

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	4
ABSTRACT.....	4
REMERCIEMENTS.....	5
ABRÉVIATIONS.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES FIGURES.....	8
I.INTRODUCTION.....	10
I.1.Présentation du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift	10
I.2.Historique et répartition	10
I.3.Transmission.....	11
I.3.1.Transmission vectorielle	11
I.3.2.Transmission directe.....	13
I.4.Impact.....	14
I.4.1.Économique.....	14
I.4.2.Sanitaire.....	14
I.5.Mesures de contrôle de la FVR.....	15
I.6.Conditions de l'émergence de la FVR	15
I.7.FVR en Afrique Centrale	16
II.OBJECTIFS DU STAGE.....	17
III.MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	17
III.1.Site d'étude.....	17
III.1.1.Lieux et dates de captures.....	18
III.1.1.1.Lambaréné.....	18
III.1.1.2. Lopé	21
III.1.2.Collecte des Culicidae.....	22
III.1.2.1.Piège lumineux (CDC).....	22
III.1.2.2.Capture sur Homme.....	23
III.1.3.Identification et mise en lot.....	23
III.2.Analyse.....	25
III.2.1.Criblage viral	25
III.2.1.1.Broyage.....	25
III.2.1.2.Extraction d'ARN.....	26
III.2.1.3.PCR Pan-Phlébo.....	26
a)RT-PCR.....	26

b)PCR nichée.....	27
III.2.1.4. Migration et révélation:.....	29
III.2.1.5. PCR en temps réel.....	29
III.2.1.6.Séquençage.....	30
III.2.2.Identification des repas sanguins.....	30
III.2.2.1.Extraction.....	30
III.2.2.2.Amplification, révélation.....	30
III.2.2.3.Séquençage	31
IV.RÉSULTATS.....	31
IV.1. Captures	31
IV.1.1.Lambaréné.....	33
IV.1.2.La Lopé.....	33
IV.2. Criblage viral et identification des repas sanguins.....	34
IV.2.1.Criblage viral.....	34
IV.2.1.1.RT-PCR pan-phlébo.....	34
IV.2.1.2.QRT-PCR.....	35
IV.2.1.3.Séquençage.....	35
IV.2.2.Repas sanguin.....	36
IV.2.2.1. Séquençage.....	36
V.DISCUSION	37
V.1.Méthodes de captures.....	37
V.2.Méthodes de biologie moléculaires	38
V.2.1.Criblage viral.....	38
V.2.2.Identification des repas sanguins.....	39
VI.CONCLUSION	39
BIBLIOGRAPHIE.....	41
ANNEXES	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Moustiques naturellement porteurs du virus de la FVR

Tableau 2: Préparation du mix pour RT-PCR

Tableau 3: Préparation du mix pour PCR nichée

Tableau 4: Préparation du mix pour PCR Cyt b

Tableau 5: Tableau récapitulatif du nombre de moustiques femelles capturées par site et par type de pièges utilisés pour le criblage viral

Tableau 6: Tableau récapitulatif du nombre de moustiques mâles capturés par site et par type de pièges utilisés pour le criblage viral

Tableau 7: Tableau récapitulatif du nombre de femelles gorgées capturées par site, utilisées pour l'identification des repas sanguin

Tableau 8: Liste des lots des moustiques gorgés ayant été amplifiés

Tableau 9: Correspondance des séquences des vertébrés

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Carte de répartition de la Fièvre de la Vallée du Rift

Figure 2: Cycle récapitulatif de la circulation du virus de la FVR

Figure 3: Carte du Gabon

Figure 4: Photo illustrant le type d'environnement de Lambaréné

Figure 5: Photo illustrant le type d'environnement de la Lopé

Figure 6: Photo d'un piège lumineux (CDC-UV)

Figure 7: Schéma récapitulatif de la démarche analytique

Figure 8: Présentation des cycles de la RT-PCR

Figure 9: Présentation des cycles de la PCR nichée

Figure 10: Présentation des cycles de la PCR Cyt b

Figure 11: Résultat de la PCR en temps réel. Seul le témoin positif est amplifié

I. INTRODUCTION

I.1. PRÉSENTATION DU VIRUS DE LA FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est provoquée par un arbovirus (VFVR) appartenant à la famille des *Bunyaviridae* et au genre *Phlebovirus* (Bird *et al.*, 2009). Ce virus transmis par des Culicidae (moustiques) possède une enveloppe lipidique avec 2 glycoprotéines de surface G1 et G2 et son génome est constitué de 3 segments « large (L) », « medium (M) » et « small (S) ». Ce virus à ARN est capable de supporter un cycle avec des réplifications alternatives chez des hôtes vertébrés et invertébrés grâce à une grande plasticité génétique et à un taux élevé de mutation (Holland *et al.*, 1998).

Le virus de la FVR circule habituellement chez les animaux sauvages selon un cycle sauvage (cycle selvatique) dont les modalités sont encore mal définies. Le virus peut également adopter un cycle domestique et atteindre des animaux domestiques ou de rente (bovins, ovins, caprins) et provoquer d'importantes épizooties accompagnées d'un fort taux de mortalité et d'avortement. Le virus FVR est zoonotique, signifiant qu'il peut également affecter l'homme qui est considéré comme un hôte accidentel. Chez ce dernier, le virus peut être à l'origine de fièvres hémorragiques d'issue souvent fatale (Davies *et al.*, 2006).

I.2. HISTORIQUE ET RÉPARTITION

La FVR a été identifiée et caractérisée pour la première fois en 1931 par Daubney, Iludson et Garuham durant une épizootie chez des ongulés domestiques dans la grande Vallée du Rift au Kenya (Easterday *et al.*, 1962). Depuis cette date, la circulation du virus a été étudiée. Il a été retrouvé lors d'épizooties extensives (Namibie en 1955, Egypte en 1977) ou limitées (Soudan en 1976, Mozambique en 1969) mais il a aussi été isolé de manière périodique (Burkina Faso en 1984, Guinée en 1983). Enfin, des études sérologiques ont permis de témoigner de la présence du virus dans des pays d'Afrique Centrale (1983, 1984) et en Somalie (1984) (James *et al.*, 1988). Ce n'est que dans les années 1970 que cette maladie a commencé à être considérée comme un problème de santé publique. En effet, avant cela elle n'était considérée que d'intérêt vétérinaire. Mais l'intérêt porté à cette maladie s'est accru avec les épidémies de 1977 en Egypte (594 décès), celle de 1987 au Sénégal et en Mauritanie (225 décès) et la mort en 2006-2007 de 698 personnes au Kenya, Somalie, Tanzanie et au Soudan (AFSSA, 2008 ; Cêtre-Sossah *et al.*, 2009). Jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, la FVR est restée limitée à l'Afrique Sub-Saharienne. Ce n'est qu'en 2000 que le virus a été isolé en dehors du continent Africain (Yémen et Arabie Saoudite entraînant 245 décès). Même si certains pays africains n'ont encore jamais connu d'épidémie ou d'épizootie, le virus a pu être isolé chez des vecteurs et chez des animaux domestiques ou sauvages (Figure 1). La compréhension de la circulation du virus à bas bruit dans certains pays d'Afrique par l'intermédiaire de la faune et des vecteurs sauvages est essentielle pour mieux comprendre et prédire l'apparition de ce virus (Wilson, 1994).

Il est intéressant de noter que le développement économique en Afrique est accompagné d'une meilleure gestion des pâtures conduisant à l'augmentation de la concentration d'ongulés et la diminution de l'élevage nomade, provoquant l'augmentation du risque d'enzootie et d'épizootie de FVR (Wilson, 1994).

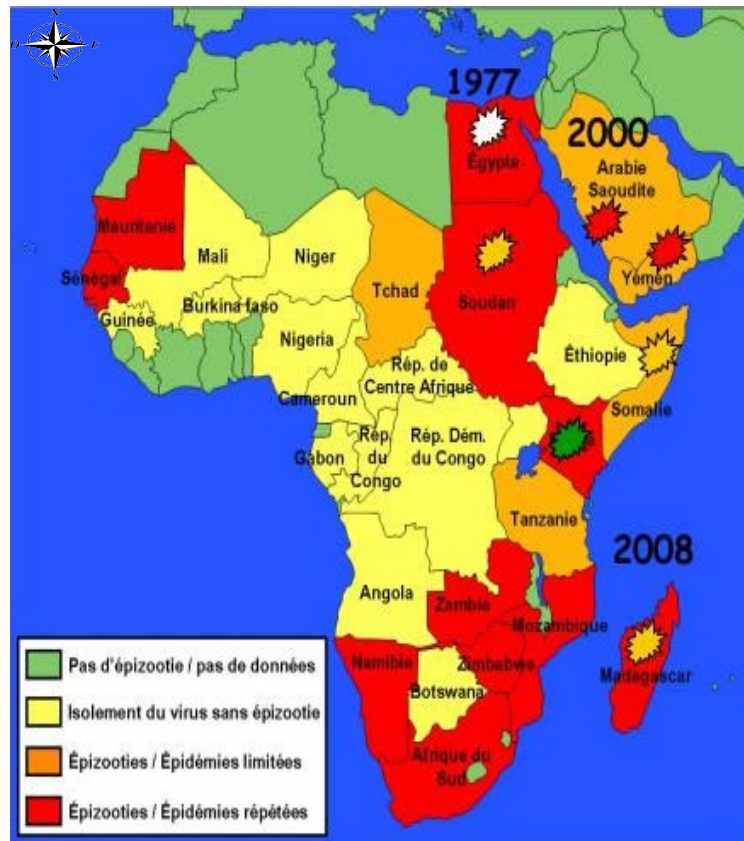


Figure 1: Carte de répartition de la Fièvre de la Vallée du Rift: (d'après <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000038-02m>)

1.3. TRANSMISSION



I.3.1. TRANSMISSION VECTORIELLE

Bien que les Phlébovirus sont en général transmis par des phlébotomes (Diptères, Psychodidae), le virus FVR est transmis par des *Culicidae* (Flick *et al.*, 2005). Les moustiques connus pour être vecteurs de ce virus sont nombreux (tableau 1). En général, ils appartiennent aux genre *Culex* et *Aedes* (Chevalier *et al.*, 2005) mais le virus a également été détecté chez les genres *Anopheles*, *Mansonia*, *Eretmapodites* et *Coquillettidia* (Bird *et al.*, 2009). Ces moustiques jouent le rôle de vecteurs biologiques qui sont essentiels au maintien du virus. La transmission du virus se

fait principalement de manière horizontale (le moustique s'infecte lors d'une piqûre sur un vertébré virémique), mais chez des espèces comme *Aedes mcintoshi* la transmission verticale (transmission trans-ovarienne: une femelle infectée peut infecter sa descendance) a été mise en évidence (Chevalier *et al.*, 2008). Les moustiques du genre *Culex* jouent aussi un rôle important car ils possèdent une capacité vectorielle élevée (Bird *et al.*, 2009). Le pathogène est transféré du lieu de l'injection aux noeud lymphatiques. Il y a ensuite répllication puis déclenchement de la virémie.

