

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
INTRODUCTION.....	3
1 LA DENGUE EN AFRIQUE	5
1.1 HISTORIQUE	5
1.2 ETIOLOGIE	6
1.3 FORMES CLINIQUES	8
1.4 REPONSES IMMUNITAIRES ET DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE.....	9
1.5 DONNEES ENTOMOLOGIQUES.....	11
1.6 EPIDEMIOLOGIE	12
2 ETUDE DE L'IMPLICATION DES SINGES DANS LE CYCLE SELVATIQUE DE LA DENGUE DANS LA REGION DE KEDOUGOU (SENEGAL ORIENTAL)	13
2.1 HYPOTHESES DE TRAVAIL	13
2.2 MATERIELS ET METHODES	13
2.2.1 <i>Chronologie de l'étude</i>	13
2.2.2 <i>Sites d'études</i>	14
2.2.2.1 Région de Kédougou	14
2.2.2.1.1 Cadre géographique	14
2.2.2.1.2 Faune et flore	15
2.2.2.1.3 Climat.....	16
2.2.2.1.4 Dégradation du milieu naturel	17
2.2.2.2 Sites de capture.....	18
2.2.2.2.1 Singes sauvages.....	18
2.2.2.2.2 Singes domestiques	23
2.2.2.3 <i>Espèces étudiées</i>	23
2.2.2.3.1 Babouin de Guinée	23
2.2.2.3.1.1 Description.....	23
2.2.2.3.1.2 Écologie	23
2.2.2.3.1.3 Organisation sociale	23
2.2.2.3.1.4 Comportement.....	24
2.2.2.3.2 Patas, hussard, singe rouge, pleureur	26
2.2.2.3.2.1 Description.....	26
2.2.2.3.2.2 Écologie	26
2.2.2.3.2.3 Organisation sociale	26
2.2.2.3.2.4 Comportement.....	26
2.2.2.3.3 Singe vert ou callitriches	28
2.2.2.3.3.1 Description.....	28
2.2.2.3.3.2 Écologie	28
2.2.2.3.3.3 Organisation sociale	29
2.2.2.3.3.4 Comportement.....	29
2.2.2.4 <i>Protocole d'étude de terrain</i>	31
2.2.2.4.1 Prospection	31
2.2.2.4.2 Mise en place des pièges et capture	31
2.2.2.4.3 Protocole de prélèvement	37
2.2.2.5 <i>Techniques biologiques utilisées</i>	46
2.2.2.5.1 Technique immunoenzymatique (ELISA).....	46
2.2.2.5.2 Isolement sur cultures cellulaires et IFI.....	47
2.2.2.5.3 Extraction de l'ARN et RT-PCR	48
2.2.2.6 <i>Analyse des données</i>	48
2.3 RESULTATS	49
2.3.1 <i>Singes</i>	49
2.3.2 <i>Sérologie par ELISA</i>	53
2.3.3 <i>IFI</i>	56
2.3.4 <i>RT-PCR</i>	56

