

Réceptivité orale d'*Aedes aegypti formosus* de Franceville (Gabon, Afrique centrale) pour le virus de la dengue type 2.

M. Vazeille-Falcoz (1), A.-B. Failloux (1), L. Mousson (1), N. Elissa (2) & F. Rodhain (1)

(1) Unité d'écologie des systèmes vectoriels, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15, France.

Tel : 01 40 61 36 17. Fax : 01 40 61 30 89. E-mail : mfalcoz@pasteur.fr

(2) Unité d'entomologie médicale, CIRMF, BP 769, Franceville, Gabon.

Courte note n° 2069. "Entomologie médicale". Reçu le 10 mai 1999. Accepté le 15 septembre 1999.

Summary: Oral Receptivity of *Aedes aegypti formosus* from Franceville (Gabon, Central Africa) for Dengue Type 2 Virus. (short note)

Dengue is widely distributed in the tropics but epidemic activity was rarely reported in Africa before the 1980's. In the past 15 years, increased epidemic dengue fever has been reported both in East and West Africa, raising concern about the ability of local populations of *Aedes aegypti* to transmit dengue viruses. *Ae. aegypti* is present in two forms in Africa: *Ae. aegypti aegypti* and *Ae. aegypti formosus*. This latter form, much darker, was not originally a local species but is now colonizing artificial breeding sites within cities. We have been able to demonstrate the oral susceptibility for dengue type 2 virus of *Ae. aegypti formosus* collected in Franceville, Gabon (Central Africa). However, these mosquitoes sampled exhibited lower infection rates than those of a control colony of *Ae. aegypti aegypti* originating from French Polynesia.

Aedes aegypti formosus
Aedes aegypti aegypti
dengue type 2 virus
oral receptivity
Gabon
French Polynesia
French Guiana
Vietnam
Sub-Saharan Africa

Résumé :

La dengue sévit dans toute la zone intertropicale mais le continent africain semblait relativement épargné jusqu'au début des années 80. Au cours des 15 dernières années la situation a évolué avec l'apparition d'épisodes épidémiques aussi bien en Afrique de l'Est qu'en Afrique de l'Ouest, soulignant de ce fait le problème de la réceptivité orale pour les virus de la dengue des populations locales d'*Ae. aegypti*. Ce moustique est présent sous deux formes en Afrique : *Ae. aegypti aegypti* et *Ae. aegypti formosus*. Cette dernière forme, non domestique à l'origine, colonise maintenant des gîtes de pontes artificiels dans les villes. Nous avons montré la réceptivité orale pour le virus de la dengue type 2 d'un échantillon d'*Ae. aegypti formosus* provenant de Franceville (Afrique centrale). Cependant, la réceptivité de cet échantillon était significativement plus faible, à l'issue d'un repas artificiel, que celle d'une souche témoin d'*Ae. aegypti aegypti*, originaire de Polynésie française.

Aedes aegypti formosus
Aedes aegypti aegypti
virus de la dengue type 2
réceptivité orale
Gabon
Polynésie française
Guyane française
Vietnam
Afrique intertropicale

Introduction

La dengue, première arbovirose humaine en termes de morbidité et de mortalité, sévit dans toute la zone intertropicale. Cependant, jusque dans le début des années 80, le continent africain semblait relativement épargné. En effet, à l'exception d'une épidémie en Afrique du Sud en 1927-1928, aucune activité épidémique n'avait été signalée sur ce continent et ce, malgré l'isolement du virus en 1971 au Nigéria. Il est toutefois possible que le nombre des cas de dengue ait été sous-estimé en raison d'un tableau clinique susceptible d'être confondu avec celui du paludisme ou d'autres maladies virales. La situation a évolué depuis une quinzaine d'années avec l'apparition d'épisodes épidémiques avérés, impliquant les quatre sérotypes, aussi bien en Afrique de l'Est qu'en Afrique de l'Ouest. Aucune épidémie de dengue hémorragique n'a cependant été signalée jusqu'à ce jour (1). Ce changement dans l'épidémiologie de la dengue soulève le problème de la réceptivité orale des populations locales d'*Aedes aegypti* pour les virus de la dengue.