genre	espèce	localité	reference
Aedes (Aedimorphus)		Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
	<i>cumminsii</i>	Burkina Faso (1983)	Saluzzo et al. (1984)
	<i>dalzieli</i>	Senegal (1974, 1983)	Fontenille et al. (1998)
	<i>dentatus</i>	Zimbabwe (1969)	McIntosh (1972)
	<i>durbanensis</i>	Kenya (1937)	Mulligan (1937)
	<i>ochraceus</i>	Senegal (1993)	Fontenille et al. (1995)
	<i>tarsalis</i>	Uganda (1944)	Smithburn et al. (1948)
	<i>vexans arabiensis</i>	Senegal (1993)	Fontenille et al. (1995)
Aedes (Neomelaniconion)		Saudi Arabia (2000)	Jupp et al. (2002)
		Uganda (1955)	Weinbren et al. (1957)
	<i>circumluteolus</i>	South Africa (1955, 1981)	Kokernot et al. (1957), Jupp et al. (1983)
		Zimbabwe (1969)	McIntosh (1972)
	<i>mcintoshi</i>	South Africa (1974-75)	McIntosh et al. (1980a)
Ochlerotatus (Ochlerotatus)		Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
	<i>palpalis</i>	Central African Republic (1969)	Digoutte et al. (1974)
	<i>caballus</i>	South Africa (1953)	Gear et al. (1955)
	<i>caspius</i>	Egypt, suspected (1993)	Turell et al. (1996)
Aedes (Stegomyia)	<i>juppi</i>	South Africa (1974-75)	McIntosh et al. (1980a)
	<i>africanus</i>	Uganda (1956)	Weinbren et al. (1957)
	<i>demeilloni/dendrophilus</i>	Uganda (1944)	Smithburn et al. (1948)
Aedes (Diceromyia)	<i>furcifer group</i>	Burkina Faso (1983)	Saluzzo et al. (1984)
Anopheles (Anopheles)		Zimbabwe (1969)	McIntosh (1972)
	<i>coustani</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
	<i>fuscicolor</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
Anopheles (Cellia)	<i>christyi</i>	Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
	<i>cinereus</i>	South Africa (1974-75)	McIntosh et al. (1980a)
	<i>pauliani</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
	<i>pharoensis</i>	Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
	<i>squamosus</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
Culex (Culex)	<i>spp</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
		Nigeria (1967-70)	Lee 1979
	<i>antennatus</i>	Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
	<i>neavei</i>	South Africa (1981)	McIntosh et al. (1983)
	<i>pipiens</i>	Egypt (1977, 1978)	Hoogstraal et al. (1979) Meegan et al. (1983)
	<i>poicilipes</i>	Senegal (1998)	Diallo et al. (2000)
		South Africa (1970)	McIntosh (1972)
	<i>theileri</i>	Zimbabwe (1969)	McIntosh (1972)
	<i>tritaeniorhynchus</i>	Saudi Arabia (2000)	Jupp et al. (2002)
	<i>vansomereni</i>	Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
Culex (Eumelanomyia)		South Africa (1981)	McIntosh et al. (1983)
	<i>rubinotus</i>	Kenya (1981-84, 1989)	Linthicum et al. (1985b), Logan et al. (1991)
	<i>chrysogaster</i>	Uganda (1944)	Smithburn et al. (1948)
Eretmapodites		South Africa (1971)	McIntosh (1972)
	<i>quinquevittatus</i>	Kenya (1981-84)	Linthicum et al. (1985b)
Coquillettia	<i>fuscopennata</i>	Uganda (1959)	Williams et al. (1960)
	<i>grandidieri</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)
Mansonia (Mansoniodes)		Uganda (1959, 1968)	Williams et al. (1960) Henderson et al. (1972)
		Central African Republic (1969)	Digoutte et al. (1974)
	<i>africana</i>	Kenya (1989)	Logan et al. (1991)
		Uganda (1959)	Williams et al. (1960)
	<i>uniformis</i>	Madagascar (1979)	Clerc et al. (1982)

Tableau 1: Moustiques naturellement porteurs du virus de la FVR (source Baldet et al., 2005)

Le cycle de transmission de la FVR le mieux caractérisé est le cycle domestique (Figure 2). Les périodes d'épizooties, durant lesquelles la transmission est intense, sont entrecoupées de périodes dites d'inter-épizooties qui peuvent durer plusieurs années, avec une subite réapparition du virus. Bien que le rôle de transmission verticale dans le maintien du virus ait été démontré, l'existence d'un cycle sauvage jouant le rôle de réservoir de virus a également été évoqué (Geering

et al., 2003 ; AFSSA, 2008 ; Bird *et al.*, 2009). Cette hypothèse est confirmée par des études qui mettent en évidence une circulation du virus chez l'homme dans des zones où le bétail est absent (Nakounne *et al.*, 2000). Par ailleurs, le virus a également été isolé chez des moustiques exclusivement forestiers (*Aedes (Neomelaniconion) gr. palpalis*) (Cordellier *et al.*, 1976), et des anticorps spécifiques au virus de la FVR ont été détectés en République d'Afrique Centrale chez des vertébrés sauvages comme le zèbre et l'éléphant (Evans *et al.*, 2007). En dépit de toutes ces informations, la compréhension de la circulation du virus entre le cycle sauvage et le cycle domestique n'est pas encore totale. En effet, les hôtes et les vecteurs intervenant dans le maintien du virus dans le cycle sauvage restent encore largement méconnus. Le virus pourrait circuler grâce à des contacts directs entre animaux sauvages et domestiques, par des vecteurs ou par l'intermédiaire d'espèces qui circulent dans les deux milieux (rongeurs).

Le VFVR a aussi été isolé à partir d'autres arthropodes (phlébotomes, simuliés, culicoides, tiques (Fontenille *et al.*, 1998 ; Gerdes, 2004 ; AFSSA, 2008 ; Bird *et al.*, 2009) qui pourraient permettre une transmission mécanique bien que celle-ci n'aie jamais été démontrée.

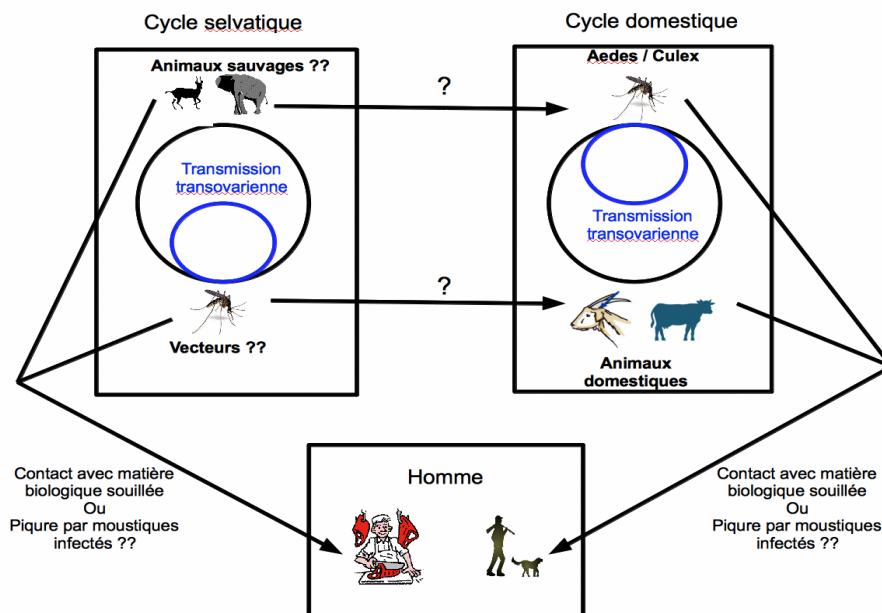


Figure 2: Cycle récapitulatif de la circulation du virus de la FVR (les points d'interrogation représentent les incertitudes sur ce cycle)

1.3.2. TRANSMISSION DIRECTE

La transmission peut aussi se faire de manière directe. En effet, quand les bovins, les ovins et les caprins présentent une forte virémie, et sont en grand nombres, ils peuvent jouer le rôle d'hôtes amplificateurs. Ces hôtes vont permettre la transmission directe d'un animal infecté à un animal sain grâce à la capacité du virus à se transmettre par des aérosols . La contamination se fait

par contact avec des animaux morts, des avortons ou tissus biologiques souillés (placenta) (Geering et al., 2003 ; AFSSA, 2008 ; Chevalier et al., 2008 ; Bird et al., 2009). De la même manière, l'homme peut se contaminer au contact d'un animal infecté via le sang, la viande fraîche, le lait... Les personnes les plus exposées à ce virus sont les professionnels de la filière de l'élevage, et en particulier ceux chargés de l'abattage et de la découpe de la viande.

I.4. IMPACT

I.4.1. ÉCONOMIQUE

Cette zoonose affecte les ovins, caprins, bovins, camélidés et animaux sauvages. L'impact de cette maladie va varier en fonction de l'espèce qui est touchée. Mais la symptomatologie va aussi être influencée par la virulence de la souche, la dose injectée (inoculum), l'immunité et la susceptibilité de l'hôte et sa prédisposition. Malgré ces différences entre les espèces la mortalité moyenne chez les adultes est d'environ 30 % et les taux d'avortement compris entre 80 et 100 % (James *et al.*, 1988). Chez les animaux sauvages, l'observation des signes cliniques est très difficile. Les animaux importés en Afrique sont en général plus sensibles que les races locales. Cependant certaines races indigènes sont aussi sévèrement atteintes par la FVR (Baldet *et al.*, 2005). Le taux d'avortement peut servir d'indicateur de présence de ce virus, même si chez les races locales les avortements restent rares (Geering *et al.*, 2003 ; Davies et Martin, 2008). Il est donc évident qu'avec une mortalité pouvant atteindre 100% chez les jeunes animaux et un taux d'avortement très important chez les bovins et les caprins, le VFVR représente un frein au développement de l'élevage. De plus, dans les pays en développement, cette zoonose peut réduire de manière significative les protéines animales disponibles pour les populations locales (James *et al.*, 1988). En plus des pertes directes qu'entraîne cette maladie, il est important de prendre en compte le coût indirect. En effet cette zoonose provoque des restrictions d'exportations, la nécessité de mettre en place des moyens de lutte coûteux. La mise en place de systèmes d'épidémiologie-surveillance efficaces nécessite aussi un investissement conséquent afin de suivre l'évolution de cette maladie.

I.4.2. SANITAIRE

Chez l'homme, la FVR prend une forme asymptomatique dans 50% des cas. Sinon, elle est responsable de symptômes grippaux (96-97% des malades) d'évolution bénigne après une semaine. Il existe néanmoins des formes sévères touchant des personnes à risque comme les enfants, les personnes âgées ou immuno-déprimées. Ces formes sont accompagnées de complications neurologiques (encéphalites), de syndromes oculaires et hépatiques graves. Le taux de mortalité est estimé à 1%, mais cela est non négligeable (594 décès en 1977 en Egypte) (Geering *et al.*, 2003 ; Gerdes, 2004 ; AFSSA, 2008 ; Chevalier *et al.*, 2008).

1.5. MESURES DE CONTRÔLE DE LA FVR

La détection de la FVR est possible grâce à la mise en place de systèmes de surveillance passive et active. Ces systèmes vont permettre de centraliser et d'analyser les informations qui leur parviennent afin de détecter au plus vite le déclenchement d'événements épizootiques ou épidémiques. Les informations qui sont collectées peuvent provenir de nombreuses sources: les professionnels de l'élevage, les médecins. Cette surveillance implique donc de former et d'informer les personnes à risques. Lors de suspicions, il est essentiel de confirmer rapidement qu'il s'agit bien du VFVR car il existe de nombreuses pathologies avec une expression clinique similaire (ex: maladie de Wesselsbron, fièvre catarrhale ovine, fièvre aphteuse...) (Geering *et al.*, 2003, Davies *et al.*, 2006). Chez l'homme, la FVR peut être confondue avec une méningite (AFSSA, 2008). La confirmation peut se faire grâce à l'isolement du virus (culture cellulaire) ou par l'emploi de méthodes moléculaires (RT-PCR ou sérologiques (détection IgM ou IgG).

