

Etude pilote pour la recherche de virus dans des moustiques autour du foyer de dengue autochtone à Nîmes 2015.

Montpellier, le 13 octobre 2015

Contributeurs : Maxime Duhayon (EID-Méditerranée), Jean-Baptiste Ferré (EID-Méditerranée), Frédéric Jourdain (CNEV), Isabelle Leparc-Goffart (CNR des Arbovirus), Christophe Paupy (IRD), David Roiz (IRD).

Objectif principal : capturer des moustiques pour rechercher du matériel viral dans un contexte de transmission active et évaluation d'une éventuelle circulation silencieuse dans le compartiment moustique.

1. Protocole

Notre objectif a consisté à réaliser un échantillonnage de moustiques spatialement représentatif au niveau de la zone de circulation active du virus. Pour ce faire, la zone a été divisée en carré de 100 m x 100 m. Un piège a été placé dans un carré sur deux (échantillonnage régulier systématique). Le réseau de piégeage est présenté au sein de la figure 1. Dans chaque carré, une maison a été choisie en fonction de l'accessibilité. Dans deux des quatre sites où il y a eu des cas autochtones, deux pièges ont été placés. Des BG-Sentinel® ont été utilisés avec comme attractifs du BG-lure® et de la carboglace. Il n'a pas été logistiquement possible d'équiper l'ensemble des pièges avec de la carboglace. Ainsi 16 pièges sur 20 ont été installés avec du CO₂ sous forme solide. Lorsque c'était possible, les pièges ont été branchés sur secteur, sinon, une batterie a été installée.

Chaque piège a été localisé spatialement et un datalogger a été mis en place pour mesurer et enregistrer la température et l'humidité relative toutes les 30 minutes. L'échantillonnage a eu lieu pendant 5 jours (4 relevés) du lundi 7 Septembre au vendredi 11 septembre. Un traitement a eu lieu le mardi soir au niveau de l'école et du lycée et le mercredi matin pour le reste de la zone. Seulement quatre pièges étaient situés en dehors la zone de traitement. Pour l'analyse des données (abondance), seuls les pièges ayant utilisé de la carboglace pendant les cinq jours de capture ont été considérés, soit 7 pièges dans la zone traitée et 3 pièges dans la zone non traitée. Les autres ont été exclus de cette analyse.

Un effort important a été mis en œuvre pour préserver le matériel viral, en particulier concernant le respect de la chaîne du froid : relevé quotidien des pièges, transport des nasses dans la carboglace, stockage à -80°C, tri et dissection sur table froide. Pour chaque piège-jour, les moustiques femelles *Ae. albopictus* ont été séparés. Les abdomens ont été poolés par piège et jour de capture et le reste des carcasses (tête et thorax) a été conservé individuellement pour chaque spécimen. Ceci permet, dans le cas d'un pool de moustiques positif, d'identifier le nombre d'individus positifs et, éventuellement, de distinguer les *moustiques infectés* (présence de virus dans l'intestin et l'hémolymph) des *moustiques infectant* (la présence de virus dans la tête étant considérée comme bon proxy de la présence virale dans les glandes salivaires).

