

**CHIROPTÈRES ET ARBOVIRUS A MADAGASCAR
(ISOLEMENT DE SOUCHES DE VIRUS DAKAR-BAT
ÉTUDE SÉROLOGIQUE
DE CHAUVES-SOURIS FRUGIVORES)**

par

P. COULANGES (1), Y. ROBIN (2), G. LE GONIDEC (2), A. MAYOUX (1),
R. BORDAHANDY (1)*

On connaît au moins neuf arbovirus distincts qui ont été isolés des seules chauves-souris. Cinq d'entre eux appartiennent au groupe B. Par ailleurs un certain nombre d'arbovirus pathogènes pour l'homme pour la plupart, ont été retrouvés chez divers chiroptères.

A Madagascar les études sur les arbovirus sont, à ce jour, peu avancées puisqu'elles se limitent à une enquête sérologique réalisée sur 900 sérums humains par P. SUREAU (9), en 1964.

Malgré les difficultés nombreuses, matérielles pour la plupart, que rencontrait l'étude des arbovirus dans la Grande Ile, nous avons tenté, dès 1968, des isolements systématiques à partir des animaux dont nous pouvions disposer le plus facilement, les chauves-souris. A l'occasion de ces tentatives nous avons pu mettre en évidence le rôle important que jouent les chiroptères comme réservoirs d'entéro-bactéries et, plus particulièrement, nous avons pu démontrer que *Pteropus rufus* Geoffroy (5) est un des très rares hôtes animaux connus de *Salmonella typhi*. La poursuite de ces études nous a permis de disposer d'une certaine quantité de matériel provenant de micro ou de macro-chiroptères.

* Médecins du Service de Santé des Armées.

(1) Institut Pasteur de Madagascar.

(2) Institut Pasteur de Dakar.

Nous allons rapporter ici :

— l'isolement de deux souches de virus Dakar-bat chez des microchiroptères ;

— les résultats d'études sérologiques et virologiques menées chez la chauve-souris frugivore *Pteropus rufus* Geoffroy.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — Isolement

Les isollements ont été tentés à partir de pools de broyats de cerveaux, de glandes salivaires de chauves-souris, inoculés à des portées de souris de 1 jour (souche locale) suivant les techniques habituelles (dilution au 1/10 du broyat en tampon phosphate-sérum, voies IC, IP, SC).

Pour pallier l'insuffisance de notre élevage de souris, des tentatives d'isolement ont également été réalisées, à partir des mêmes mélanges, sur des cellules de lignée continue (BHK 21-C13 et HeLa).

II. — Sérologie

Elle a été effectuée sur 101 sérums de chauves-souris frugivores *Pteropus rufus*, prélevés à Madagascar et expédiés, non lyophilisés, à l'Institut Pasteur de Dakar où l'étude en inhibition de l'hémagglutination a été menée suivant les techniques habituelles.

RÉSULTATS

I. — Des isollements ;

— sur cultures cellulaires :

En 1971, 6 lots de cerveaux et de glandes salivaires de microchiroptères ont servi, sans succès à des tentatives d'isolement sur cellules de lignée continue HeLa.

En 1974, nous avons passé sur cellules BHK. 21. C: 13, 9 lots de 3 cerveaux et 9 lots de 3 glandes salivaires de *Pteropus rufus*, 1 lot de 4 cerveaux de *Miniopterus sp.* + 5 cerveaux de *Mormopterus sp.*, 1 lot de glandes salivaires des mêmes espèces, 1 lot constitué par un cerveau et les glandes salivaires de *Chaerephon limbatus*, 4 lots formés des cerveaux et des glandes salivaires de

4 *Miniopterus sp.* Les cellules ont été observées pendant quinze jours pour la mise en évidence d'un effet cytopathogène, un passage aveugle a été effectué suivi d'un même délai d'observation.

Toutes ces tentatives ont été infructueuses, tant sur cellules HeLa que cellules BHK 21.