Pour les animaux, le vaccin vivant atténué « Smithburn », peu coûteux à produire, peut être utilisé lors d'épizootie. Bien qu'assez efficace, ce vaccin ne peut cependant pas être utilisé sur les femelles gestantes, car il provoque des avortements et peut causer des effets neurologiques chez les jeunes animaux (Geering *et al.*, 2003 ; Gerdes, 2004; OIE, 2005 ; AFSSA, 2008 ; Bird *et al.*, 2009). Concernant l'homme, il existe un vaccin humain (virus inactivé) contre la FVR. Cependant sa fabrication est coûteuse et difficile et il est donc utilisé pour protéger les personnes à risque (Gerdes, 2004 ; OIE, 2005). D'autres vaccins candidats sont en cours d'élaboration (MP-12, Clone 13) (Geering *et al.*, 2003 ; Gerdes, 2004 ; OIE, 2005 ; AFSSA, 2008 ; Bird *et al.*, 2009).

1.6. CONDITIONS DE L'ÉMERGENCE DE LA FVR

L'épidémiologie complexe de la FVR et les échanges commerciaux internationaux en constante augmentation élèvent le risque de dissémination de la maladie (et d'autres arboviroses telles que la dengue, le chikungunya,...) dans toute l'Afrique et dans l'Océan Indien (Zeller, 1997 ; InVS, 2009). La capacité du virus à infecter de nombreux vecteurs et de nombreux hôtes lui permet de se propager facilement dans des pays indemnes (cas de la péninsule arabique). L'existence d'un cycle sauvage encore mal connu est aussi un frein à la compréhension de cette zoonose. La force de transmission de la FVR est basée sur des interactions complexes entre moustiques vecteurs, vertébrés non-humains et humains (Wilson, 1994). En effet, l'impact de la FVR va dépendre de nombreux facteurs: La densité des populations d'hôtes et de vecteurs compétents présents, les conditions climatiques et des conditions environnementales.

En Afrique orientale et australe les conditions climatiques influencent directement les épisodes épizootiques et/ou épidémiques. En effet c'est lors de pluies abondantes qu'il y a une augmentation des populations de moustiques. Dans ces conditions il peut y avoir une amplification virale importante. La périodicité de ces épisodes épizootiques et/ou épidémiques est donc influencée par de nombreux facteurs (Lithicum *et al.*, 1987, 1999). Des systèmes de prédictions basés sur l'étude

des variations de la température de surface des océans (FAO, 2008; AFSSA, 2008) et sur l'étude de la végétation (Lithicum *et al.*, 1999) permettent de prévoir de nombreux mois à l'avance le début d'épizooties et/ou épidémies (Anyamba *et al.*, 2009). Mais ces systèmes de prédictions ne sont pas adaptés à toutes les situations. En effet ces systèmes ont été mis en échec dans des zones où la circulation du virus reste inconnue. Les changements climatiques entraînent la modification de nombreux facteurs. Ces changements sont donc source d'inquiétude car ils ont une influence sur la répartition et la densité de populations des vecteurs et donc sur l'épidémiologie du virus. Mais d'autres facteurs comme le commerce du bétail sont à l'origine de l'introduction du virus dans des zones indemnes (cas de l'Egypte). L'anthropisation du milieu est aussi un facteur important à prendre en compte. Dans le cas du Sénégal la fermeture d'un barrage a offert aux moustiques de nouveaux gîtes et a en même temps modifié la densité des populations d'hôtes en modifiant les ressources accessibles (Ndione *et al.*, 2005). Les changements dans les modes d'élevage, avec par exemple la sédentarisation des populations d'éleveurs, l'importation de races européennes sensibles sont des facteurs qui influencent l'épidémiologie du virus (Wilson, 1994). La fréquence des épidémies risque donc d'augmenter dans les prochaines années (Wilson, 1994).

1.7. FVR EN AFRIQUE CENTRALE

Des études effectuées dans des pays d'Afrique Centrale comme la RCA montrent que le virus est parfois retrouvé chez des animaux et des vecteurs sauvages (Cordellier *et al.*, 1976, Evans *et al.*, 2007, Nakounne *et al.*, 2000). Une étude sérologique menée sur l'homme en milieu rural (Pourrut *et al.*, 2010) suggère une circulation importante du virus au Gabon. En effet, sur 212 villages surveillés, le taux de séroprévalence en IgG varie de 0 à 38 %. Ces résultats correspondent à des taux enregistrés durant des périodes d'inter-épidémie dans des pays où la FVR est endémique (LaBeaud *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 2002). Ces résultats laissent à penser que le VFVR circule au Gabon, mais les modalités de cette circulation sont encore inconnues. Le nombre d'animaux domestiques (ovins, caprins, bovins) étant presque nul, il est donc probable que le virus se maintienne grâce à un cycle sauvage forestier. Cette hypothèse est appuyée par l'isolement du VFVR chez des moustiques forestiers *Aedes (Neomelanimon) gr. palpalis* (Cordellier *et al.*, 1976) en RCA. Par ailleurs, dans ce même pays des traces sérologiques (IgG) chez des pygmées vivants dans des régions de ce pays où les animaux domestiques sont virtuellement absents ont été détectées (Nakounne *et al.*, 2000). La FVR étant souvent confondue avec le Paludisme, le nombre de cas déclarés est faible. Toutes ces informations montrent qu'il est essentiel d'étudier les modes de circulation du virus.

II. OBJECTIFS DU STAGE

Ce stage s'inscrit dans la caractérisation des modalités de circulation de la Fièvre de la vallée du Rift en Afrique Centrale, et notamment la caractérisation d'un cycle selvatique. L'objectif principal de ce stage, dont l'entrée est entomologique, est d'identifier des espèces de « candidats-vecteurs » de la Fièvre de la Vallée du Rift. Les captures qui sont réalisées vont également servir à identifier des vertébrés « candidats-réservoirs » de ce virus.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. SITE D'ÉTUDE

La république du Gabon est un pays au climat équatorial de 257 667 Km² avec une population totale estimée à environ 1 514 993 habitants (estimation 2009). Ce pays est divisé en 9 provinces, et regroupe une cinquantaine d'ethnies dont la principale est l'ethnie Fang. Situé de part et d'autre de l'équateur, le Gabon a une pluviométrie qui varie entre 1 000 à 2 500 mm/an. Il est couvert à 80 % de forêt. Ces conditions font que 190 espèces de mammifères et plus de 8000 espèces végétales se côtoient. L'exploitation des nombreuses ressources naturelles comme le bois, le pétrole et l'uranium génère un nombre d'emplois considérable. Au Gabon, aucune enquête entomologique n'a été menée. Le dernier inventaire taxonomique de Culicidae a été effectué par Service en 1976.

III.1.1.LIEUX ET DATES DE CAPTURES

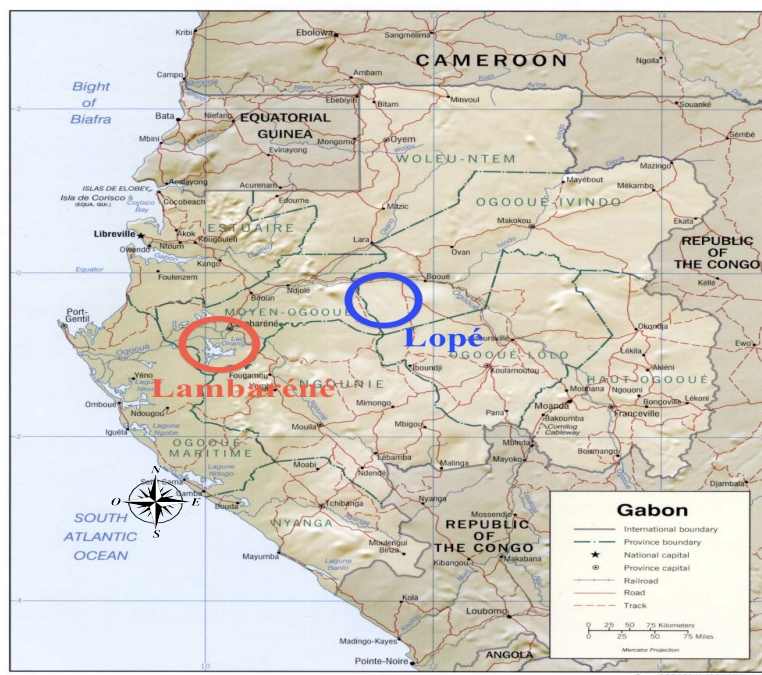


Figure 3: Carte du Gabon: avec la localisation des zones de capture (carte tirée du site: http://www.populationdata.net/images/cartes/afrique/afrique-sud-saharienne/gabon/gabon_relief)

III.1.1.1.LAMBARÉNÉ

La ville de Lambaréné est localisée dans la région des lacs (Province du Moyen Ogooué) (cercle rouge Figure 3). Cette région est composée de marécages et de lagunes forestières (Figure 4). C'est la région la plus humide du Gabon. Ce type d'environnement semble favorable au développement des moustiques et donc à la circulation du virus de la FVR. En effet Pourrut *et al.*, (2010) ont mis en évidence une prévalence d'IgG spécifique au VFVR dans ces zones des lacs (8,2%) supérieure a celle des zones forestières (2,9%). Cette zone constitue donc un site d'étude intéressante pour la recherche du virus chez les moustiques. Le site d'étude était situé au village de « Bordeaux » situé à 20 km de la ville de Lambaréné sur les rives de l'Ogooué et est accessible en pirogue. Différents sites ont été explorés : villages, et environnements lacustres proches (dans des campements de chasse et de pêche).

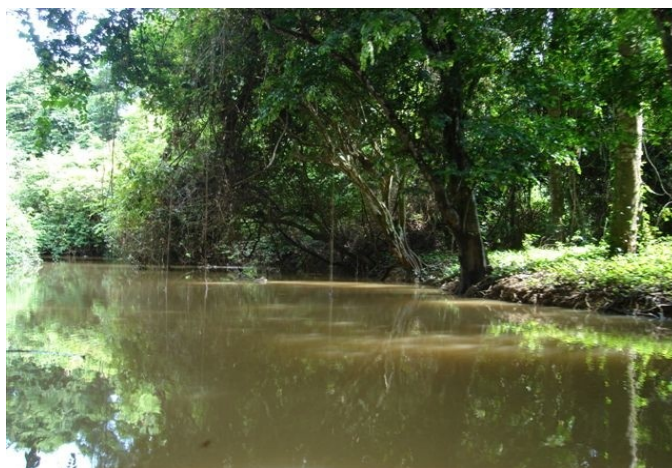


Figure 4: Photo illustrant le type d'environnement de Lambaréné

III.1.1.2. LOPÉ

Classé parc national en 2002 et déclaré patrimoine mondial de l'Unesco en 2007 (cercle bleu Figure 3), le parc national de la Lopé est caractérisé par une mosaïque de forêt et de savane (Figure 5) qui s'étend sur 497 000 hectares. Cette région peu peuplée présente un écosystème varié et représente un site d'intérêt pour l'étude du cycle selvatique de la Fièvre de la Vallée du Rift. En effet les forêts à marantacées du parc national de la Lopé ont la biomasse animale la plus élevée de toutes les forêts tropicales humides du monde. La zone d'étude est située aux alentours de la station CIRMF (SEGC) dans des environnements de savanes et forestiers.