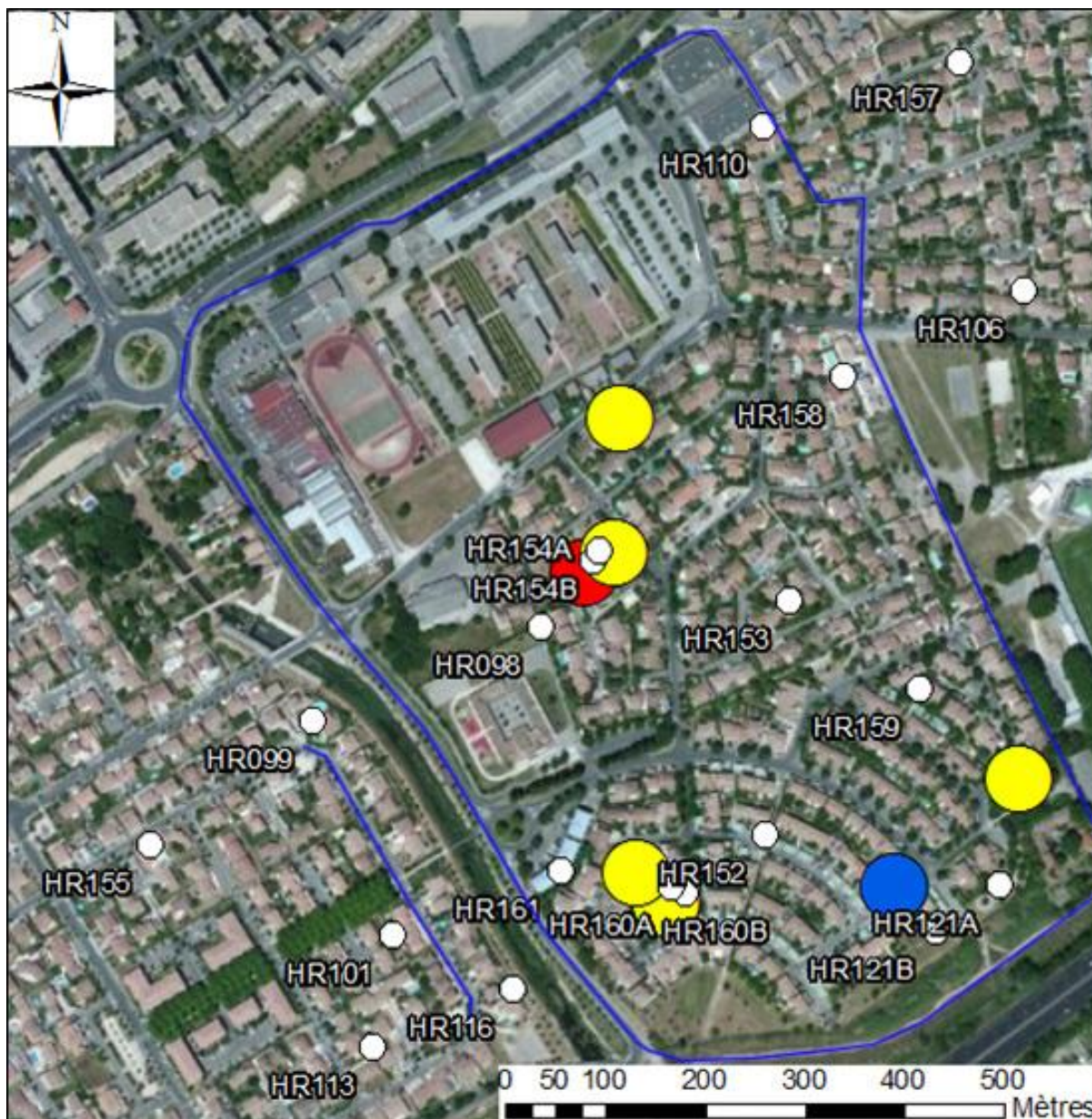


Figure 1. Carte de positionnement des 20 pièges BG (points blancs). Cas index : cercle rouge, cas autochtones confirmés : cercles jaunes, cas suspects : cercles bleus. Le trait bleu représente le périmètre de traitement.

2. Résultats

1373 moustiques ont été capturés, dont 73% d'*Ae. albopictus* (793 femelles et 219 males), 22,2% de *Culex pipiens* ainsi que des spécimens des espèces suivantes : *Ochlerotatus caspius*, *Culiseta longiareolata*, *Anopheles maculipennis s.l.* et *Culex modestus*.

Pour la recherche virale, les 793 femelles d'*Ae. albopictus* ont été disséquées et répartis en 66 échantillons. Les pools ainsi constitués ont été adressés au CNR des arbovirus (IRBA, Marseille), toujours dans un respect strict de la chaîne du froid.

Les pools ont été broyés et analysés par RT-PCR pour la recherche du génome des virus de la dengue et du West Nile. Un contrôle interne (ARN encapsidé) a été ajouté à chaque pool broyé. Ceci a permis de confirmer l'absence d'inhibiteurs de la polymérase et donc de confirmer l'absence de faux négatifs.