2.4 DISCUSSION	57
2.4.1 <i>Particularités des arbovirus</i>	57
2.4.2 <i>Echantillonnage</i>	58
2.4.3 <i>Limites des méthodes diagnostiques</i>	59
2.4.4 <i>Conclusion</i>	60
CONCLUSION	61
BIBLIOGRAPHIE.....	91
 ANNEXE 1 : FICHE DE SUIVI DES SINGES DOMESTIQUES	63
ANNEXE 2 : EXTRAIT DU CARNET D'OBSERVATION	65
ANNEXE 3 : MATERIEL NECESSAIRE POUR LA REALISATION DES ELISA	67
ANNEXE 4 : MODE OPERATOIRE DU TITRAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA RECHERCHE DANS LES SERUMS DES SINGES, DES IGM DIRIGES CONTRE LES VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE (YF), DE LA FIEVRE DE WEST NILE (WN), DE CHIKUNGUNYA (CHIK) ET DE LA DENGUE 2 (DEN-2).	69
ANNEXE 5 : SCHEMA DE DISTRIBUTION ET IDENTIFICATION DE LA MICROPLAQUE DU TITRAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA MISE EN EVIDENCE DES IMMUNOGLOBULINES.....	71
ANNEXE 6 : MODE OPERATOIRE DU TITRAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA RECHERCHE DANS LES SERUMS DES SINGES, DES IGG DIRIGES CONTRE LES VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE (YF), DE LA FIEVRE DE WEST NILE (WN), DE CHIKUNGUNYA (CHIK) ET DE LA DENGUE 2 (DEN-2).	73
ANNEXE 7 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT SUR CULTURES CELLULAIRES ET D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.75	75
ANNEXE 8 : EXTRACTION DE L'ARN VIRAL (METHODE QIAGEN®).	77
ANNEXE 9 : PROTOCOLE DE RT-PCR TITAN® DEN-2	79
ANNEXE 10 : PROTOCOLE DE VISUALISATION SUR GEL D'AGAROSE.	81
ANNEXE 11 : DONNÉES SUR LES SINGES CAPTURÉS DANS LA ZONE DE KÉDOUGOU (JUIN 2002-JUIN 2003). ...	83
ANNEXE 12 : METHODE POUR L'ANALYSE DES RESULTATS DES SEROLOGIES PAR ELISA	85
ANNEXE 13 : SERUMS PRESENTANT DES IGG ANTI-ARBOVIRUS (YF ET WN) PARMI LES 62 SERUMS PRELEVES, LA VALEUR DE LA DO P-N, LE CUT-OFF ET LE TITRE SONT PRECISES.	87
ANNEXE 14 : PHOTOGRAPHIES DES GELS D'AGAROSE SOUS UV TRAITEES PAR LE LOGICIEL BIOCAPT®. SEUL LE TEMOIN POSITIF A MIGRE AU NIVEAU DU FRAGMENT DE TAILLE 450 PAIRES DE BASES.....	89

INTRODUCTION

La dengue est une arbovirose majeure en constante progression. Elle est devenue aujourd’hui un réel problème de santé publique. L’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu’environ 50 millions d’individus sont atteints chaque année, entraînant l’hospitalisation de 500 000 patients ayant une forme grave (dengue hémorragique/ dengue avec syndrome de choc (DH/DSC)), avec plus de 20 000 décès, particulièrement chez des enfants (28).

De par le monde, 4 sérotypes du virus de la dengue ont été isolés (DEN-1 à 4) dont l’aire de répartition est superposable à l’aire du principal vecteur, le moustique *Aedes aegypti*. Par conséquent, on estime à 2,5 milliards le nombre de personnes exposées au risque, vivant dans plus de 100 pays situés dans les régions tropicales et subtropicales (24) (**figure 1**).

World Distribution of Dengue - 2000

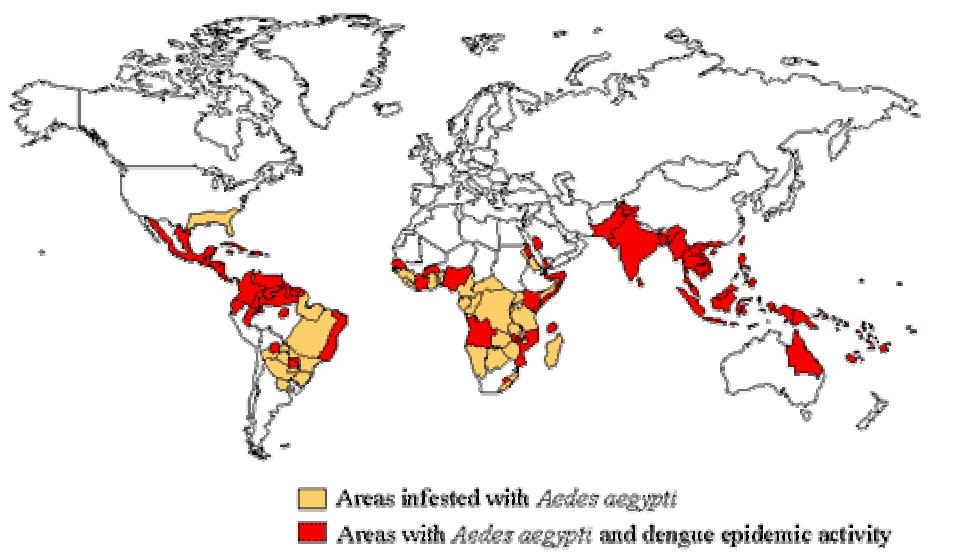


Figure 1 : distribution de la dengue dans le monde en 2000 (2).