Figure 5: Photo illustrant le type d'environnement de la Lopé

III.1.2.COLLECTE DES CULICIDAE

Pour cette étude deux méthodes de captures ont été utilisées : pièges lumineux CDC-UV, capture sur homme. A Lambaréné cette collecte à lieu du 11/02/2010 au 17/02/2010. A la Lopé deux campagnes de collectes ont été réalisées. La première du 26/03/2010 au 03/04/2010. La seconde du 26/05/2010 au 02/06/2010.

III.1.2.1.PIÈGE LUMINEUX (CDC)

En général plusieurs pièges sont placés durant la nuit entre 18h et 7h du lendemain. Le nombre de piège posé varie en fonction des conditions de terrain (entre 1 et 4). Ces pièges sont placés à environ 1m50 du sol et doivent être espacés d'au moins 30m les uns des autres pour éviter la concurrence. Il est aussi important de les installer dans un endroit dégagé afin qu'ils soient le plus visibles possible. Ils sont un moyen efficace et facilement normalisable de réaliser des captures. Ils permettent de capturer les moustiques nocturnes.



Figure 6: Photo d'un piège lumineux (CDC-UV)

III.1.2.2.CAPTURE SUR HOMME

La capture sur homme est réalisée pendant les heures d'alimentation des vecteurs (entre 17h et 21h). Ces captures sont réalisées durant deux heures et sont effectuées dans différents milieux. Elle consiste à laisser se poser les moustiques sur une partie définie du corps et à les récupérer à l'aide d'un aspirateur à bouche ou d'un tube.

III.1.3.IDENTIFICATION ET MISE EN LOT

Avant le tri, les moustiques capturés sont tués en les plaçant à -20°C pendant au moins 30 min. Ils sont ensuite triés sur plaque réfrigérante afin d'éviter la dégradation des virus recherchés. Les clés taxonomiques qui ont été utilisés sont:

- da Cunha Ramos, 1993
- Edwards, 1941
- Gillies et Coetzee, 1987
- Gillies et de Meillon, 1968
- Huang 1990
- Huang, 2004
- Ribeiro, 2005
- Service, 1990

Une fois le tri effectué, les moustiques sont regroupés en lots de 1 à 20 moustiques par sexe et par espèce (voire par genre pour les mâles). Ces lots sont ensuite transférés dans des cryotubes et conservés en azote liquide durant toute la période de récolte. Une fois de retour au CIRMF ces lots seront stockés dans un congélateur à -80°C. Chaque nouvelle espèce est montée, identifiée à l'aide des clés et intégrée dans la collection du CIRMF.

Toutes les femelles gorgées sont identifiées et stockées individuellement.

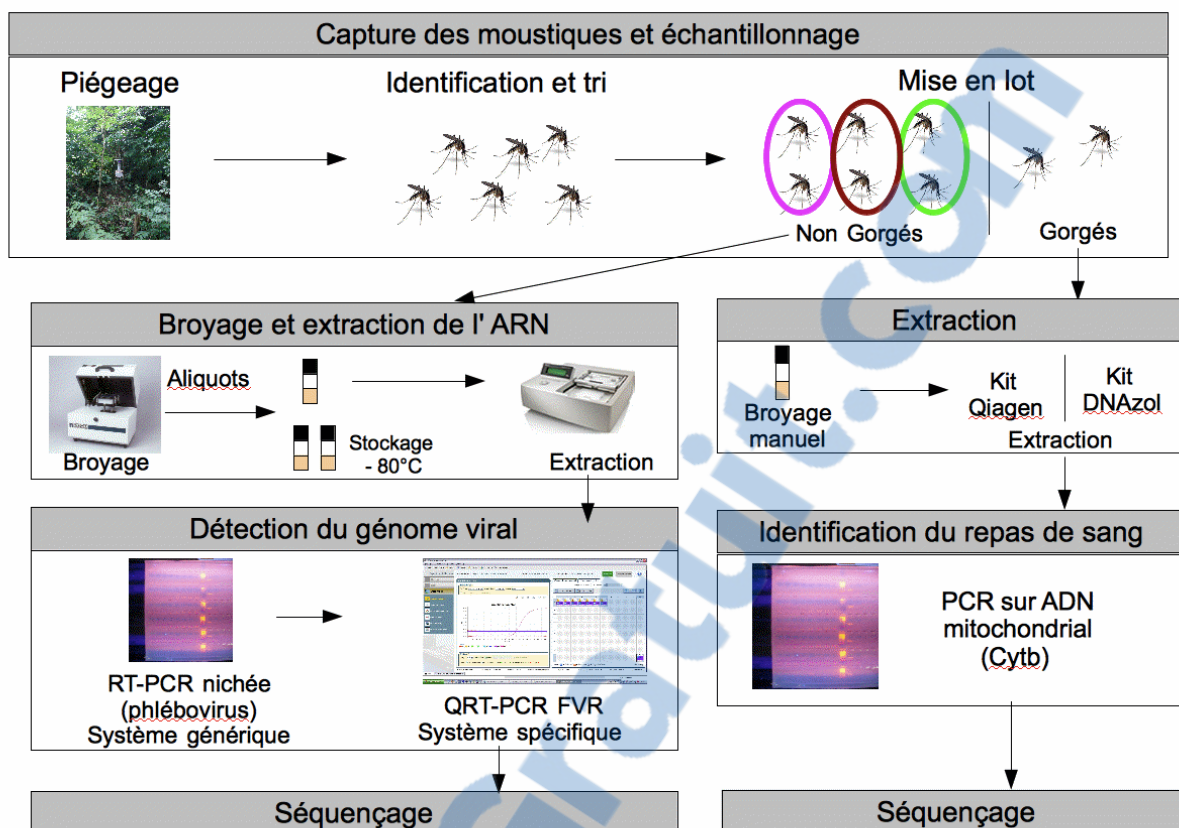


Figure 7: Schéma récapitulatif de la démarche analytique

III.2. ANALYSE

Toutes les manipulations décrites ci dessous ont lieu dans les laboratoires du CIRMF (Figure 7). Ce centre est doté d'une plateforme de virologie moléculaire permettant le criblage de virus sur des échantillons humains et animaux.

III.2.1. CRIBLAGE VIRAL

Il existe différentes techniques qui permettent de mettre en évidence la présence du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift chez un moustique. En effet ce virus peut être identifié par culture cellulaire ou par des techniques sérologiques et des techniques de biologie moléculaires. Comme les PCR (Polymerase Chain Reaction) qui ont été utilisées car c'est un moyen rapide, sensible et spécifique pour la détection des virus (Ibrahim *et al.*, 1997).

III.2.1.1. BROYAGE

Afin de réaliser ce broyage (annexe 1), chaque lot de moustiques est transféré dans un tube

de polycarbonate contenant une bille d'acier et un volume de PBS adapté (600µL minimum). Ces lots sont ensuite broyés pendant 2 min à 1500 coups/min à l'aide de l'agitateur Spex sample prep® Geno/Grinder 2000. Chaque broyat est divisé en 2 aliquotes de 200µL placés dans des cryotubes (le premier aliquote pour extraction, le deuxième est un tube conservé en thèque). Le volume restant dans les tubes de polycarbonate servira pour tenter d'isoler le virus en cas de détection d'ARN viral. Tous ces tubes ont ensuite stockés à -80°C.

III.2.1.2. EXTRACTION D'ARN

L'extraction de l'ARN se déroule en deux étapes (annexe 2). La première étape va permettre de réaliser une lyse cellulaire afin de libérer l'ensemble des ARN. Pour se faire du tampon de lyse (300 µl/puits) (2X Lysis Buffer), du PBS (250 µl/puits) et de la protéinase K (10 µl/puits), sont ajoutés au broyat, puis le mélange incubé pendant deux heures. Cette étape est suivie de l'étape d'extraction en plaque de 96 puits à l'aide d'un automate Abi Prism® 6100 Nucleic Acid Prepstation. Après une étape de filtration, une étape de purification et deux étapes de lavage, l'ARN fixé à la membrane est récupéré par élution. Les plaques d'extraits d'ARN sont ensuite conservées à -80°C.

III.2.1.3. PCR PAN-PHLEBO

Les échantillons sont en premier lieu criblés en utilisant un système d'amplification générique utilisant des amorces dégénérées permettant d'amplifier des fragments du génome de virus appartenant à la famille des phlebovirus (Moureau *et al.*, 2007; Sanchez-Seco *et al.*, 2003). Le protocole de la RT-PCR « Pan-Phlébo », validé au CIRMF, comprend deux étapes. La première consiste en une étape de rétro-transcription permettant de synthétiser les brins l'ADN complémentaires (ADNc). Ces brins d'ADNc vont servir de matrice pour l'amplification de la séquence cible, au moyen d'une PCR nichée. Un premier couple d'amorces dégénérées (NPhlebo 1+, NPhlebo 1-) permet l'amplification d'un fragment de 553 pb. Ce fragment sert de matrice pour l'amplification d'un second fragment interne de 244 pb à l'aide d'un second couple d'amorces. de Celle-ci va permettre d'amplifier un fragment interne de la séquence cible.

A) RT-PCR

Pour la RT-PCR le kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) est utilisé. Pour chaque réaction 45 µl de mélange réactionnel (= Mix, tableau 2) est réparti sur une plaque de 96 puits, auquel on ajoute 5 µl de produit d'extraction. La RT-PCR est ensuite réalisée suivant le cycle présenté en Figure 8.

Mix RT-PCR (RT-PCR OneStep non HIFI, Invitrogen)
Taille = 553pb

MIX	Volume (µl)/puit
Tampon 2X	25,0
Nphlebo 1+, 10 µM	4,0
NPhlebo 1-, 10 µM	4,0
BSA (1g/L)	1,0
RT + Taq Mix	1,0
H2O (pour BM)	10,0
ARN	5

Tableau 2: Préparation du mix pour RT-PCR

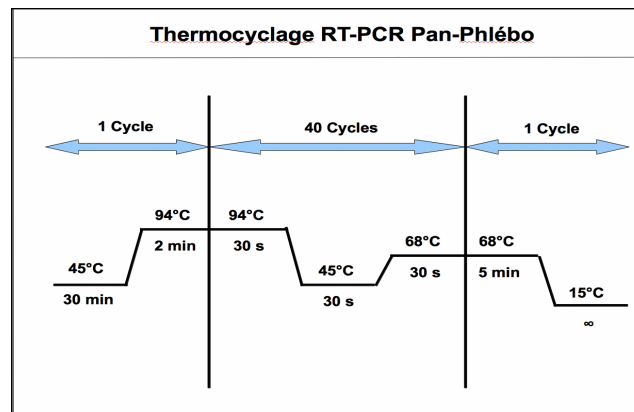


Figure 8: Présentation des cycles de la RT-PCR

B) PCR NICHÉE

La PCR nichée est réalisée à l'aide du le kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Comme précédemment un mix (Tableau 3) est utilisé pour amplifier les séquences internes issues des produits de la RT-PCR. Chaque réaction est composée de 49µl de mix et de 1µl du produit de RT-PCR (Figure 9).