3. Analyses de données

3.1. Recherche virale

La recherche virale par RT-PCR sur les 66 pools d'*Ae. albopictus* s'est avérée négative pour la dengue ainsi que pour le virus West Nile.

La recherche de VWN a été mise en œuvre suite au signalement d'un cas humain de fièvre à virus West Nile – date de début des signes le 27/09/2015 - résidant à environ 1,5 km du foyer de dengue.

3.2. Abondances

Bien que l'objectif initial ne consiste pas à étudier la dynamique des populations de moustiques au niveau de la zone de circulation, l'échantillonnage permet d'apporter des informations sur la population vectorielle et de soulever des questions concernant les abondances en moustiques capturés pendant la durée de l'expérimentation. Pour réaliser cette analyse, seuls les pièges utilisant de la carboglace pendant les 5 jours de capture ont été considérés afin de limiter les biais d'échantillonnage, soit 7 pièges au sein de la zone traitée et 3 au sein de la zone non traitée.

Dans la Figure 2 et 3, on observe une diminution générale des abondances après les opérations de traitement. La densité d'*Aedes albopictus* a diminué significativement (résultats modèle mixte généralisé binomiale négative) dans les pièges qui sont dans la zone de traitement. Dans la zone non traitée, une diminution est observée, cependant celle-ci n'est pas significative ($p=0,064$). La variance expliquée par la variable traitement est de 55% dans la zone traitée, alors qu'elle est de 20% dans la zone non traitée. L'analyse dans la zone traitée est robuste, mais le manque de puissance statistique (3 pièges seulement) au niveau de la zone non traitée ne permet pas de conclure clairement quant au niveau de l'efficacité des traitements bien qu'une diminution significative de la densité vectorielle soit observée au sein de la zone traitée. Dans la zone non traitée une diminution non significative est observée ($p=0,064$). Le faible nombre de pièges dans cette zone (non traitée) est par conséquent une limite majeure à l'analyse. Il est par ailleurs utile de préciser ici qu'une telle évaluation n'était pas l'objectif principal de l'étude.



Figure 2. Interpolation des abondances de femelles d'*Aedes albopictus* (moyenne piège/jour) avant (gauche) et après (droite) les traitements.

