieu SP 4 frais donnant ainsi une nouvelle gamme de dilutions codées 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} à partir de la dilution de départ codée 10^{-x} ; — le second est centrifugé, et le culot de spiroplasma est repris en glucose à 30 % stérile, selon la même gamme de dilution d'ordre 10, codées G 10^{-1} , G 10^{-2} et G 10^{-3} . Pour chaque souche de spiroplasma, et chaque expérimentation, ce sont donc 7 lots d'œufs d'*Aedes aegypti* qui seront testés face à des dilutions croissantes de la souche en milieu SP 4 et en glucose à 30 %.

Les lots témoins seront : un lot témoin négatif (T⁻); un lot témoin SP 4 (T SP 4) et un lot témoin glucose à 30 % (T G).

b — LES ŒUFS D'« AEADES »

Les bandes de papier buvard portant les œufs d'*Aedes* sont fractionnées en bandelettes portant, après comptage à la loupe, une moyenne de 200 œufs.

c — MISE EN EXPÉRIEMENTATION

Les bandelettes destinées à tester l'effet des spiroplasmes sont incubées en boîte de Pétri, en présence de chacune des dilutions de la souche de spiroplasmes, pendant 1 heure à la température de 30°C . A la fin de cette incubation, les bandelettes sont retirées de la boîte de Pétri et mises à éclore, à 25°C , dans un cristalliseur rempli d'eau pure jusqu'à la moitié de la hauteur de la bandelette de papier. Les lots témoins T SP 4 et T G sont traités de la même façon, tandis que le lot T⁻ est mis d'emblée à éclore à 25°C .

Après 4 jours à 25°C , les bandelettes de papier de la totalité des lots, témoins et expérimentaux, sont retirées des cristalliseurs, ceci pour éviter que les éclosions plus tardives, qui sont constantes, ne rendent difficile le suivi des évolutions larvaires de la première éclosion. Pour tous les lots, la nourriture des larves est assurée par de la poudre d'aliments pour souris finement broyée. Un examen est effectué chaque jour, ce qui permet de vérifier l'éclosion larvaire et l'évolution des larves : intensité des éclosions, rythmes des mues, nymphes et répartition par sexe des imagos sont notés.

Lorsque le stade nymphal est atteint, les nymphes sont isolées des larves restantes et après éclosion imaginale, les imagos sont triés par sexe. Les unes sont conservées à -40°C , avant de servir à des subcultures en milieu SP 4 destinées à vérifier le passage éventuel de la souche de spiroplasma ayant servi à la contamination. Les autres servant à la réalisation du cycle suivant et à cette

occasion sont notés l'intensité de la ponte des femelles et le sex-ratio de la génération suivante.

Résultats

Dans un premier temps, nous verrons les résultats globaux obtenus et dans un second temps nous tenterons une analyse de ces résultats.

L'ensemble de nos résultats est rassemblé sur les *tableaux I et II*.

1 — RÉSULTATS GLOBAUX (*tableau I*)

a — LOTS TÉMOINS

Nous avons mis en culture au total plus de 28 000 œufs d'*Aedes aegypti*, dont — 8 511 pour les lots T⁻, — 1 753 pour les lots T SP 4 et — 1 680 pour les lots T G. Le pourcentage d'éclosion imaginale respectif de ces lots témoins est de 4,7 %, 4,5 % et 2,4 %. Il n'existe pas de différence significative (χ^2 de Yates) entre les pourcentages des lots T⁻ et T SP 4. Par contre, il apparaît une différence fortement significative entre le lot T G et les deux premiers pris séparément. Il apparaît ainsi d'emblée un effet inhibiteur du glucose 30 % sur l'éclosion des œufs, confirmé par le χ^2 de Yates.

b — SOUCHES FRANÇAISES DE SPIROPLASME

AR 1343 et AR 1357 ont été testés en SP 4 et en glucose 30 %. Seuls les résultats de la dilution optimale de pousse (10^{-3}) ont été pris en compte.