Mix PCR Nichée (Taq Polymerase non HIFI, Invitrogen)
Taille = 244pb

MIX	Volume (µl)/puit
Tampon 10X	5,0
dNTPs, 10 mM	0,5
MgCl ₂ , 50mM	4,0
Nphlébo 2+, 10 µM	4,0
Nphlébo 2-, 10 µM	4,0
BSA (1g/L)	1,0
GoTaq DNA Polymerase, 5U/µL	0,5
H2O (pour BM)	30,0
RT-PCR	1,0

Tableau 3: Préparation du mix pour PCR nichée

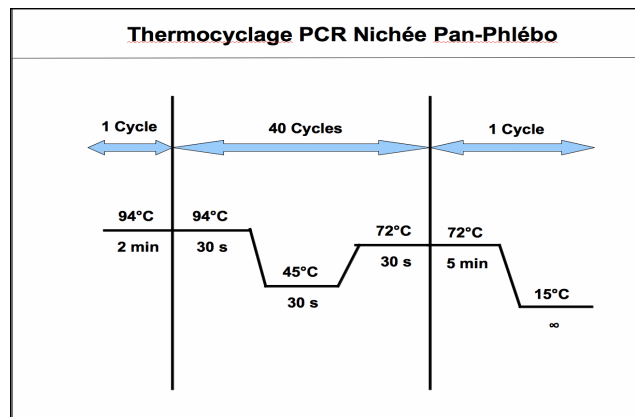


Figure 9: Présentation des cycles de la PCR nichée

III.2.1.4. MIGRATION ET RÉVÉLATION:

10µl de produits de la PCR nichée sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose 2%, contenant 0,05µL/mL de BET (Annexe 3). Le BET qui est un intercalant de l'ADN, permettant la visualisation de l'ADN sous lumière UV. Un marqueur de poids moléculaire spécifique (100pb) permet de déterminer la taille des produits amplifiés et de différencier les amplifications spécifiques des amplifications non-spécifiques.

III.2.1.5. PCR EN TEMPS RÉEL

Les lots qui présentent un amplicon de taille attendue en PCR Pan-Phlébo (244 pb) sont soumis à une PCR en temps réel (Q RT_PCR) spécifique du virus de la fièvre de la vallée du Rift. Comme précédemment, une première étape de synthèse de l'ADNc (reverse-transcription) utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) est suivie d'une étape d'amplification PCR à l'aide du kit Taqman universal PCR master mix (Applied Biosystem). La PCR en temps réel est réalisée à l'aide d'un thermocycleur 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem).

III.2.1.6. SÉQUENÇAGE

Les produits PCR d'intérêts sont envoyés en France pour séquençage. Pour pouvoir procéder à un séquençage des produits PCR non purifiés un volume minimal de 30µl à une concentration de 30 à 100ng/µl (varie en fonction de la taille de la PCR) est nécessaire. La concentration moyenne en ADN doit donc être préalablement évaluée par spectrophotométrie. Les produits PCR sont séquencés dans les deux sens. Après nettoyage des séquences et la réalisation des séquences consensus à l'aide du logiciel SEQSCAPE 2.5 (Applied Biosystem), les séquences sont comparées aux séquences des bases de données en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

III.2.2.IDENTIFICATION DES REPAS SANGUINS

Le protocole utilisé fait appel à l'amplification PCR et le séquençage d'un marqueur mitochondrial Cyt *b* (Townzen *et al.*, 2008).

III.2.2.1. EXTRACTION

Les abdomens des femelles gorgées ont été disséqués et transférés dans un tube eppendorf. Deux protocoles différents ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN des repas sanguins. Le premier est le protocole « Purification of total DNA from Animal Tissues » (Qiagen® DNA easy tissue kit). Le deuxième est le kit d'extraction de moustique unique DNAzol. Les extraits d'ADN ont ensuite été stockés à -20°C en attendant l'amplification PCR.

III.2.2.2. AMPLIFICATION, RÉVÉLATION

Seul un couple d'amorce a été testé pour le marqueur Cyt *b*. Ce système ayant préalablement été testé avec succès dans l'unité de URES. L'amplification PCR a été réalisée à l'aide du kit commercial Taq DNA polymerase (Invitrogen) selon les conditions présentées dans le Tableau 4 et la Figure 10. Elle a ensuite été vérifiée en déposant 10µL de PCR sur gel d'agarose 2% contenant du BET à 0,05µL/mL.

MIX PCR Cyt b	
Taille: 450 pb	
MIX	Volume (µl)/puits
Tp 10X KCL-MgCl	5,0
MgCl ₂ , 50mM	3,0
Cyt b sens 10 µM	1,0
Cyt b non sens 10 µM	1,0
dNTP 10 µM	1,0
Taq polymerase	0,3
H ₂ O	35,7
ADN	3,0

Tableau 4: Préparation du mix pour PCR Cyt b

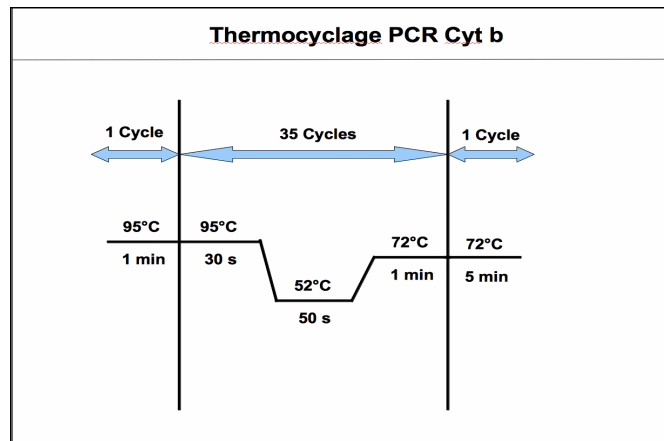


Figure 10: Présentation des cycles de la PCR Cyt b

III.2.2.3. SÉQUENÇAGE

Comme précédemment, les produits PCR des échantillons positifs ont été quantifiés puis expédiés en France pour être séquencés. Les séquences sont comparées aux séquences connues grâce au logiciel BLAST.

IV. RÉSULTATS

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 

IV.1. CAPTURES

Malgré toutes les précautions mises en œuvre lors des captures, du tri et de l'identification, un nombre non négligeable de moustiques est abîmé. Dans ce cas l'identification jusqu'à l'espèce est souvent difficile. Afin de pouvoir les utiliser pour le criblage viral, ces moustiques sont identifiés jusqu'au genre et placés dans un groupe nommé « genre sp. ».

Genre / espèce	Lambaréné				Lopé							
					Première campagne				Deuxième campagne			
	CDC	%	CSH	%	CDC	%	CSH	%	CDC	%	CSH	%
Aedeomyia	19	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ad. africana	19	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aedes	15	0,16	14	0,5	2	0,41	42	100	1	0,2	4	100
Ae. aegypti	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,2	0	0
Ae. fuscinervis	12	0,13	1	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
Ae. palpalis	2	0,02	13	0,46	0	0	0	0	0	0	0	0
Ae. sp	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ae. vittatus	0	0	0	0	2	0,41	42	100	0	0	4	100
Anopheles	1340	14,21	663	23,62	93	19,1	0	0	77	15,16	0	0
An. Coustani	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1,77	0	0
An. Gambiae	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,39	0	0
An. Marshalli	0	0	0	0	0	0	0	0	51	10,04	0	0
An. moucheti	725	7,69	295	10,51	0	0	0	0	0	0	0	0
An. Nili	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,98	0	0
An. obscurus	3	0,03	2	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
An. paludis	612	6,49	366	13,04	0	0	0	0	0	0	0	0
An. sp	0	0	0	0	73	14,99	0	0	0	0	0	0
An. theileri	0	0	0	0	14	2,87	0	0	10	1,97	0	0
An. ziemanni	0	0	0	0	6	1,23	0	0	0	0	0	0
Coquilletidia	49	0,52	1	0,04	5	1,03	0	0	4	0,79	0	0
Cq. annetti	12	0,13	1	0,04	0	0	0	0	4	0,79	0	0
Cq. aurites	9	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cq. fraseri	0	0	0	0	5	1,03	0	0	0	0	0	0
Cq. metallica	8	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cq. sp	20	0,21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Culex	3665	38,87	650	23,16	323	66,32	0	0	226	44,49	0	0
Cx. andreas	19	0,2	1	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. decens grp	0	0	0	0	16	3,29	0	0	0	0	0	0
Cx. gaillardi	0	0	0	0	3	0,62	0	0	0	0	0	0
Cx. ingrami	0	0	0	0	2	0,41	0	0	0	0	0	0
Cx. invidiosus/quasiguarti	0	0	0	0	237	48,67	0	0	141	27,76	0	0
Cx. moucheti	12	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. neavei	131	1,39	46	1,64	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. perfuscus	0	0	54	1,92	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. poicilipes	86	0,91	58	2,07	0	0	0	0	16	3,15	0	0
Cx. pruina	0	0	0	0	26	5,34	0	0	0	0	0	0
Cx. rima	702	7,45	3	0,11	13	2,67	0	0	69	13,58	0	0
Cx. simpsoni	2705	28,69	488	17,39	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. sp	10	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. toroensis /astridianus	0	0	0	0	26	5,34	0	0	0	0	0	0
Eretmapodides	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,39	0	0
Eretmapodides sp	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,39	0	0
Ficalbia	566	6	0	0	0	0	0	0	3	0,59	0	0
Fi. circumtestacea	229	2,43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fi. nigra	16	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fi. sp	321	3,4	0	0	0	0	0	0	3	0,59	0	0
Mansonia	1076	11,41	1479	52,69	0	0	0	0	0	0	0	0
Ma. uniformis/africana	1076	11,41	1479	52,69	0	0	0	0	0	0	0	0
Mimomyia	153	1,62	0	0	11	2,26	0	0	61	12,01	0	0
Mi. hispida	0	0	0	0	4	0,82	0	0	0	0	0	0
Mi. mediolineata	6	0,06	0	0	5	1,03	0	0	0	0	0	0
Mi. mimomyiaformis	17	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mi. plumosa	99	1,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mi. Sp	31	0,33	0	0	2	0,41	0	0	61	12,01	0	0
Uranotaenia	2546	27	0	0	53	10,88	0	0	136	26,77	0	0
Ur. alboabdominalis	669	7,1	0	0	2	0,41	0	0	3	0,59	0	0
Ur. apicotaeniata	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1,77	0	0
Ur. caerulocephala	34	0,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ur. caliginosa	33	0,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ur. mayeri	38	0,4	0	0	26	5,34	0	0	53	10,43	0	0
Ur. nigripes	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1,18	0	0
Ur. nigromaculata	33	0,35	0	0	23	4,72	0	0	65	12,8	0	0
Ur. nivipous	0	0	0	0	2	0,41	0	0	0	0	0	0
Ur. sp	1739	18,44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	9429	100	2807	100	487	100	42	100	508	100	4	100

Tableau 5: Tableau récapitulatif du nombre de moustiques femelles capturées par site et par type de pièges utilisés pour le criblage viral. (les cases bleues représentent les totaux; les pourcentages sont calculés pour chaque type de piège sur chaque site)

Genre / espèce	Lambaréné				Lopé							
					Première campagne				Deuxième campagne			
	CDC	%	CSH	%	CDC	%	CSH	%	CDC	%	CSH	%
Anopheles	41	4,38	0	0	0	0	0	0	11	11,7	0	0
An. moucheti	1	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
An. paludis	40	19,14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
an sp	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11,7	0	0
Coquilletidia	14	1,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cq. annetti	5	0,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cq. metallica	1	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cq. spp	8	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Culex	722	77,05	0	0	0	0	0	0	57	60,64	0	0
Cx. rima	1	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cx. sp	721	76,95	0	0	0	0	0	0	57	60,64	0	0
Ficalbia	1	0,11	0	0	0	0	0	0	1	1,06	0	0
Fi. nigra	1	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fi. sp	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,06	0	0
Mansonia	2	0,21	3	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Ma. uniformis/africana	2	0,96	3	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Mimomyia	1	0,11	0	0	0	0	0	0	12	17,02	0	0
Mi. Sp	1	0,48	0	0	0	0	0	0	12	17,02	0	0
Uranotaenia	156	16,65	0	0	0	0	0	0	9	9,57	0	0
Ur. sp	156	74,64	0	0	0	0	0	0	9	9,57	0	0
Total	937	100	3	100	0	0	0	0	94	100	0	0

Tableau 6: Tableau récapitulatif du nombre de moustiques mâles capturés par site et par type de pièges utilisés pour le criblage viral. (les cases bleues représentent les totaux; les pourcentages sont calculés pour chaque type de piège sur chaque site)

Les collectes ont permis de recenser 47 espèces de moustiques appartenant à 10 genres (*Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culex*, *Eretmapodites*, *Ficalbia*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Uranotaenia*; Tableau 5 et Tableau 6) et 14311 spécimens (13277 femelles, 1034 mâles). Tous ont fait l'objet du le criblage viral.