L’incidence de la dengue a augmenté de façon inquiétante durant les dernières décennies, ce qui lui vaut le qualificatif de maladie infectieuse émergente (24). Plusieurs facteurs peuvent être incriminés. Le vecteur majeur, *A. aegypti*, est un moustique domestique ; il s’est adapté aux milieux urbains au sein desquels il trouve des gîtes larvaires artificiels. Les événements politiques, sociaux et climatiques ont contribué et contribuent toujours aux mouvements de population et à l’explosion démographique des villes tropicales infestées par les moustiques (24,13).

Dans le Pacifique, en Asie et en Amérique du sud, la dengue est endémique avec des formes hémorragiques graves (DH/DSC) (44,71). En Afrique, la dengue n'a été détectée que récemment (premiers cas de dengue 2 isolés au Nigeria dans les années 70) (3). Les 4 sérotypes ont été isolés mais de rares épidémies ont été décrites sans qu'aucune forme hémorragique n'ait été notifiée sur ce continent (5).

La découverte d'une circulation selvatique enzootique du virus dengue 2 dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest où des programmes de surveillance des arbovirus sont menés depuis de nombreuses années est originale sur ce continent (7,8,9,30). Dans ces mêmes pays et plus particulièrement au Sénégal, le virus de la dengue 2 n'est détecté que périodiquement (environ tous les 10 ans) chez les moustiques (33). Se pose alors la question d'expliquer les mécanismes de ce cycle de silence-émergence et les modalités de maintien du virus dans l'environnement.

Le cycle selvatique du virus de la dengue, faisant intervenir des moustiques sauvages et un hôte vertébré à sang chaud a été décrit en Malaisie et au Vietnam et seulement dans ces pays (72,59). Pour une autre arbovirose (dont l'agent infectieux est un autre flavivirus), la fièvre jaune, le cycle selvatique en Afrique est très bien documenté, avec comme hôte intermédiaire, le singe (6,53).

Dans la région de Kédougou (Sénégal oriental), où a lieu une intensive surveillance des arbovirus depuis près de 30 ans (40), la circulation du virus de la dengue a été mise en évidence à plusieurs reprises chez les moustiques du genre *Aedes* (8,9,50). Le virus a été également isolé chez un singe et des sérologies sur les singes se sont avérées positives (9,62), montrant une infection de ces singes par le virus de la dengue. Cependant aucune étude longitudinale n'a permis d'établir un lien entre les épizooties chez les moustiques et la présence d'anticorps anti-dengue chez les singes. Ce lien est d'autant plus difficile à établir que les techniques sérologiques utilisées à l'époque étaient peu spécifiques du virus de la dengue. Il est donc important de déterminer si le singe est impliqué dans le cycle selvatique de la dengue en tant qu'hôte/réservoir comme c'est le cas pour la fièvre jaune.

Notre travail est une étape préliminaire à un programme de recherche mené à long terme recouvrant l'étude les cycles de silence-émergence de la dengue. Elle se propose de documenter la circulation du virus de la dengue dans la population simienne de la région de Kédougou. L'étude des mécanismes de transmission par les vecteurs, moustiques, simiophiles et anthropophiles ne sera pas abordée dans cet exposé.

Dans un premier temps, nous ferons un bilan des connaissances sur le contexte particulier de la dengue en Afrique et plus particulièrement en Afrique de l'Ouest. Puis, après avoir rappelé les hypothèses de travail, nous situerons l'étude dans son contexte et choisirons nos sites et animaux d'étude (chronologie, lieu d'étude, singes concernés). Ensuite nous décrirons précisément les protocoles utilisés lors du stage, sur le terrain et au laboratoire. Les résultats seront présentés et discutés, et nous permettront de conclure et d'envisager les perspectives de cette étude.