Pour la souche AR 1343, sur 2 355 œufs en milieu SP 4, le pourcentage d'éclosion imaginale est de 5,09 %, contre 2,41 % sur 1 742 œufs en glucose 30 %. Pour AR 1357, ce pourcentage est respectivement de : 5,9 % en milieu SP 4 (2 527 œufs) et de 2,73 % en glucose 30 % (2 013 œufs). Dans l'un et l'autre cas, nous obtenons donc des chiffres tout à fait comparables aux chiffres des lots témoins correspondants, ce que le χ^2 de Yates confirme.

c — SOUCHES DE SPIROPLASME DU SUD-EST ASIATIQUE

Pour la souche SP 2, le pourcentage d'éclosion est en milieu SP 4 de 3,4 % (2 382 œufs) et en glucose de 2,5 % (2 390 œufs). Ces pourcentages sont, pour la souche CT 1, respectivement de 3,2 % (1 620 œufs) et de 6,5 % (600 œufs), tandis que les chiffres obtenus tombent à 0,13 % (750 œufs) et 0,16 % (600 œufs) pour la souche SP 7. Ainsi, si pour la souche SP 2 le χ^2 de Yates confirme l'absence de différence significative quel que soit le milieu utilisé, dans le cas de la souche CT 1, seul le milieu glucosé 30 % donne des résultats différents, paradoxalement supérieurs aux résultats attendus.

Quant à la souche SP 7, c'est la seule souche qui témoigne d'un effet négatif réel sur l'éclosion imaginale des œufs d'*Aedes aegypti* soumis à son action à sa dilution optimale (10^{-4}).

TABLEAU I. — Effet des spiroplasmes sur l'éclosion imaginale des œufs d'*Aedes aegypti* pendant les 20 premiers jours après mise en eau.

Lots	Nombre d'œufs	Nombre d'imagos	% éclosion d'imagos
T-	8 511	408	4,7
T SP4	1 753	79	4,5
T G	1 680	40	2,4
AR 1343			
En milieu SP4	2 355	120	5,09
En glucose 30 %	1 742	42	2,41
AR 1357			
En milieu SP4	2 527	150	5,9
En glucose 30 %	2 013	55	2,73
SP 7			
En milieu SP 4	750	1	0,13
En glucose 30 %	600	1	0,16
CT 1			
En milieu SP 4	1 620	52	3,2
En glucose 30 %	600	39	6,5
SP 2			
En milieu SP 4	2 382	82	3,4
En glucose 30 %	2 390	62	2,5

2 — ANALYSE DES RÉSULTATS

a — RÉSULTATS DE L'ÉCLOSION IMAGINALE

Il apparaît donc que des 5 souches de spiroplasmes testées, seule la souche SP 7, isolée à partir d'*Armigeres subalbatus* de Taïwan, témoigne d'un réel effet négatif sur l'éclosion imaginale des œufs d'*Aedes aegypti* soumis à son action, que ce soit en milieu SP 4 ou en glucose à 30 %. Cette action se marque par une mort prématurée et massive des larves au moment de la mue larvaire L1-L2, et non pas au moment de la première éclosion larvaire.

Il est à noter que pour toutes les éclosions tardives (c'est-à-dire pour les éclosions survenant après plus de 4 jours d'incubation à 25° C), il n'apparaît aucune modification qualitative ni quantitative des larves des lots exposés par rapport aux larves des lots témoins. Il semblerait donc que l'action de la souche SP 7 soit une action directe et immédiate.

Un cas apparemment paradoxal existe : celui des œufs d'*Aedes* soumis à l'action de la souche CT 1 en glucose à 30 % et pour laquelle le pourcentage d'éclosion imaginale est significativement supérieur à celui des lots témoins correspondants. Cette différence qui ne s'explique pas actuellement nécessite de nouveaux essais.

b — SEX-RATIO DES IMAGOS ISSUS DES EXPÉRIMENTATIONS (tableau II)

Nous avons contrôlé le sex-ratio pour un certain nombre d'imagos issus de différents lots d'œufs d'*Aedes aegypti*. Ces résultats sont rassemblés sur le tableau II.

Dans les lots témoins, le sex-ratio oscille entre 50/50 pour les lots T- et 66/44 en faveur des mâles pour les lots T G. Pour les différents lots soumis à l'action des spiroplasmes, le sex-ratio offre des chiffres tout à fait comparables puisque oscillant de 48 mâles/52 femelles AR 1357 en milieu SP 4 à 66 mâles/44 femelles pour SP7 en glucose 30 %.