IV.1.1. LAMBARÉNÉ

Les deux modes de piégeage, ont permis la collecte d'un total de 13 176 moustiques sur le site de Lambaréné.

Les pièges lumineux (CDC) ont permis de récolter 10366 moustiques appartenant à 26 espèces différentes. Le genre le plus représenté est le genre *Culex* et l'espèce la plus abondante est *Culex simpsoni* (26% du nombre total de moustiques collectés par les pièges CDC sur Lambaréné). Le nombre de femelle récolté est dix fois supérieur au nombre de mâle.

Les Captures sur Homme (CSH) ont permis de collecter 2810 moustiques. Avec cette technique, c'est l'espèce *Mansonia uniformis/africana* qui est la plus représentée (1482 individus).

IV.1.2. LA LOPE

Lors de la première campagne de capture, les pièges lumineux ont permis de recueillir 487 femelles appartenant à 6 genres et à 16 espèces différentes. Aucun mâle n'a été capturé par cette technique. L'espèce la plus abondante est *Cx. invidiosus/quasiguarti* (48,67%).

Les captures sur homme n'ont permis de capturer que 42 moustiques appartenant tous à la même

espèce (*Aedes vittatus*). Ces captures n'avaient pas pour objectif de récolter un grand nombre de moustiques, mais d'élargir le panel d'espèces récoltées pour en faire l'inventaire.

Lors de la deuxième campagne, les pièges lumineux ont permis de récolter 602 moustiques (94 mâles et 508 femelles). Quatorze espèces différentes ont été capturées. En comparaison avec la première campagne de captures, des spécimens du genre *Eretmapodites* ont pu être collectés. Comme lors de la première session, c'est l'espèce *Cx. invidiosus/quasiguarti* qui a été la plus fréquemment collectée (23,42%). Les captures sur Homme n'ont permis de capturer que 4 moustiques appartenant tous à la même espèce (*Aedes vittatus*).

Les rendements de captures se sont avérés nettement supérieurs à Lambaréné qu'à la Lopé, traduisant une plus forte densité de culicidés dans ce premier site.

Lambaréné		Lopé	
Genre / espèce	Nombre d'individus	Genre / espèce	Nombre d'individus
Anopheles	1	Culex	4
An. paludis	1	Cx. decens grp	2
Culex	31	Cx. gaillardi	2
Cx. rima	29	Uranotaenia	1
Cx. simpsoni	2	Ur. mayeri	1
Ficalbia	7	total	5
Fl. circumtestacea	6		
Fl. nigra	1		
Mimomyia	1		
Mi. plumosa	1		
Uranotaenia	30		
Ur. alboabdominalis	17		
Ur. calignosa	1		
Ur. mayeri	1		
Ur. nigromaculata	3		
Ur. sp	8		
total	70		

Tableau 7: Tableau récapitulatif du nombre de femelles gorgées capturées par site, utilisées pour l'identification des repas sanguins

Parmi les femelles collectées, 75 étaient gorgées de sang (tableau 7). Ces moustiques appartiennent à 5 genres différents et à 13 espèces.

IV.2. CRIBLAGE VIRAL ET IDENTIFICATION DES REPAS SANGUINS

IV.2.1. CRIBLAGE VIRAL

IV.2.1.1. RT-PCR PAN-PHLÉBO

Un total de 771 lots de moustiques provenant des sites de Lambaréné et de La Lopé ont été testés par PCR pan-phlébo.. Un seul lot composé de 34 femelles de *Cx. Simpsoni* collectées en

capture sur homme aux alentours du village de Bordeaux a donné une amplification positive.

IV.2.1.2. QRT-PCR

L'analyse avec le système spécifique VRVF en QRT-PCR, a montré que l'amplicon généré pour le lot 18a avec le système générique ne correspondait pas au virus de la fièvre de la vallée du Rift (Figure 11).

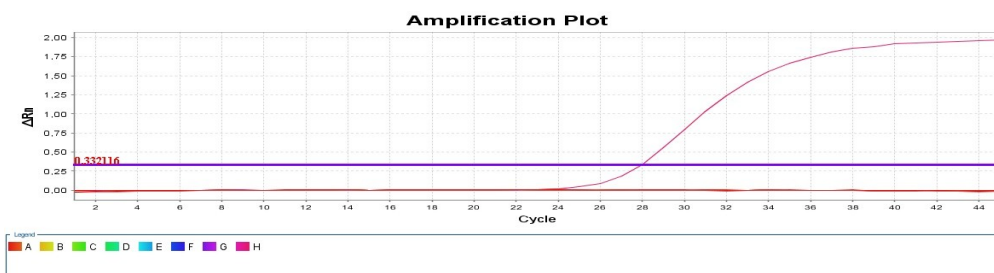


Figure 11: Résultat de la PCR en temps réel. Seul le témoin positif est amplifié

IV.2.1.3. SÉQUENÇAGE

Le séquençage du lot 18a a permis d'obtenir une séquence nucléotidique consensus de 248 pb. L'analyse de comparaison de séquences sous BLAST a permis de confirmer que cette séquence ne correspondait pas au virus de la Fièvre de la Vallée du Rift. L'analyse a révélé qu'une portion de cette séquence (39%) présentait 74 % d'homologie avec deux séquences virales appartenant à deux virus du genre Phlebovirus circulant en Europe: arbia (DQ862467.1) et toscana (EF656363.1). Compte-tenu de la localisation géographique de notre échantillon et du faible pourcentage d'homologie, on peut exclure que notre séquence corresponde à l'un de ces deux virus. En revanche, il est possible que la séquence corresponde à un virus proche encore inconnu. Des études ultérieures basées sur l'isolement du virus, et sa caractérisation (notamment moléculaire) seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

IV.2.2. REPAS SANGUIN

Lots	Espèces
G2-3	Cx. rima
G2-4	Cx. rima
G2-5	Cx. rima
G2-6	Cx. rima
G2-7	Cx. rima
G2-12	Cx. rima
G3	Ur. alboabdominalis
G3-2	Ur. alboabdominalis
G3-3	Ur. alboabdominalis
G3-9	Ur. alboabdominalis
G4	Ur. mayeri
G5	Ur. nigromaculata
G10-5	Ur. sp
G11	Cx. rima
G11-2	Cx. rima
G11-3	Cx. rima
G11-4	Cx. rima
G15	Ur. sp
G18-3	Cx. rima
G20	Cx. rima
G21-2	Ur. alboabdominalis
G21-7	Ur. alboabdominalis
G23	Ur. alboabdominalis
G25	Fi. circumtestacea

Tableau 8: Liste des lots des moustiques gorgés ayant été amplifiés

Sur les 75 moustiques gorgés analysés 24 amplifications ont pu être obtenues (Tableau 8). Ces moustiques appartiennent à 3 genres différents (*Culex*, *Ficalbia* et *Uranotenia*) et à 5 espèces. Trante μ L des produits PCR non purifiés ont fait l'objet d'un séquençage.

IV.2.2.1. SÉQUENÇAGE

Le séquençage des 24 produits de PCR n'a permis d'isoler que deux séquences appartenant à des vertébrés. Dans ces deux cas, les séquences présentent une forte homologie avec des séquences humaines (Tableau 9). Concernant les 22 autres séquences, 7 se sont révélées non interprétables (mélanges de séquences) et 15 correspondaient à des séquences de moustiques.

Lots	Espèce	Nom	Description	Taille séquence	% de correspondance
G 11-2	Cx. Rima	HM185221	Homo sapiens isolate C19 mitochondrion	451 pb	98,40%
G 11-4	Cx. Rima	HM185261	Homo sapiens isolate ETH84 mitochondrion	449 pb	98,90%

Tableau 9: Correspondance des séquences des vertébrés

V. DISCUSSION

V.1. MÉTHODES DE CAPTURES

Cette étude a en premier lieu permis de réaliser un inventaire des Culicidae au Gabon. Elle a permis de recenser 47 espèces appartenant à 10 genres. Seulement, cinq genres afro-tropicaux n'ont pas été retrouvés sur nos deux sites : Culiseta, Hogdesia, Lutzia, Malaya et Orthopodomyia (Gaillard, 1932 ; Grjebine, 1957 ; Mouchet, 1971 ; Service, 1976).

Les résultats des captures mettent en évidence des différences qualitatives et quantitatives entre les deux milieux explorés. A Lambaréné, les conditions climatiques (forte pluviométrie) et environnementales (réseaux de lacs connectés avec le Fleuve Ogoué) sont très favorables aux cycles de développement d'un grand nombre d'espèces de moustiques et ce pendant une très grande partie de l'année. Au contraire, notre site d'étude à La Lopé correspond à un environnement de mosaïque forêt-savane avec l'existence de deux saisons des pluies très marquées (avril-mai et octobre-novembre). De ce fait la diversité et l'abondance des moustiques y est logiquement plus faible en comparaison avec Lambaréné. Il faut par ailleurs noter une différence majeure dans les systèmes de piégeage puisqu'à Lambaréné les pièges lumineux ont systématiquement été additionnés d'une source de CO₂ (carboglance) alors que cela n'a pas été le cas à La Lopé à cause des conditions de terrain. Il est probable que cette différence ait pu affecter les rendements de capture à la Lopé. Il serait intéressant de tester les pièges lumineux additionnés de CO₂ (en s'affranchissant de la carboglance) à la Lopé. Il existe aussi des attractifs hormonaux qui libèrent des hormones appartenant aux hôtes des insectes hématophages dont les moustiques. Ce type d'attractifs semble être plus adapté aux conditions difficiles de terrain et pourraient permettre de mieux cibler les espèces capturées.