1 LA DENGUE EN AFRIQUE

1.1 Historique

Le virus de la dengue a été décrit pour la première fois au Nigeria en 1964 (3). De 1964 à 1970, une trentaine de souches de DEN-1 et une trentaine de souches DEN-2 ont été isolées dans ce pays (3,41). En 1970, la souche DEN-2 a été retrouvée à Bandia au Sénégal chez une jeune fille. En 1974, la souche DEN-2 a été isolé, dans l'Est du pays, chez le moustique *Aedes luteocephalus* (50). L'isolement du sérototype DEN-2 en 1980-1981, à partir de plusieurs lots d'*Aedes* sauvages de plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso (30,49), Côte d'Ivoire (51) et Sénégal Oriental (9,62)), a prouvé l'existence d'un cycle selvatique en Afrique de l'Ouest. Cependant le rôle des différents vecteurs et l'implication des singes en tant qu'hôte réservoir et/ou amplificateur de virus dans la circulation selvatique de la dengue est mal connu.

Les programmes de surveillance menés au Sénégal Oriental (40) ont permis de mettre à nouveau en évidence, en 1990, une forte amplification de DEN-2 chez des moustiques du genre *Aedes*. Quelques cas humains de dengue ont été rapportés dans les villages proches (68,73). Une nouvelle amplification virale a été détectée, en 1999, en milieu selvatique chez les vecteurs, en mais aucun cas humain n'a été rapporté (33).

Le cycle selvatique de la dengue a été aussi mis en évidence au Nigeria où des études ont révélé que près de 40 % des singes (*Cercopithecidae*) vivant en forêt possédaient des anticorps dirigés contre le virus DEN-2 (38,21).

Une épidémie de dengue (DEN-2) s'est déclarée, en milieu urbain, en 1982, à Ouagadougou, essentiellement chez des patients expatriés (23). La comparaison des souches a montré que le virus, très proche de celui ayant circulé aux Seychelles, en était probablement originaire (46).

Le sérototype le plus isolé en Afrique de l'Ouest est DEN-2. Les autres sérotypes ont rarement été isolés (19). De même en Afrique de l'Est, le sérototype DEN-2 a été isolé lors des épidémies des Seychelles en 1977 (2), de la Réunion en 1978 (10), du Kenya en 1982 (34), du Soudan en 1984 (31), de Djibouti en 1991 (54), de Somalie en 1983 et 1993 (65,36,35), d'Arabie Saoudite en 1994 (11). L'épidémie de Djibouti était probablement liée à celle de Somalie. La comparaison des souches a montré que les virus des deux épidémies étaient proches et que le virus de Djibouti a probablement été introduit par l'intermédiaire de réfugiés somaliens (54).

De même en Afrique de l'Est, les autres sérotypes ont rarement été isolés. En Afrique du Sud, l'épidémie de 1927 à Durban était due au sérototype DEN-1 (20) et celle de 1985 était due à une souche introduite d'Inde (40). Une épidémie de DEN-1 a été rapportée en Angola en 1986 (26). Le sérototype DEN-3 a seulement été isolé au Mozambique en 1985 (27) et en Somalie en 1992 chez des militaires américains (65). Le sérototype DEN-4 a été isolé au Sénégal en 1981 et 1983. Une enquête épidémiologique a montré que la souche n'était probablement pas originaire d'Afrique mais provenait d'Haïti où les patients s'étaient contaminés. Le sérototype DEN-4 n'a jamais été isolé de nouveau au Sénégal, les sérologies effectuées sur des enfants et des singes étant négatives (63).

1.2 Etiologie

Le virus de la dengue appartient à la famille des *Flaviviridae*, du genre flavivirus qui regroupe plus de 70 membres définis sérologiquement. Les *Flaviviridae* regroupent des agents pathogènes tels que les virus de la fièvre jaune, de la dengue, des encéphalites transmises par les tiques, de l'encéphalite japonaise, de la fièvre West-Nile, de l'hépatite C... On différencie quatre sérotypes du virus de la dengue (appelés DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) à l'aide de méthodes sérologiques. Chez l'homme, l'infection par un sérototype induit une immunité à vie contre la réinfection par le même sérototype, mais une protection qui n'est que temporaire et partielle contre les autres sérotypes.

Chaque sérototype comporte plusieurs variants, appelés aussi génotypes, sous-types ou topotypes quand ils sont rattachés à une zone géographique, dont la comparaison, par des techniques moléculaires (12), a permis d'identifier différentes souches lors d'épidémies ou d'épizooties et d'en suivre la circulation entre différentes localités (70).