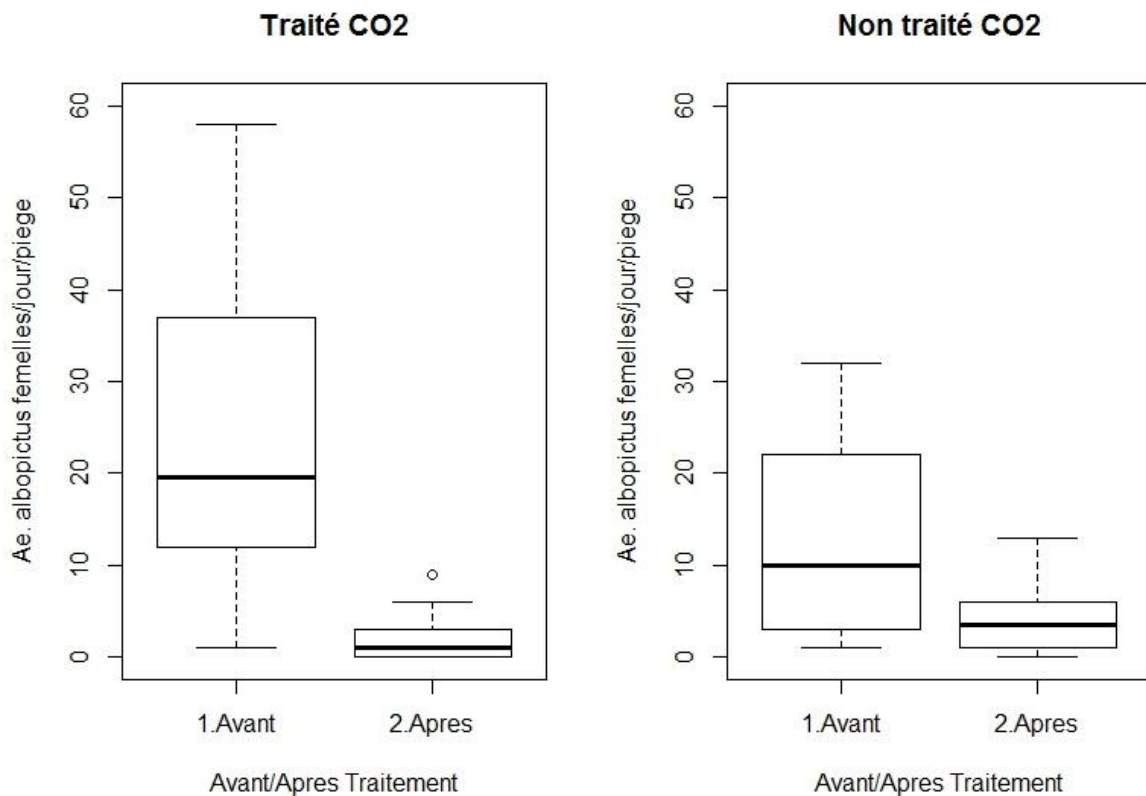


Figure 3. Box plots des abondances de femelles d'*Aedes albopictus* (médiane par piège/jour) avant (gauche) et après (droite) les traitements au sein des pièges ayant utilisés de la carboglace tout au long du suivi. La significativité de la diminution de la densité culicidienne au sein de la zone traitée est très élevée ($<10^{-6}$). Par contre, la diminution au sein de la zone non traitée n'est pas significative ($p=0.064$).

4. Bilan en termes de ressources humaines

Dans le cadre de ce compte-rendu, il semble également utile de dresser un bilan des moyens humains mobilisés dans le cadre de ce projet pilote.

Ainsi, ce sont entre une et cinq personnes (EID Méditerranée, CNEV, IRD), qui ont été mobilisées en fonction des jours de capture :

- J1 : mise en place du piégeage (**hors temps de trajet**) : 5 personnes*5heures =25h,
- J2 : compléments au réseau, relevés des pièges, maintenance du réseau et transfert des échantillons (**hors temps de trajet**) : 2 personne*6h=12h
- J3 et J4 : relevés des pièges, maintenance du réseau et transfert des échantillons (**hors temps de trajet**) : 1 personne*2jours*6h=12h
- J5 : relevé et dépose des pièges (**hors temps de trajet**) : 2 à 3 personnes environ 12h au total.

Les ressources nécessaires au suivi pendant une semaine peuvent ainsi être évaluées à : **61h**

A cette durée, il faut rajouter les temps de trajets, qui dans le cas de trajets Montpellier-Nîmes en comptant la logistique (récupération de la carboglace, trajet jusqu'à Nîmes, retour par l'IRD pour livrer les échantillons), peuvent être estimés à 2h par jour (aller-retour), soit environ 10h (J1), 4h (J2), 4h (J3 et J4), et 6h (J5) : **soit 24h de trajet sur la semaine.**

Environ **24h** ont également été nécessaires pour le tri, la dissection et le « poolage » des moustiques capturés. Cette durée pourrait néanmoins être réduite en fonction des objectifs poursuivis, en s'affranchissant de la phase de dissection, qui, en termes de travail de laboratoire, est la plus chronophage.

Au niveau du CNR, 21h (soit 3 jours d'ETP) ont été nécessaire à la préparation des échantillons et la réalisation des analyses.

Ce sont ainsi 130 h qui ont été nécessaires à la réalisation de l'ensemble des travaux.

5. Conclusions et limites

Le protocole a été élaboré pour optimiser les captures d'*Ae. albopictus* dans l'objectif d'une recherche de matériel viral au sein du compartiment moustique.

Les résultats négatifs en termes de recherche virale laissent un certain nombre de question ouvertes. En particulier, ils n'ont pas permis de répondre à la question de la prévalence de la dengue au sein des populations de moustiques dans le contexte du foyer de dengue observé à Nîmes.

Ces captures ont été réalisées du 7 au 11 septembre, et un troisième traitement du foyer de cas autochtones a eu lieu pendant l'expérimentation. Les précédents traitements de LAV avaient été réalisés le 18 aout, sur un secteur limité, et le 28 aout sur la même zone que le 3^{ème} traitement. (cf cartes de traitement en Annexe).