Ae. aegypti est présent sous deux formes en Afrique : *Ae. aegypti aegypti* et *Ae. aegypti formosus*. Cette dernière forme, plus foncée et considérée comme la forme primitive non domestique, colonise maintenant des gîtes artificiels dans les villes. La terminologie *Ae. aegypti formosus* est employée ici dans son sens le plus large, formes sombres africaines, et non pas dans son sens d'origine, restreint à la forme décrite des forêts d'Ouganda. Le but de notre étude a été d'estimer la réceptivité orale pour le virus de la dengue type 2 d'un échantillon d'*Ae. aegypti formosus* provenant de Franceville (Gabon, Afrique centrale) et de la comparer à celle d'un contrôle positif, *Ae. aegypti* souche Paea originaire de Tahiti (Polynésie française), entretenue depuis plusieurs années au laboratoire.

Matériel et méthodes

Moustiques

Les *Ae. aegypti formosus* ont été récoltés à l'état larvaire dans des gîtes artificiels, situés près des habitations, dans le district

“Akou” de Franceville, Gabon, en juillet 1997. Ces larves collectées sur le terrain (génération F0) ont été élevées jusqu’au stade adulte au laboratoire à une température de 28 ± 1 °C, une humidité relative de 80 % et une photopériode de 16 h de jour et 8h de nuit. Les adultes ont été nourris avec une solution de sucrose à 10% et les femelles gorgées sur souris pour obtenir des œufs. Pour les expériences d’infection, nous avons testé les femelles des générations F2 et F3.

La souche Paea d’*Ae. aegypti*, fournie par l’Institut Louis Malardé (Tahiti, Polynésie française) et entretenue depuis 1994 à Paris, a été utilisée comme contrôle de la réceptivité orale.

Virus

La souche de virus de dengue type 2 fournie par L. ROSEN (Unité d’écologie des systèmes vectoriels) a été isolée en 1974 à Bangkok (Thaïlande) d’un sérum humain. Cette souche virale a été exclusivement amplifiée sur moustiques (*Toxorhynchites amboinensis*, *Aedes albopictus* et *Ae. aegypti*), les passages étant effectués par inoculation intrathoracique (6). Le stock viral utilisé pour les repas a été produit sur des cultures cellulaires d’*Ae. albopictus* (clone C6/36) (2) inoculées avec un broyat de moustiques infectés. Les cultures cellulaires ont été entretenues à 28 °C sur du milieu RPMI-1640 complété avec des acides aminés non essentiels, de la pénicilline, de la streptomycine et 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage (30mn à 56 °C). Le pourcentage de cellules infectées a été vérifié en cours d’incubation par un test d’immunofluorescence indirect (IFI) (3). Le surnageant de culture a été récolté lorsque 100 % des cellules étaient infectées. Le pH de ce surnageant a été ajusté à 7,5 avec une solution de bicarbonate de soude à 10 % afin d’assurer une meilleure conservation du virus. Le stock a ensuite été réparti en aliquots et congelé à -80 °C jusqu’à utilisation. Le titrage de ce stock a été effectué en inoculant des dilutions croissantes par voie intra-thoracique à des *Ae. aegypti* de la souche Paea. L’infection des moustiques a été détectée par un test IFI réalisé sur les squashes de têtes (écrasement de têtes réalisé entre 2 lames de verres) des moustiques inoculés et incubés 14 jours à 28°C pour assurer une répllication optimale du virus. Le titre a été calculé par la méthode de la dilution limite infectant 50 % des individus (4) et exprimé en doses infectantes par 50 % des moustiques (DIM₅₀) par ml.

Infection orale des moustiques

La réceptivité orale des moustiques a été testée par un protocole de gorgement artificiel déjà décrit (7). En bref, le repas artificiel maintenu à 37 °C a été proposé aux femelles au travers d’une peau de poulet pendant 20 mn. Ce repas était composé d’un volume de suspension virale, de deux volumes de globules rouges de lapin, et d’ATP (phagostimulant), à une concentration finale de 5×10^{-3} M. Tous les repas contenaient une quantité fixe de particules virales : $10^{8.2}$ DIM₅₀ par/ml. Seules les femelles à réplétion totale ont été incubées 14 jours à 28 °C. La présence du virus a été recherchée par un test IFI réalisé sur les squashes de têtes des femelles survivantes à la fin de la période d’incubation. Nous avons ainsi pu déterminer un pourcentage de femelles infectées pour l’échantillon et le contrôle.