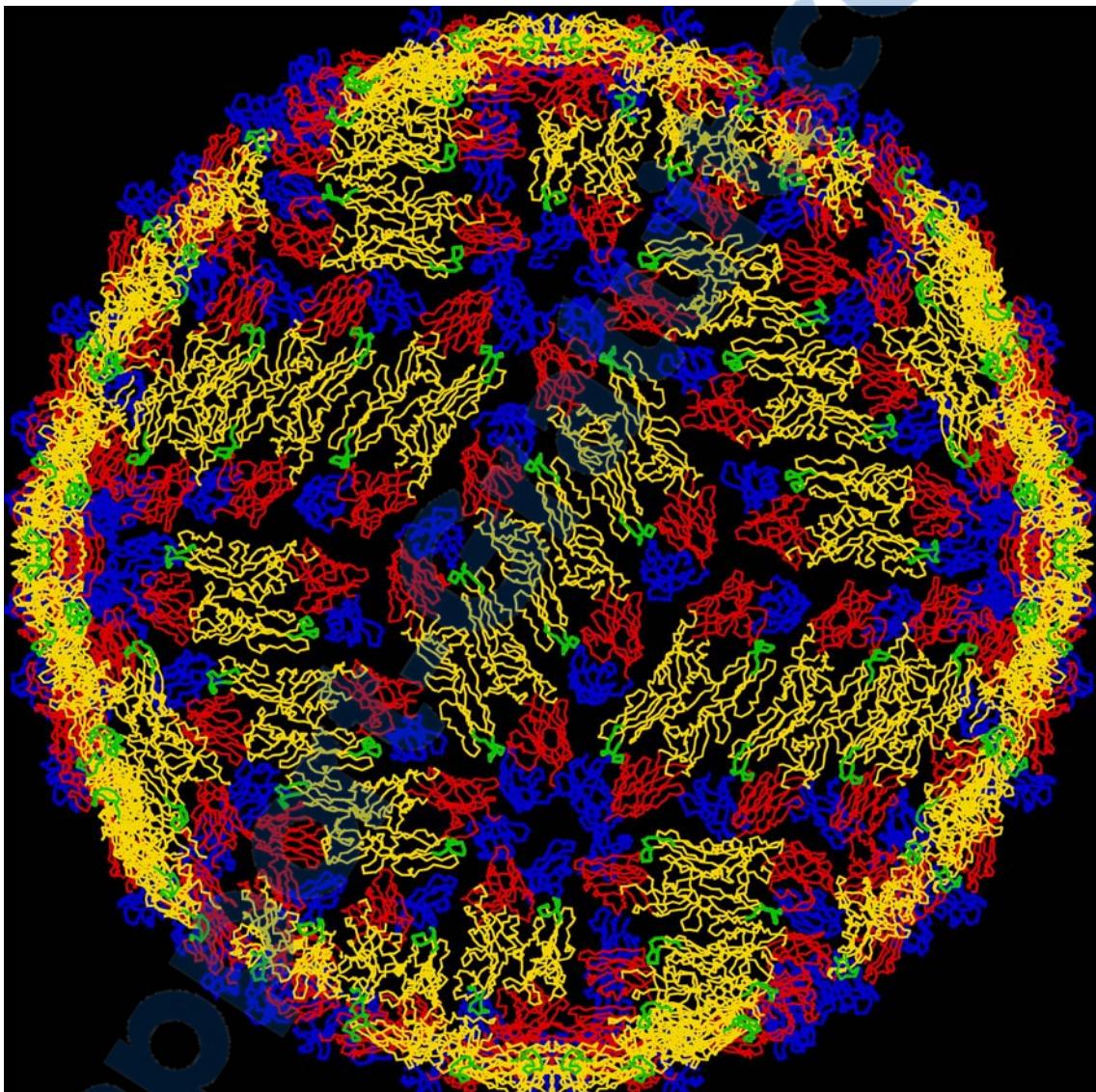
Le virus de la dengue a un diamètre de 40 à 60 nm (**figure 2**). Le génome est constitué par une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 11 000 bases. L'ARN génomique associé à plusieurs copies de la protéine de capsidé C forme la nucléocapside (NC). La NC est entourée d'une enveloppe virale constituée d'une double couche lipidique issue des membranes du réticulum endoplasmique dans lesquelles sont ancrées la protéine d'enveloppe E et la protéine de membrane M. La protéine E est présente sous la forme d'un homodimère dans la particule virale. La protéine E est impliquée dans la reconnaissance du récepteur viral à la surface cellulaire, dans l'activité fusogène du virion et elle induit les anticorps neutralisants du virus. La fonction de la protéine M n'est pas connue (4).