La plus grande partie des collectes a été effectuée à l'aide de pièges lumineux. Bien que ces pièges aient été utilisés avec succès à de multiples reprises, ils sont peu spécifiques et attirent de ce fait un grand nombre d'insectes, notamment en forêt. L'une des conséquences est que les moustiques s'abiment très vite, rendant la détermination taxonomique assez délicate. Par ailleurs, le tri des nasses devient beaucoup plus lourd et long ce qui peut avoir pour conséquence la dégradation des virus portés par les moustiques capturés. Par ailleurs ces pièges nécessitent une alimentation par des batteries dont la recharge nécessite un accès à une source électrique suffisante, ce qui n'est pas toujours le cas dans des endroits isolés comme à la station SEGC dans la Lopé.

Les captures sur homme, permettent quant à elles une bonne conservation des moustiques collectés et de ce fait une détermination taxonomique assez précise. Cependant cette technique ne cible que les moustiques anthropophiles et n'est donc pas forcément la plus adaptée pour des études en milieu sylvestre et pour l'étude de cycle sauvage de virus comme le VFVR. Par ailleurs et pour des conditions de sécurité, la mise en œuvre de cette technique dans des forêts est rendue complexe du fait de la présence d'une importante faune sauvage (éléphants, buffles...). Une alternative, serait de faire des captures en utilisant des animaux sauvages ou domestiques comme appât. Ces

méthodes de captures ont déjà été utilisées dans d'autres études avec succès, notamment pour l'étude de la transmission du VFVR. Cependant ce type de capture n'est pas envisageable dans tous les milieux, et pas dans les parcs nationaux (cas de La Lopé) où il est interdit d'introduire des animaux domestiques et où les animaux sauvages sont protégés. Les méthodes de captures utilisées pendant l'étude ont privilégié la collecte de moustiques nocturnes. Le nombre d'*Aedes* recoltés, notamment du sous-genres *Stegomyia*, *Aedimorphus*, *Neomelaniconion* (les deux derniers sous-genre intéressant particulièrement la transmission du VFVR) s'est avéré très faible malgré leur présence sur les sites. Ces moustiques ont des mœurs essentiellement diurnes, aussi les pièges lumineux semblent inadaptés pour leur échantillonnage. Pour atteindre ces espèces, les études ultérieures devront nécessairement diversifier les méthodes de captures. Le fauchage et la capture au filet n'ayant pas donné de résultats satisfaisants. Cependant, la grande diversité d'espèces collectées sur nos sites au Gabon nous incite à poursuivre ce travail d'inventaire en diversifiant les saisons de collectes et en incluant de nouveaux sites. La connaissance du milieu est aussi un facteur important. En effet, les écogardes nous ont permis de cibler avec précision les sites dont les écosystèmes sont favorables au développement des vecteurs et ainsi d'augmenter le rendement des pièges. La liste des espèces enregistrées dans le pays devrait ainsi considérablement s'allonger et de nouveaux vecteurs pourraient être identifiés.

V.2. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRES

V.2.1. CRIBLAGE VIRAL

L'analyse en système spécifique a permis d'exclure le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift. Le criblage viral par PCR non spécifique et spécifique sont des méthodes qui ont fait leur preuve. Mais certaines étapes nécessitent de manipuler avec d'extrêmes précautions. En effet lors du broyage et de l'extraction le virus peut encore être dégradé. Il est donc essentiel de manipuler dans les meilleurs conditions possibles (salle frigorifique, manipulation sur glace), mais aussi de manipuler le plus vite possible. Malgré l'absence de détection du virus, l'amplification d'un Phlebovirus d'un lot de *Cx. simpsoni* virus démontre l'efficacité et la pertinence du protocole mis en place à la fois pour la recherche spécifique de virus mais aussi pour le criblage de nouveaux virus. Il est important de noter que la concentration du VFVR chez les moustiques est faible. De plus, la formation de lot pour la recherche virale diminue encore la concentration du virus. Ainsi, la concentration du virus dans les lots risque d'être en dessous du seuil de détection de la méthode employée. L'utilisation de systèmes d'extraction de l'ARN viral plus performants devrait augmenter la sensibilité de la technique. Par ailleurs, il est important de noter que même durant les épisodes épidémiques et épizootiques, seul un faible pourcentage des moustiques collectés est retrouvé porteur du virus. Au Gabon, malgré les études préliminaires qui soutiennent l'idée d'une circulation active du VRVF, les phénomènes épidémiques et épizootiques sont rares où très peu caractérisés. Un meilleur niveau de surveillance de cette virose chez l'homme, les animaux domestiques et sauvages, pourrait permettre d'identifier des sites et des périodes propices aux investigations entomologiques et à l'étude du portage viral par les moustiques vecteurs.

V.2.2. IDENTIFICATION DES REPAS SANGUINS

L'identification des deux séquences humaines permet de confirmer que le protocole fonctionne. Ce protocole a par ailleurs été utilisé avec succès dans une autre étude menée récemment au Gabon.

Mais l'analyse des premiers échantillons des repas de sang, montre que les amorces Cytb ont amplifié de l'ADN de moustiques alors que ces amorces ne devaient amplifier que de l'ADN mitochondrial d'hôtes vertébrés (Townzen *et al.*, 2009). Le protocole doit donc être revu, l'utilisation de nouvelles amorces plus spécifiques permettrait d'identifier avec plus de précision les hôtes intervenant dans la circulation du VFVR. En effet les problèmes de co-amplification risquent de limiter l'utilisation pratique de cette technique en empêchant l'interprétation des séquences. Les séquences obtenues sont en général très proches de celles qui sont fournies dans les bases de données mais la majorité du temps ces séquences ne sont pas 100% identiques. Il est donc important de prendre cela en compte lors de l'interprétation des résultats, car certaines espèces ont des séquences presque similaires (Townzen *et al.*, 2009). Il est donc essentiel de fixer un seuil de similitude des séquences voir Townzen *et al.*, (2009). Dans le cas où plusieurs résultats sont possibles nous pouvons nous aider de la répartition géographique des espèces que nous aurons trouvées.

Cette technique nécessite si elle est validée, présente un véritable intérêt dans l'étude des arboviroses, de leurs vecteurs et de leur réservoir animal. Elle a par exemple été utilisée aux Etats-Unis pour la surveillance du virus west-nile chez les pélicans blancs (Jonhson *et al.*, 2010).

VI. CONCLUSION

Les outils de biologie moléculaire utilisés pour le criblage des virus et l'identification des repas de sang ont pu être testés et en partie validés chez les moustiques à partir des collectes réalisées. Le séquençage et la comparaison des séquences n'a pas permis d'identifier des vecteurs porteurs de la Fièvre de la Vallée du Rift ni d'identifier des « candidats-réservoir » de ce virus.

Les maladies émergentes comme la FVR peuvent avoir un effet majeur en santé publique humaine et animale. Les principaux facteurs d'émergence sont nombreux: une exploitation des ressources forestière non contrôlée, une augmentation du commerce de la viande de brousse et un développement agricole agressif. La mise en place de système de surveillance de ces maladies émergentes au sein de pays comme le Gabon est donc essentielle (Chomel *et al.*, 2007). Cette surveillance ne devra pas se limiter aux zones exploitées par l'homme, mais devra aussi se faire sur la faune sauvage (animaux et vecteurs). Le Gabon possède une grande diversité d'environnements (lacs, forêts, savanes) où siègent probablement un grand nombre de cycles d'arbovirus. L'anthropisation progressive du milieu étant un facteur important d'émergence de maladies infectieuses. L'étude des maladies par l'intermédiaire de leurs vecteurs constitue une stratégie de

choix pour la surveillance de ces virus. En plus d'identifier les vecteurs intervenant dans le cycle de transmission du virus, cette approche peut apporter des informations sur les hôtes intervenant dans le cycle.

BIBLIOGRAPHIE

AFSSA, 2008. Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments sur le risque de propagation de la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) dans un département et une collectivité départementale français de l'Océan Indien (la Réunion et Mayotte). 156 p.

Anyamba A., Chretien J.P., Small J., Tucker J.C., Formenty P.B., Richardson J.H., Britch S.C., Schnabel D.C., Erickson R.L and Linthicum K.J., 2009. Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (3) : 955-959 p.

Bird B.H., Ksiazek T.G., Nichol S.T. and Maclachlan N.J., 2009. Rift Valley fever virus. *Vet Med Today: zoonosis update*, 234 (7): 883-893 p.

Baldet T., Davies G., Kemp A., Martin V., Paweska J., Swanepoel R., Thlongane Y., Algers B., Blokhuis H. J., Broom D. M., Capua L., Cinotti S., Gunn M., Hartung J., Have P., Vilanova X. M., Morton D. B., Pépin M., Pfeiffer D. U., Roberts R. J., Vizcaino J. M. S., Schudel A., Sharp J. M., Theodoropoulos G., Vannier P., Verga M., Wierup M., Wooldridge M., 2005. The risk of a Rift Valley fever incursion and its persistence within the Community. *The EFSA Journal*: 238, 1-128.

Cêtre-Sossah C., Albina E., 2009. Fièvre de la Vallée du Rift : Aspects vétérinaires et impacts sur la santé humaine. *Med Trop*, 69: 358-361.

Chevalier V., La Rocque (de) S., Baldet T., Vial L. and Roger F., 2004. Epidemiological processes involved in the emergence of vector-borne diseases : West-Nile fever, Rift Valley fever, Japanese encephalitis and Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Off. Int. Epiz.*, 23 (2) : 535-555.

Chevalier V., Lancelot R., Thiongane Y., Sall B., Diaité A., et Mondet B., 2005. Rift Valley Fever in Small Ruminants, Senegal, 2003. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 11, No. 11: 1693-1700 p.

Chevalier V., Martin V., La Rocque (de) S. and Roger F., 2008. Combating and predicting Rift Valley fever outbreaks: a scientific and political challenge for the future. *Emerging Infectious*, 8: 189-212 p.

Chomel B.B., Belotto B., Meslin F.X., 2007. Wildlife, exotic pets and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis*, 13(1): 6-11 p.

Cordellier R., Geoffroy B., 1976. Les moustiques de République Centrafricaine: Distribution, abondance et fréquence des Culicidés dans l'ouest du pays. Les arbovirus isolés. *Travaux et documents de l'ORSTOM* 49: 105 p.

Coz J., Hamon J., Vervent G. et Sales S., 1971. Contribution à l'étude du piège lumineux "C.D.C miniature light trap" comme moyen d'échantillonnage des populations anophéliennes dans le Sud-Ouest de la Haute-Volta. *Calt. Orstom, ser. Ent. Méd. Parasitol.*, IX, 4: 417-430 p.

Davies F. G., Martin V., 2006. Recognizing Rift Valley Fever. *Veterinaria Italiana*, 42 (1), 31-53 p.

Easterday B.C., Mc GM, Rooney JR, Murphy L.C., 1962. The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs. *Am J Vet Res* 23: 470-479 p.