— des inoculations à l'animal :

Deux souches de virus furent isolées par deux d'entre nous à partir de glandes salivaires de Microchiroptères non déterminés de la région d'Anjiro. La première souche fut obtenue en novembre 1967 ; la deuxième en 1972 avec les résultats suivants :

● inoculation des cerveaux :

— sur cellules HeLa : négative après deux passages ;

— aux souriceaux : négative au vingtième jour d'observation ;

● inoculation des glandes salivaires :

— sur cellules HeLa : négative après deux passages ;

— sur cellules KB et sur fibroblastes d'embryons de poulets : négative ;

— aux souriceaux : apparition d'une paralysie aux 11^e, 12^e jour.

Le 12^e jour les cerveaux et les carcasses des souriceaux malades ont été prélevés. A partir des carcasses il a été effectué un examen anatomo-pathologique qui a montré l'absence de lésions caractérisées. Il en fut de même après un deuxième passage qui s'est accompagné de paralysies survenues au 9^e jour.

Les cerveaux des souriceaux paralysés au 12^e jour ont été passés à de nouvelles portées. Les animaux présentèrent des paralysies au 5^e jour, suivies de mort le 6^e jour. L'examen anatomo-pathologique des carcasses montrait l'absence de lésions ; le passage des cerveaux confirmait la survenue des paralysies au 5^e jour.

Les souris adultes inoculées alors survécurent (les souris de 21 jours, inoculées avec le virus Dakar-bat, voie IC, par P. BRES et J. CHAMBON (1), mouraient 4 fois sur 6).

Les cerveaux des souriceaux correspondant aux deux souches (371 et 374) furent alors broyés à froid dans du tampon phosphate

Entebbe additionné de 50 pour cent de sérum de lapin et d'antibiotiques, puis dilués au demi dans de l'eau distillée avant d'être lyophilisés sous un volume de 2 millilitres par flacon.

Après lyophilisation le pouvoir pathogène contrôlé chez les souris montrait la survenue de paralysies vers le 6-7^e jour et de la mort vers le 8^e jour.

En mai 1974 les cerveaux lyophilisés étaient expédiés à l'Institut Pasteur de Dakar qui confirmait l'absence de pouvoir pathogène pour la souris adulte (voie IP, 0,10 ml) et trouvait chez les souris de deux jours, inoculés par voie IC (0,02 ml) et malades en 6 jours, une DL 50 de 7.5.

A partir d'un antigène en saccharose-acétone on mettait en évidence l'existence, à 28° C, d'une hémagglutinine, particulièrement active à pH 6,2.

L'étude des réactions croisées donnait les résultats suivants :

Fixation du complément :

Ascites	Antigènes		
	M. 371	M. 374	Dakar-Bat
M.371 74-1130	1024/32	—	256/8
M.374. 74-1131.....	—	1024/32	256/8
Dakar-Bat 67-3111.....	32/32	32/32	32/8
Neutralisation			
SLN (log titre)	7,5	7,5	7,5
M.374. 74.1130.....	5,9 (*)	—	5,0
M.374. 74-1131.....	—	6,0	5,0
Dakar-Bat 64-0353-12	3,9	3,6	3,9

Les deux souches étaient donc identiques au virus Dakar-Bat.

A Madagascar nous avons pu adapter le virus Dakar-Bat, souche 371, aux cellules BKH.21.C.13, sur lesquelles il donne un effet cytopathogène avec destruction totale du tapis cellulaire en 3-4 jours. L'adaptation s'est révélée possible à partir du 5^e passage. A partir du 8^e passage, il a été possible de passer avec succès sur cellules HeLa, sur lesquelles l'effet cytopathogène avec destruction complète du tapis se fait dans des délais de l'ordre de 3 jours. L'observation au faible grossissement de l'atteinte du tapis cellulaire montre que sur cellules BHK 21 l'atteinte du tapis

(*) log indice de neutralisation.

cellulaire commence par l'apparition d'îlots de cellules réfringentes, rétractées. Le centre de ces îlots se nécrose et le tapis cellulaire finit par être complètement détruit avec persistance de quelques cellules normales. Après coloration à l'hématéine-éosine on met en évidence de nombreuses cellules avec noyaux caryopycnotiques ou en caryorrhexis, avec une inclusion éosinophile cytoplasmique. Ces aspects ont été trouvés aux 2^e et 7^e passage.