Le génome est constitué de trois gènes qui codent pour des protéines de structure, la nucléocapside ou protéine centrale (C), une protéine associée à la membrane (M) et une protéine d'enveloppe (E), et de sept gènes qui codent pour des protéines non structurales (NS). Les domaines responsables de la neutralisation, de la fusion et des interactions avec les récepteurs viraux sont associés à la protéine d'enveloppe (4). L'ordre des protéines codées est le suivant :

5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'

Le virus est sensible à la chaleur. Il peut être conservé dans un congélateur à basse température à -70°C, dans la carboglace à -90°C ou dans l'azote liquide à -196°C. Il est hémagglutinant à un pH de 6,2 à 6,4.

Figure 2 : le virus de la dengue. Cette illustration informatique montre comment la protéine majeure, appelée « E » pour protéine d'enveloppe, s'organise pour former une coquille protectrice autour du virus. La protéine est colorée en bleu, vert et jaune pour montrer les trois domaines spécifiques de la protéine. Cette coquille protéique protège le matériel génétique qui se trouve à l'intérieur (Purdue University computer illustration).



1.3 Formes cliniques

La dengue est une maladie fébrile aiguë et bénigne dont l'incubation dure de 5 à 7 jours (48). La fièvre apparaît brutalement, accompagnée de frissons, de céphalées, de douleurs rétro-orbitaires et de douleurs musculaires et articulaires. Un érythème généralisé peut se déclarer au début de la maladie et une éruption maculopapulaire peut apparaître 3 à 4 jours plus tard sur le torse pour gagner ensuite les autres parties du corps. Une lymphadénopathie diffuse est souvent observée. La fièvre est parfois biphasée et dure de 5 à 7 jours ; la convalescence peut prendre plusieurs semaines. D'évolution classique, la mortalité est très faible, les complications rares et la guérison sans séquelles.

Dans de rares cas, l'évolution conduit à une forme hémorragique (DH). La maladie débute comme une dengue normale mais après quelques jours de fièvre, des symptômes hémorragiques apparaissent avec une insuffisance circulatoire, une hypotension et un syndrome de choc (DSC). Si le malade ne bénéficie pas de soins intensifs, la mortalité peut dépasser 20 % des cas et même atteindre 44 % (48).

En Afrique, 2 cas mortels avec une forme hémorragique ont été décrits au Mozambique en 1985. Aucune méthode de diagnostic (isolement et sérologie) n'a été effectuée et n'a permis de montrer un rapport avec le virus de la dengue (27). A Djibouti et en Arabie Saoudite, des cas avec des formes hémorragiques ont été rapportés mais ils n'ont pas été confirmés (47).

Dans les continents où la DH est endémique (principalement en Asie du Sud Est), son incidence par rapport à la dengue classique est faible, bien qu'elle soit mal connue (43). En Amérique du Centre et du Sud, les épidémies de DH sont de plus en plus fréquentes et nombreuses (44). En Afrique, l'incidence de la dengue est faible et la probabilité d'apparition de formes hémorragiques serait donc *a priori* très faible. Ceci peut-être due à une sous-estimation diagnostique due à l'absence de système de surveillance et de diagnostic ainsi que la forte incidence du paludisme dont les symptômes sont confondus avec ceux des fièvres hémorragiques (43).

Les mécanismes menant aux formes hémorragiques sont mal connus (42). Deux hypothèses principales ont été émises : la première évoquant une évolution vers la forme hémorragique due à l'infection secondaire par un autre sérotype, qui entraîne la production d'anticorps facilitants et augmente le risque hémorragique (29,56,57) ; la deuxième évoquant une souche virale particulièrement pathogène (55,47).

En fait l'explication actuellement acceptée tient compte de ces deux hypothèses : une dengue pourrait évoluer vers une forme hémorragique ou sévère lors de l'infection par une souche particulière chez un hôte spécialement sensible (57).

Le traitement de la dengue est avant tout symptomatique et dépend du degré de gravité de l'infection. Les formes hémorragiques nécessitent que le patient soit hospitalisé afin de compenser les pertes liquidienne par un remplissage vasculaire précoce.