Afin d'optimiser la probabilité de capture de moustiques infectés dans un tel contexte, il serait essentiel de déployer un dispositif similaire de façon beaucoup plus précoce. En effet, les piégeages ont été mis en œuvre du 7 au 11 septembre ce qui peut être considéré comme tardif au regard des dates de début des signes des différents cas identifiés (cf. annexe 1) et sachant que le dernier cas a été signalé le 16 septembre, il n'a pas été permis de le prendre en compte lors de la définition du réseau

de pièges. Il est cependant à noter que la période d'infection du dernier cas sur ce secteur (cas n°7) est antérieure aux piégeages réalisés.

Pour un objectif spécifique d'évaluation de la prévalence (chez le moustique) autour d'un foyer, l'effort de piégeage devrait être renforcé à proximité des cas autochtones, et en particulier des clusters éventuels. Aussi, le nombre minimum de moustiques à capturer pour mettre en évidence la présence de virus peut également être discutée. Une rapide revue bibliographique – non exhaustive - permet de disposer de certains éléments. Ainsi, le taux minimum d'infection¹ est extrêmement variable en fonction des situations épidémiologiques, entomologiques, des conditions de capture, etc. Selon les données de la littérature (bien souvent en contexte de forte circulation), le taux minimum d'infection (et par conséquent le nombre minimum de moustiques infectés) est compris entre 0,5 et 10%. Ces chiffres doivent par conséquent être mis en perspective avec le nombre total de femelles *Ae. albopictus* collectées à proximité directe des cas (maison de cas ou maison directement contiguë à des cas) qui s'élève à 77 individus. La probabilité de capturer des moustiques infectés est d'autant plus réduite que les captures ont été réalisées bien après la date de transmission des cas autour desquels les captures ont pu être mises en œuvre (plus d'un mois).

Les captures réalisées sur la zone d'étude montrent une baisse significative des effectifs en vecteurs dans le périmètre d'intervention après la réalisation de traitements. Toutefois, une analyse complète de la dynamique des populations de moustiques dans le cadre de traitements de LAV (quantification précise de l'efficacité intrinsèque des traitements, effet répulsif de ces traitements ou encore dynamique de recolonisation de la zone traitée) aurait nécessité un protocole adapté à cet objectif spécifique en définissant en particulier une zone contrôle adaptée ; en particulier, il aurait été nécessaire (1) de réaliser davantage de captures en dehors - et à plus grande distance - de la zone traitée, (2) de continuer l'effort de piégeage pendant plusieurs jours après le traitement et (3) d'utiliser les attractants (carboglace notamment) de la même manière au cours du temps, notamment au niveau de chaque piège, voire si possible de manière homogène pour chaque point du réseau de pièges.

Cependant, cette étude pilote a été l'occasion de tester un protocole d'échantillonnage dans un contexte de circulation virale et de proposer des pistes d'améliorations de ce protocole en fonction des objectifs poursuivis en apportant des éléments fondamentaux tant en termes méthodologique que logistique. Cette étude permettra par conséquent d'apporter des éléments à la saisine DGS relative au piégeage autour des cas.

¹ Le taux minimum d'infection (minimum infection rate ou MIR en anglais) permet d'estimer la prévalence d'un arbovirus au sein d'une population de moustiques. Le MIR est le ratio du nombre de pools positifs sur le nombre total de moustiques collectés. Il s'agit donc par définition de la proportion minimale de moustiques infectés et part de l'hypothèse qu'il y a uniquement un spécimen qui contribue à la positivité d'un pool. Le MIR est considéré comme adapté à des situations où les taux d'infections sont faibles au sein des populations de moustiques.

Annexe 1. Cas autochtones confirmés et probable de dengue à Nîmes (source Cire LR)

	Statut	Date de début des signes
Cas 0 (cas index)	Confirmé	04/07
Cas 1	Confirmé	08/08
Cas 2	Confirmé	08/08
Cas 3	Confirmé	13/08
Cas 4	Confirmé	18/08
Cas 5	Confirmé	08/08
Cas 6	Probable	08/08
Cas 7	Confirmé	10/09

Annexe2 : Cartes des traitements de LAV