KARABATSOS et BUCKLEY (4) avaient observé, dès 1967, un effet cytopathogène identique sur cellules BHK 21, avec le virus Darak-Bat et avec d'autres virus propres aux chiroptères.

Nous avons, depuis ces résultats, tenté d'autres isollements à partir des chauves-souris.

Nous avons inoculé aux souriceaux 7 lots de 3 cerveaux et 6 lots de 3 glandes salivaires de *Pteropus rufus* : 1 cerveau et une glande salivaire de *Chaerephon limbatus*, microchiroptère en provenance de Périnet. Cette étude se poursuit mais, pour le moment, il n'a pas été isolé de nouvelle souche.

2. — De la sérologie :

Cette étude a été faite sur 101 sérums de chauves-souris frugivores *Pteropus rufus* provenant de la région d'Anjiro-Marovitsika. 96 de ces sérums ont pu être utilisés en inhibition de l'hémagglutination avec les antigènes suivants : Groupe A : Chikungunya et Sindbis ; Groupe B : Fièvre jaune, Uganda S. Dakar-Bat, West-Nile, Bukalasa-Bat, Ntaya, Wesselsbron ; Groupe Bunyamwera : Bunyamwera.

Pour les 96 sérums étudiés, 27 ont montré une sérologie positive (28 p. 100). Le tableau I présente l'ensemble de ces résultats.

DISCUSSION

1. — De l'isolement :

L'état actuel des isollements d'arbovirus, ou virus proches, isolés des seules chauves-souris, est résumé dans le tableau II ; le tableau III présente l'état actuel des isollements d'arbovirus retrouvés chez les chiroptères.

TABLEAU I

*Sérums de Pteropus rufus positifs, en inhibition
de l'hémagglutination*

No	SERUM	CHIK	SIND	FJ	UGS	DB	W.N	ZIKA	BB	NTA	WSL	BUN
1	40	-	-	-	-	-	10*	-	-	-	-	-
2	41	-	20	10	-	10	20	-	10	-	10	-
3	43	-	10	10	± 10	-	10/20	10	-	10	10	-
4	48	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
5	54	-	± 10	-	-	-	± 10	-	-	-	-	-
6	60	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
7	64	-	-	10	-	-	± 10	-	-	± 10	-	-
8	68	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	77	-	± 10	-	-	-	10	-	-	-	-	-
10	88	-	-	-	-	± 10	-	-	-	10	10	-
11	89	10	-	10	10	10/20	40	10	-	10/20	20	± 10
12	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
13	94	-	20	-	-	-	-	-	-	-	10	-
14	98	-	20	-	-	-	10	-	-	-	10	-
15	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-
16	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
17	103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
18	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
19	106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-
20	107	10/20	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	108	-	-	-	-	-	10	-	-	-	10	-
22	119	-	-	-	-	-	10	-	-	-	10	-
23	120	-	10/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	121	-	10/20	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-
25	130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-
26	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-
27	133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 10	-

(*) Résultats exprimés en inverses des dilutions des sérums inhibant complètement l'hémagglutination en présence de 4-8 unités d'antigène.

TABLEAU II

Virus isolés des seuls chiroptères

— Groupe ● Virus	Isolé de (m ; M) (*)	Auteurs	Origine géographique
— Groupe B ● U.S. Bat Salivary glands (Rio Bravo) (California Bat)	<i>Tadarida brazyliensis mexicana</i> (m)	BURNS (K.-F.) FARINACCI (C.-J.) 1957	Texas Californie
● Entebbe Bat salivary glands	<i>Tadarida limbata</i> (m)	LUMSDEN (W.-H.) 1961	Ouganda
● Bukalasa Bat	<i>Tadarida sp.</i> (m)	WILLIAMS (M.-C.) SIMPSON (D.-I.-H.) 1964	Ouganda
● Montana Myotis leucoencephalitis	<i>Myotis lucifugus</i> (m)	BELL (J.-F.) THOMAS (L.-A.) 1964	Montana (USA)
● Dakar-Bat	<i>Scotophilus sp.</i> (m)	BRES (P.) CHAMBON (L.) 1963	Sénégal
— Tacaribe ● Tacaribe	<i>Artibeus lituratus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i> (m)	DOWNES (W.-G.) ANDERSON (C.-R.) 1963	Trinidad
— Rhabdovirus ● Lagos Bat	<i>Eidolon helvum</i> (M)	BOULGER (L.-R.) PORTERFIELD (J.-S.) 1953	Nigeria (Lagos)
● Kern Canyon	<i>Myotis yumanensis</i> (m)	JOHNSON (H.-N.) 1946	Californie (USA)
● Mount Elgon	<i>Rhinolophus hildebrandtii eloquens</i> (m)	METSELAAR (D.) 1968	Kenya
— Non groupé ● Gossas	Chauve-souris	—	Sénégal
— Nouveau ● Phnom-Penh Bat	<i>Cynopterus brachyotis angulatus</i> (M)	SALAÜN (J.-J.) KLEIN (J.-M.)	Cambodge