Actuellement aucun vaccin commercialisé n'est utilisé mais les recherches sont en cours pour produire un vaccin protégeant contre les quatre sérotypes.

1.4 Réponses immunitaires et diagnostic de laboratoire

Le tableau clinique décrit plus haut n'est pas suffisant pour affirmer qu'une personne est atteinte de dengue. Les signes cliniques et le diagnostic de laboratoire sont indissociables et permettent de déterminer si le sujet est atteint ou non de dengue. Pour comprendre le choix des méthodes de diagnostic il faut connaître la cinétique de réplication du virus de la dengue. En effet le moment de l'infection et le moment de la prise en charge du patient doivent être bien précisés pour que l'on ait une chance de détecter le virus de la dengue (43).

Il existe deux méthodes de référence pour poser au laboratoire un diagnostic de dengue : l'isolement du virus (culture), ou la détection d'anticorps anti-dengue (sérologie). Des méthodes actuelles permettent de déceler l'ARN et les antigènes spécifiques du virus de la dengue (12).

Au moment où une personne infectée par le virus de la dengue commence à avoir de la fièvre, l'infection a déjà largement diffusé dans l'organisme. On retrouve le virus dans le sérum ou le plasma, les éléments figurés du sang circulant et certains tissus, en particulier ceux du système immunitaire, pendant environ 2 à 7 jours, qui correspondent approximativement à la période de fièvre. Le virus de la dengue infecte habituellement les monocytes du sang périphérique dans les quelques jours qui suivent la piqûre de moustique infectante (figure 3), et le taux d'infection obtenu après immunofluorescence se situe en général entre 1 et 10 cellules infectées sur 10 000. Des concentrations décelables d'anticorps anti-dengue apparaissent au bout de plusieurs de jours de fièvre. On distingue alors deux types de réponse immunitaire : primaire et secondaire (32) (figure 4).

Figure 3 : chronologie de l'infection, par le virus de la dengue, du moustique et de l'homme, de l'incubation et de la virémie chez l'homme (43).

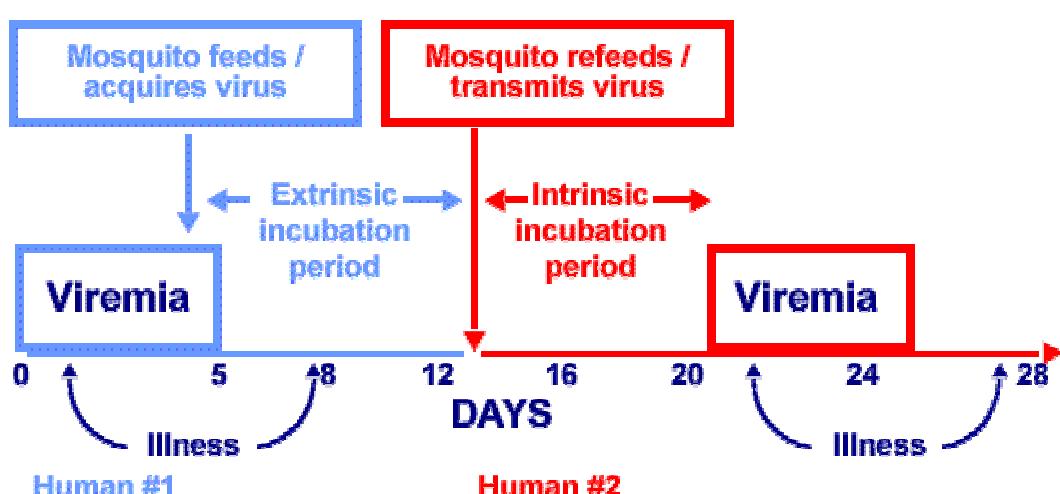
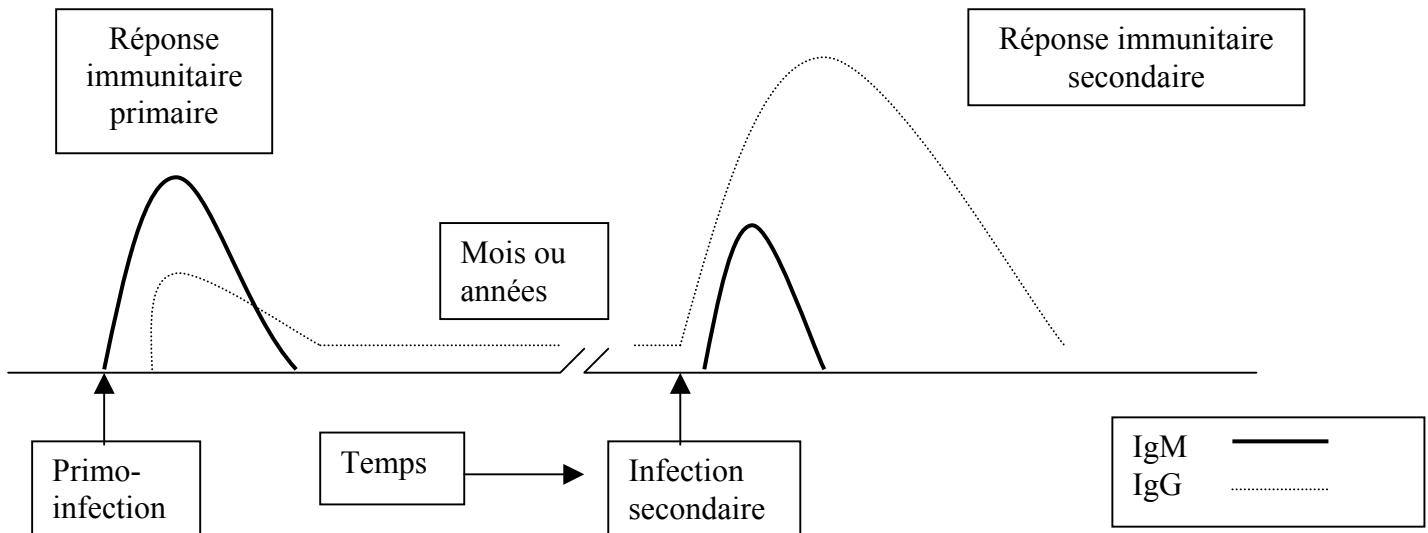