Résultats

Les femelles *Ae. aegypti formosus* “Akou” ont pu être infectées par voie orale par le virus de la dengue type 2. Les pourcentages de femelles infectées 14 jours plus tard étaient de 52,0 % (13/25) pour la F2 et de 69,6 % (16/23) pour la F3. Les taux d’infection obtenus pour la souche Paea contrôle nourrie sur le même repas étaient respectivement de 91,7 % (33/36) et de 96,4 % (27/28). Une comparaison effectuée par le test exact de FISHER montre que la différence entre le taux d’infection du contrôle et celui de l’échantillon est significative

pour les deux repas au seuil 5 % ($p = 0,0007$ pour la F2 et $p = 0,015$ pour la F3). De plus, nous avons constaté que les femelles Akou digéraient plus rapidement le repas sanguin que les femelles Paea. En effet, à l’issue du repas de 20 mn, le bol alimentaire était rouge brillant chez les femelles de la souche Paea alors qu’il était déjà brun-rouge chez les femelles Akou.

Conclusion

Les femelles *Ae. aegypti formosus* provenant du district de Akou de Franceville peuvent être infectées par voie orale par le virus de la dengue type 2 qui est retrouvé chez elles 14 jours plus tard. Cependant, ces femelles présentent alors des taux d’infection significativement différents de ceux des femelles de la souche Paea d’*Ae. aegypti aegypti* originaire de Tahiti. Ces taux d’infection sont également plus faibles que ceux de populations d’*Ae. aegypti* des îles de Tahiti et Moorea (Polynésie française) (7), de Guyane française et de la région de Ho-Chi-Minh Ville (Vietnam) testées à la première ou deuxième génération dans notre laboratoire (résultats non publiés). Il faut se garder de tirer des conclusions hâtives de ces résultats. En effet, dans le cas de la dengue, comme dans celui de nombreux autres arbovirus, l’infection sur un repas artificiel requiert un nombre beaucoup plus important de particules infectieuses que l’infection sur un hôte virémique (5). Il se peut donc que la moindre réceptivité orale pour le virus de la dengue 2 observée chez *Ae. aegypti formosus* permette néanmoins l’infection dans les conditions naturelles. De plus, la réceptivité orale d’un vecteur potentiel n’est pas le seul facteur nécessaire à l’apparition d’une épidémie. La virulence de la souche virale, l’état immunitaire des populations humaines, la densité du vecteur, sa durée de vie et la fréquence des contacts hôte-vecteur sont aussi à prendre en considération. Au vu de ces résultats, il est évident qu’une étude plus approfondie est nécessaire pour déterminer le rôle des deux formes différentes d’*Ae. aegypti* dans l’épidémiologie de la dengue en Afrique. Cette étude devra porter sur un large échantillonnage de moustiques afin de déterminer la répartition géographique et la variation génétique de chacune des deux formes et leur capacité à jouer un rôle dans la transmission de la dengue en Afrique.

Remerciements

Nous remercions Nadia MONNIER pour l’entretien des moustiques en élevage.

Références bibliographiques

- GUBLER DJ - Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. In: SCHELD WM, ARMSTRONG D & HUGHES JM (Eds) - *Emerging Infections 1*, ASM Press, Washington DC, 1998, pp. 1-14
- IGARASHI A - Isolation of a Singh’s *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*, 1978, **40**, 531-544.
- KUBERSKI TT & ROSEN L - A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*, 1977, **26**, 533-537.
- REED LJ & MUENCH H - A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, **27**, 493-497.
- RODHAIN F & ROSEN L - Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER DJ & KUNO G (Eds) - *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, CAB International, New York, NY, 1998, 45-60.
- ROSEN L & GUBLER DJ - The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 1974, **23**, 1153-1160.
- VAZEILLE-FALCOZ M, MOUSSON L, RODHAIN F, CHUNGUE E & FAILLOUX AB - Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 1999, **60**, 292-299.