(*) « m » : microchiroptères ; « M » : mégachiroptère.

TABLEAU III

Arbovirus retrouvés chez les chauves-souris

Nom	Espèce de chauve-souris	Origine géographique
● Fièvre jaune.....	<i>Epomophorus sp.</i>	Ethiopie.
● West-Nile.....	<i>Rousettus leschenaulti</i> .	Inde.
● W.E.E.....	<i>Artibeus lituratus</i>	Colombie (Mexique).
● Nepuyo.....	<i>Vampire</i>	Honduras.
	<i>Artibeus lituratus</i>	
	<i>Artibeus jamaicensis</i> ...	
● S.L.E.....	<i>Tadarida mexicana</i>	USA.
● Catu.....	<i>Molossus obscurus</i>	Brésil.
● Chikungunya.....	<i>Scotophilus sp.</i>	Sénégal.
● Be An 67949.....	<i>Carollia sp.</i>	Brésil.
● J.B.E.....	<i>Miniopterus schreibersi</i> .	Japon.
	<i>Rhinolophus. c. cornutus</i> .	Japon.
● K.F.D.....	<i>Rhinolophus rouxi</i>	Inde.

En ce qui concerne les virus isolés des seules chauves-souris nous voyons qu'ils comprennent : 5 arbovirus du groupe B, le virus Tacaribe, une souche non groupée (le virus Gossas) et trois *Rhabdovirus*. Pour ce dernier groupe on remarque que le virus Lagos-Bat est actuellement rangé dans le sérotype II du groupe rabique des *Rhabdovirus* (2). Enfin un tout nouveau virus vient d'être isolé au Cambodge, par J.-J. SALAÜN, J.-M. KLEIN et G. HEBRARD d'une chauve-souris frugivore (8).

D'autres arbovirus, primitivement isolés chez l'homme, d'autres vertébrés, des insectes, ont été retrouvés, également, chez la chauve-souris. Ce sont les arbovirus suivants (10) : Fièvre jaune, Encéphalite de Saint-Louis, Encéphalite japonaise B, Maladie de la Forêt de Kyasaur, Virus Chikungunya (premier virus pathogène pour l'homme isolé chez la chauve-souris), West-Nile, Nepuyo, Catu, Be An 679 49 et Encéphalite équine du Venezuela (3).

Le virus Dakar-Bat a été isolé en 1963 par BRES et L. CHAMBON au Sénégal. Il fut obtenu à partir de glandes salivaires de chauves-souris insectivores, *Scotophilus sp.*, capturées à Pire, près de Thiès (souche prototype DAK 249). En inhibition de l'hémagglutination et en neutralisation, la souche DAK 249 est proche du virus Banzi (SAH. 336, proche de Uganda. S. et aussi de la

Fièvre jaune ; isolé d'un enfant fébrile au Tongaland. SMITHBURN et coll. 1959).

De nombreuses souches de virus Dakar-Bat ont actuellement été isolées à Ibadan (Nigéria), Bangui (République Centrafricaine), Entebbé (Ouganda) (7). Max THEILER signale un isolement dans le nouveau monde réalisé à partir de *Taphozous sudani* (*Emballonuridae*). L'isolement des deux souches malgaches confirme la vaste répartition géographique de ce virus.