- Evans A., Gakuya F., Paweska J.T., Rostal M., Akoolo L., Vanvuren P.J., Manyibe T., Macharia J.M., Ksiazek T.G., Feikin D.R., Breiman R.F. and Kariuki Njenga M., 2007. Prevalence of antibodies against Rift Valley fever virus in Kenyan wildlife. *Epidemiology and Infection*, 1-9 p.
- FAO, 2008. Rift Valley fever outbreaks in Madagascar and potential risks to neighbouring countries. EMPRES WATCH, April 2008 : 4.
- Flick R., Bouloy M., 2005. Rift Valley fever virus. *Curr Mol Med* 5: 827-834 p.
- Fontenille D., Traore-Lamizana M., Diallo M., Thonnon J., Digoutte J.P. and Zeller H.G., 1998. New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 4 (2): 289-293 p.
- Gaillard H, 1932. Culicidés du Gabon III. Anophélinés. *Ann Parasitol Hum Comp*, 10 (1): 83-93 p.
- Geering W.A., Davies F.G. et Martin V., 2003. Préparation des plans d'intervention contre la fièvre de la Vallée du Rift. Manuel FAO de santé animale n°15 ; 77 p.
- Gerdes G.H., 2004. Rift Valley fever. *Off. Int. Epiz.* 23 (2) : 613-623 p.
- Grjebine A, 1957. Données récentes sur les Culicidés d'Afrique équatoriale française 1. Culicinés. *Ann Parasitol Hum Comp*, 32 (3): 331-341 p.
- Holland J and Domingo E, 1998. Origin and evolution of viruses. *Virus Genes*, 16 (1): 13-21
- Archie C.A., Clements a,b,* , Dirk U. Pfeiffer a, Vincent Martin c, M. Joachim Otte d, 2007. A Rift Valley fever atlas for Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, 82: 72-82 p.
- Ibrahim M. S., Turell M. J., Knauert F. K. and Lofts R. S., 1997. Detection of Rift Valley fever virus in mosquitoes by RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes* 11: 49-53 p.
- InVS, 2009. Emergence chez l'homme de la fièvre de la Vallée du Rift à Mayotte, 2007-2008. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, n°4 :33-36 p.
- James M., Bailey M., Bailey C. L., 1988. RIFT VALLEY FEVER. In Monath TP, ed. /The arboviruses/: /epidemiology and ecology/ volume IV, pp. 51-76. Boca Raton: CRC Press.
- Johnson G, Nemeth N, Hale K, Lindsey N, Panella N, Komar N, 2010. Surveillance for West Nile virus in American white pelicans, Montana, USA, 2006-2007. *Emerg Infect Dis*, 16(3): 406-411 p.
- Leroy E. M., Nkoghe D., Ollomo B., Nze-Nkogue C., Becquart P., Grard G., Pourrut X., Charrel R., Moureau G., Ndjoyi-Mbiguino A., and De Lamballerie X., 2009. Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 15, No. 4: 591-593 p.
- LaBeaud AD, Ochiai Y, Peters CJ, Muchiri EM, King CH (2007) Spectrum of Rift Valley fever virus transmission in Kenya: insights from three distinct regions. *Am J Trop Med Hyg* 76: 795-800 p.
- Linthicum K.J., Bailey C.L., Davies F.G. and Tucker C.J. 1987. Detection of Rift Valley fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery. *Science*, 235: 1656-1659 p.

- Linthicum K.J. Anyamba A. Tucker C.J., Keller P.W., Myers M.F. and Peters C.J. 1999. Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science*, 285: 397-400 p.
- Mouchet J, 1971. Survey of potentiel yellow fever vectors in Gabon and Chad. Monogr Ser World Health Organ, WHO/VBC/71.279 10 p.
- Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G and de Lamballerie X, 2007. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7 (4): 467-477 p.
- Nakounne E, Selekon B, Morvan J., 2000. Microbiological surveillance: viral hemorrhagic fever in Central African Republic: current serological data in man. *Bull Soc Pathol Exot* 93: 340-347 p.
- Ndione J.-A., Bicout D.J., Mondet B., Lancelot R., Sabatier P., Lacaux J.-P., Ndiaye M. et Diop C. 2005. Conditions environnementales associées à l'émergence de la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) dans le delta du fleuve Sénégal en 1987. *Environnement, Risques et Santé*, 4 : 10005-10010 p.
- OIE, 2005. Fièvre de la Vallée du Rift. Manuel terrestre de l'OIE. 208-219 p.
- Pourrut X., Nkoghé D., Souris M., Paupy C., Paweska J., Padilla C., Moussavou G., Leroy E.M., 2010. Rift Valley fever virus seroprevalence in human rural populations of Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. Jul 27;4(7):e763 p.
- Sanchez-Seco M. P., Echevarria J. M., Hernandez L., Estevez D., Navarro-Mari J. M., Tenorio A., 2003. *Journal of Medical Virology* 71: 140-149 p.
- Service M, 1976. Contribution to the knowledge of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Gabon. *Cah Orstom (Ent. méd. et Parasitol.)*, 14 (3): 259-263 p.
- Townzen J. S., Brower A. V. Z. and Judd D. D., 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 22: 386-393 p.
- Wilson M. L., 1994. Rift Valley Fever Virus Ecology and the Epidemiology of disease Emergence. *Annals New York Academy of Sciences* 740: 169- 180 p.
- Wilson M.L., Chapman L.E., Hall D.B., Dykstra E.A., Ba K., 1994. Rift Valley fever in rural northern Senegal: human risk factors and potential vectors. *Am J Trop Med Hyg* 50: 663-675. 17.
- Woods CW, Karpati AM, Grein T, McCarthy N, Gaturuku P., 2002. An outbreak of Rift Valley fever in Northeastern Kenya, 1997-98. *Emerg Infect Dis* 8: 138-144 p.
- Zeller H.G., 1997. Dengue, arbovirus et migrations dans l'Océan Indien. *Communication MR1996/108* : 5 p.

ANNEXES

ANNEXES 1: Protocole de broyage

A/ Première étape:

1/ Transférer les lots de moustiques dans les tubes 24-well polycarbonate vials (WPV) et les numéroter (Ex : A1, A2, A3...)

NB : Travailler en chambre froide ou sur glace

2/ Identifier les boîtes de tubes et les stocker à -80°C

B/ Deuxième étape:

3/ Numéroter 2 x 24 cryotubes pour constituer 2 échantillons de broyat (1 pour l'extraction et 1 de réserve) en les différenciant. (Ex : A1a et A1b, A2a et A2b, A3a et A3b, ...)

4/ Prévoir 2 bacs de glace pilée

5/ Sortir 1 boîte de tubes WPV et disposer les tubes dans la glace du 1er bac

6/ Disposer les cryotubes vides et identifiés dans la glace du 2ème bac

7/ Déposer 500 µl de PBS dans chaque tube WPV et refermer à l'aide du bouchon

NB : Bien serrer le bouchon sinon perte de matière lors du broyage

8/ Placer la boîte dans le broyeur et équilibrer avec une boîte vide

9/ Broyer les moustiques pendant 2 minutes à 1500 mouvements/minute.

10/ Remettre les tubes WPV sur la glace

11/ Répartir 2x200 µL de broyat dans 2 cryotubes (A1 → A1a et A1b) et répéter l'opération pour les 24 lots de broyats

12/ Remettre les tubes WPV dans leur boîte (le volume mort est conservé pour isolement du virus en cas de PCR positive)

13/ Ranger les cryotubes dans des boîtes plastiques et identifier les 2 boîtes (1boîte avec les échantillons a et 1 boîte avec les échantillons b)

Stocker à -80°C avant de passer à la phase d'extraction

ANNEXES 2: Protocole d'extraction

A/ Etape de lyse

- 1/ Déposer dans une plaque masterblock 300 µl/puits de 2xnc Lysis Buffer avec 0,6 µl/puits de antifoam Y-30 Emulsion
- 2/ Déposer 50 µl du broyat de moustiques dans chaque puits en prenant soin d'homogénéiser à la pipette.
- 3/ Incuber durant 20 min à T° ambiante pour inactivation virale
- 4/ Préparer une solution de PBS contenant par puits : 250 µl de PBS, 10 µl de Protéinase K
- 5/ Ajouter 270 µl de cette préparation par puits.
- 6/ Incuber 60 min à T° ambiante.
- 7/ Incuber 30 min sur glace, puis passer à l'étape d'extraction

B/ Etape d'extraction

- 8/ Enlever le bloc support en STATION COLLECTOR (position avant) et y placer une plaque Deep Well.
- 9/ Positionner le chariot au dessus de la STATION COLLECTOR et placer la plaque de pré-filtration sur le chariot.
- 10/ Pré-filtrer les 600µl de lysat, en imbibant préalablement la plaque de pré-filtration (« tissue préfiltrer tray I ») avec 40µl de Wash 1 (Prgm: Prefiltre). (1 fois 180s et 1 fois 120s). Eventuellement appliquer la touche turbo 10 à 30 s avant la fin du run 2
- 11/ Jeter la plaque de pré-filtration.
- 12/ Débloquer le chariot et positionner le chariot au dessus de la STATION WASH (position arrière), contenant préalablement une plaque Splash Guard (plaque bleue).
- 13/ Récupérer la plaque Deep Well contenant les lysats pré-filtrés et remettre en place le support de la STATION COLLECTOR.
- 14/ Filtrer les 600µl de lysats, en imbibant préalablement la plaque de purification RNA (« ARN purification tray ») avec 40µl de Wash 1 (Prgm: RNA tissue).
- 15/ Appliquer le protocole de lavage du tableau ci-dessous (étapes 1 à 9)
- 16/ Placer une plaque de récupération des ARNs sur le support de la STATION COLLECTOR.
- 17/ Débloquer le chariot et positionner le chariot au dessus de la STATION COLLECTOR.
- 18/ Jeter la plaque Splash Guard.
- 19/ Appliquer le protocole d'élution du tableau ci-dessous (étape 10 à 11)

20/ Débloquer le chariot et jeter la plaque de purification RNA.

21/ Retirer la plaque puis la recouvrir par le couvercle prévu à cet effet.

	Etape	Volume	Position	Temps	Vacuum
LAVA GE	1. Load samples	600µl	Waste	120 sec	80%
	2. Wash Solution 1	300µl	Waste	120 sec	80%
	3. Wash Solution 1	300µl	Waste	120 sec	80%
	4. Wash Solution 1	300µl	Waste	120 sec	80%
	5. Wash Solution 2	600µl	Waste	180 sec	80%
	6. Wash Solution 2	300µl	Waste	120 sec	80%
	7. Wash Solution 2	300µl	Waste	120 sec	80%
	8. Pre-elution	-	Waste	300 sec	90%
	9. Touch Off	-	Waste	-	-
ELUT ION	10. Elution Solution	150µl	Collector	120 sec	50%
	11. Touch Off	-	Collector	-	-

ANNEXES 3: Préparation du gel

- 1/ Dans une fiole jaugée en verre mettre 200 ml de solution de TBE (Tris, Borate, EDTA) à 0,5X, puis ajouter 4 grammes d'agarose (plus de précision ou pas)
- 2/ Faire chauffer le mélange (au micro-ondes) et arrêter toutes les deux minutes pour mélanger.
- 3/ Répéter cette opération jusqu'à obtention d'une solution transparente et homogène (absence de voile)
- 4/ Une fois que la solution est homogène, laisser refroidir
- 5/ Rajouter 10 μ L de BEt (Bromure d'éthidium) dans la solution et bien agiter
- 6/ Une fois la solution correctement homogénéiser, la verser dans la cuve amovible sur laquelle il aura été placé les peignes (de tailles adaptée) et des bandes de scotch aux deux extrémités. Il est essentiel de s'assurer que la cuve est correctement positionnée pour que le gel soit coulé de manière homogène.
- 7/ Une fois le gel solidifié, enlever les peignes et le scotch.
- 8/ Positionner la cuve amovible avec le gel dans la cuve à électrophorèse (en s'assurant qu'elle soit mise dans le bon sens de migration (ADN – vers + ; BET en sens inverse))