Il semble donc que quelle que soit la souche de spiroplasma testée, y compris pour la souche SP 7, il n'apparaisse pas de modification notable du rapport du nombre des adultes mâles et femelles d'*Aedes aegypti* issus des œufs exposés.

Cette remarque appelle quand même la plus grande réserve, la souche SP 7, la seule à témoigner d'une réelle action sur l'éclosion imaginale, n'ayant permis l'éclosion que de quelques adultes, en nombre très insuffisant pour conclure.

TABLEAU II. — Sex-ratio des imagos issus d'œufs d'*Aedes aegypti*, non exposés et exposés à l'action potentielle de 5 souches différentes de spiroplasmes.

Souche	Nombre d'œufs	Nombre d'imagos	Imagos mâles	Sex-ratio
T-	600	24	12	50
TSP 4	800	43	26	60
TG	800	39	26	66,6
AR 1343				
En milieu SP 4	800	54	33	59
En glucose 30 %	800	27	15	55
AR 1357				
En milieu SP 4	800	29	14	48,3
En glucose 30 %	600	12	7	58
SP 7				
En milieu SP 4	800	9	5	55
En glucose 30 %	600	8	5	62
SP 2				
En milieu SP 4	800	35	20	57
En glucose 30 %	600	10	6	60
CT 1				
En milieu SP 4	800	8	4	50
En glucose 30 %	600	9	5	55

c — INFECTIOSITÉ DES IMAGOS ISSUS DES LOTS EXPOSÉS

Dans tous les cas où nous avons effectué un contrôle de l'infectiosité éventuelle des imagos issus des lots exposés (90 imagos pour AR 1457 en milieu SP 4, 41 pour

AR 1357 en glucose 30 %, 1 pour SP 7 en glucose 30 % et 1 pour SP 7 en milieu SP 4), nous n'avons jamais obtenu de subculture positive, que ce soit par lavage externe des imagos ou par broyage. Là encore, toutefois, le cas de la souche SP 7 ne peut être tranché avec certitude eu égard à l'effet négatif de cette souche sur l'éclosion imaginale.

Discussion et commentaires

Plusieurs points appellent des commentaires et suscitent la discussion.

1 — POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL DES SPIROPLASMES

Nous avons testé 5 souches de spiroplasmes : deux originaires de Savoie française, et trois du Sud-Est asiatique. Une seule paraît pouvoir être utilisée pour limiter l'éclosion des œufs d'*Aedes aegypti* : la souche SP 7, originaire de Taïwan. Cette souche SP 7 entraîne une mortalité accrue des larves au stade de la transformation larvaire L1-L2.

Mais, ni pour cette souche, ni pour les suivantes, nous n'avons — noté de modification du sex-ratio des imagos résultants, — ni réussi à obtenir une subculture de la souche de spiroplasma, que ce soit par lavage ou par broyage.

Ces résultats incitent à penser que les spiroplasmes utilisés ne peuvent exercer au mieux qu'une action immédiate et, d'autre part, ne peuvent se développer dans les tissus des larves de moustiques.

Ils méritent confirmation, mais n'apparaissent toutefois pas négatifs pour plusieurs raisons.

Ainsi, le nombre de spiroplasmes isolés à partir de moustiques ne cesse de s'accroître (1, 4, 5, 6). D'autre part, peu d'éléments concernant l'écologie de ces spiroplasmes sont actuellement connus et enfin, leurs localisations tissulaires dans les moustiques dont ils sont issus sont dans leur grande majorité encore inconnues (2).

2 — SEX-RATIO

Nous n'avons pas démontré d'effet sur le sex-ratio des imagos issus de notre série d'expérimentation avec nos cinq souches de spiroplasmes.

Bien que nos résultats, notamment en ce qui concerne la souche SP 7, appellent confirmation, il est intéressant de souligner que des résultats négatifs sur le sex-ratio ont été également obtenus par Fitz-Earle *et al.* (3) en utilisant le spiroplasma SR de *Drosophila* sur les moustiques *Toxorhynchites splendens*, alors même que l'on sait l'action de ce spiroplasma sur le sex-ratio de son hôte habituel.

Il pourrait s'agir dans ce cas d'une caractéristique propre aux différents moustiques.