2. — De la sérologie :

Vingt-sept sérums sur 101 (27 p. 100) ont montré une réaction positive en inhibition de l'hémagglutination.

Dans le groupe A, ils semblent bien être les témoins d'une circulation nette du virus Sindbis, plus faible du virus Chikungunya.

Dans le groupe B il existe des sérologies isolées (2 pour le virus West-Nile, 1 pour le virus Dakar-Bat, 9 pour le virus Wesselsbron) et en tout nous trouvons 26 sérologiques positives pour ce groupe, ce qui suppose une circulation d'un ou de plusieurs des virus qui le composent. A ce propos on peut remarquer que pour 150 sérums d'origine humaine provenant de la même région, nous avons trouvé 16 résultats positifs avec l'antigène Dakar-Bat, mais un seul d'entre eux ne donnait pas de réaction avec les autres antigènes du groupe B utilisés.

CONCLUSION

Longtemps retardées pour des raisons matérielles, les études sur les arbovirus à Madagascar sont appelées à connaître prochainement une certaine extension. Les travaux préparatoires nous ont permis d'isoler deux souches de virus Dakar-Bat à partir de chauves-souris insectivores.

La sérologie effectuée en inhibition de l'hémagglutination sur 101 sérums de chauves-souris frugivores (*Pteropus rufus*) est en faveur de la circulation de certains arbovirus, particulièrement les virus Sindbis et Chikungunya dans le groupe A, West-Nile et Wesselsbron dans le groupe B.

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent l'isolement de deux souches de virus Dakar-bat, à Madagascar, à partir de chauves-souris insectivores. Ce virus a pu être adapté sur cellules (BHK.21.C.13 et HeLa). L'étude en inhibition de l'hémagglutination de 101 sérums de chauves-souris frugivores *Pteropus rufus* a également permis de montrer la circulation des arbovirus Sindbis et Chikungunya dans le groupe A et West-Nile, Wesselsbron dans le groupe B.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BRES (P.), CHAMBON (L.) 1963. — Isolement à Dakar d'une souche d'arbovirus à partir des glandes salivaires de chauve-souris. *Ann. Inst. Pasteur*, **104**, 705-711.
- (2) Chronique OMS, 1974, **28**, p. 18.
- (3) CORREA-GIRON (P.), CALISHER (C.-H.), BAER (G.-M.), 1972. — Epidemic strain of venezuelian encephalomyelitis isolated from a vampire bat captured in Oaxaca. Mexico. 1970. *Sciences, USA*, 175, 4021 ; 546-547.
- (4) KARABATSOS (N.), BUCKLEY (S.-M.), 1967. — Susceptibility of the baby hamster kidney cell line to infection with arboviruses. *Am. J. trop. méd. Hyg.*, **16**, 1, 99-105.
- (5) MAYOUX (A.), COLLANGES (P.), BRYGOO (E.-R.) 1970. — Un nouveau réservoir de virus des entérobactéries pathogènes pour l'homme : le Mégachiroptère *Pteropus rufus* Geoffroy, à Madagascar. *C.R. Acad. Sci.*, **270** (D) 2137-2138.
- (6) METSELAAR (D.), WILLIAMS (D.-I.-H.), SIMPSON (R.-W.), MUTERE (F.-A.), 1968 (1969). — Mount-Elgon Bat Virus : a hitherto undescribed virus from *Rhinolophus hildebrandtii eloquens*. K. ANDERSON. *Arch. f. gesamt. Virus f.*, **26**, 183-193.
- (7) ROBIN (Y.), Communication personnelle.
- (8) SALAÜN (J.-J.), KLEIN (J.-M.), HENRARD (G.), 1974. — Un nouveau virus, Phnom-Penh bat virus isolé au Cambodge chez une chauve-souris frugivore, *Cynopterus brachyotis angulatus* MILLER 1898. *Ann. Microbiol.* (Paris), 1974, 125 A, n° 4.
- (9) SUREAU (P.) 1965. — Etude sérologique sur les arbovirus à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **33**, 1, 27-65.
- (10) THEILER (M.), DOWNS (M.-G.) 1973. — Arthropod-borne viruses of vertebrates New-Haven-London-Yale Univ. Press., 577 pages (pp. 387-390).