3 — DIFFICULTÉS D'UTILISATION DES SPIROPLASMES

Quels que soient les résultats obtenus, l'utilisation des spiroplasmes se heurte à des difficultés majeures et non encore résolues.

a — ABSENCE DE NUMÉRATION RÉELLE

La première difficulté d'utilisation des spiroplasmes tient au fait qu'il n'est pas procédé à une numération réelle du nombre de spiroplasmes utilisés mais uniquement une évaluation de la dilution de la concentration de départ capable de redonner une culture abondante, présentant une morphologie parfaite.

De ce fait, à une dilution donnée peut correspondre, pour une souche déterminée, une pousse variable, de morphologie variable, en un temps variable, la dilution optimale correspondant, pour une température déterminée, à la dernière dilution pour laquelle la morphologie de la souche est parfaite.

b — PERTE DE LA MORPHOLOGIE PARFAITE

La deuxième difficulté d'emploi de spiroplasmes tient au fait qu'une souche, de morphologie parfaite au départ, perd rapidement cette morphologie, même lorsqu'elle est conservée sous forme d'aliquots congelés ou lyophilisés.

Or, l'expérience montre que seule la morphologie parfaite permet, tant pour les œufs d'*Aedes aegypti*, que pour les larves, nymphes, ou imagos, de mettre en évidence un éventuel pouvoir pathogène de cette souche.

De ce fait, il apparaît impossible de réaliser la totalité des expérimentations avec le même stock de culture, le maintien de ce stock pouvant entraîner à la longue des modifications des capacités pathogènes potentielles de la souche par suite d'une dérive antigénique ou autre.

c — COMPLEXITÉ DU MILIEU DE CULTURE

Les spiroplasmes requièrent comme milieu de culture des milieux particulièrement riches en substances protéiques, sérum de veau fœtal, compléments vitaminiques, etc. L'ensemble de ces besoins explique que, même pour un milieu, relativement simple comme le SP 4, le coût de fabrication apparaisse rapidement élevé et limitant dans le cas d'une utilisation vraiment massive.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats apparaît donc nécessiter une poursuite de ces expérimentations sur les *Aedes aegypti*, à tous les stades, en faisant appel aux nombreuses et différentes souches de spiroplasmes déjà isolées à partir de moustiques.

Dans l'éventualité où la souche SP 7, ou une autre souche, apparaîtrait douée d'un pouvoir pathogène complet sur l'un ou l'autre des stades évolutifs des *Aedes*, la mise au point d'un milieu de culture bon marché et d'une méthode de quantification s'imposerait.

REMERCIEMENTS. — Ce travail a bénéficié de l'aide financière de l'I. N. S. E. R. M. (C. R. E. 85.80.08) et de la D. R. E. T., Paris (Convention 86/067), ainsi que de la Fondation Langlois de Rennes.

BIBLIOGRAPHIE

1. CHASTEL C., GILLOT B., LE GOFF F., GRUFFAZ R., ABALAIN-COLLOC M. L. : Isolement de spiroplasmes en France (Savoie, Alpes du Nord) à partir de moustiques du genre *Aedes*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1985, 300, 261-266.
 2. CLARK T. B. : Diversity of *Spiroplasma* host-parasite relationships. *Isr. J. Med. Sci.*, 1984, 20, 995-997.
 3. FITZ-EARLE M., SAKAGUCHI B., HORIO M., TSUKAMOTO M. : Transfer of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) sex-ratio spiroplasmas into *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae): Evidence for transovarial transmission but absence of sex-ratio distortion. *J. Med. Entomol.*, 1987, 24, 448-457.
 4. SHAIKH A. A., JOHNSON W. E., STEVENS C., TANG A. Y. : The isolation of spiroplasmas from mosquitoes in Macon County, Alabama. *J. Am. Mosquito Control Assoc.*, 1987, 3, 289-295.
 5. SLAFF M., CHEN T. A. : The isolation of a spiroplasma from *Aedes sollicitans* (Walker) in New Jersey. *J. Flor. Anti-mosquito Assoc.*, 1982, 00, 19-21.
 6. ROSEN L. : Mollicutes from mosquito species in South East Asia. *6th Intern. Cong. of I. O. M.*, Birmingham, 1986, Aug. 26-31, 79, 96.
-