Figure 4 : Réponse immunitaire primaire et secondaire lors d'une infection par le virus de la dengue.

Anticorps déterminés par ELISA avec captures des isotopes



Les personnes qui n'ont jamais été infectées auparavant par un flavivirus, ni immunisées par un vaccin contre un flavivirus (par exemple, fièvre jaune, encéphalite japonaise, encéphalite à tiques) font une réponse primaire en anticorps lorsqu'elles sont infectées par le virus de la dengue. Le principal isotype rencontré est alors l'IgM. Les IgM anti-dengue décelables à l'aide d'une réaction immunoenzymatique avec capture d'anticorps (MAC-ELISA), apparaissent chez la moitié des malades présentant une primo-infection alors qu'ils sont fébriles ; chez l'autre moitié, ils apparaissent dans les deux à trois jours suivant la défervescence. L'étude d'une série de malades (dengue confirmée par isolement du virus ou analyse sérologique de sérum appariés), a montré que 80 % d'entre eux avaient des concentrations d'IgM décelables 5 jours après le début de la maladie, chiffre qui est passé à 99 % au bout de 10 jours (43). Une fois qu'ils apparaissent, ces IgM voient leur concentration s'élèver rapidement et atteindre un pic 2 semaines environ après le début des symptômes, puis diminuer ensuite progressivement jusqu'à n'être plus décelable au bout de 2 à 3 mois.

Des IgG anti-dengue apparaissent peu après. Physiologiquement, la primo-infection est donc caractérisée par une fraction molaire élevée d'IgM anti-dengue et une fraction molaire faible d'IgG anti-dengue (**figure 4**).

Lors d'une primo-infection par le virus de la dengue, les analyses sérologiques peuvent donner des résultats indiquant qu'on a affaire à un sérototype particulier de la dengue et ce sur des échantillons prélevés au début de la maladie. Dans d'autres cas, la présence d'anticorps montrant des réactions croisées souvent visibles au cours des 2 premiers mois suivant l'infection, peut gêner la détermination du sérototype. En pareil cas, il faudra attendre 3 à 6 mois après l'infection pour pouvoir déceler un anticorps monotypique spécifique du sérototype infectant. Par conséquent, les échantillons recueillis en fin de convalescence chez des sujets montrant une réponse sérologique primaire peuvent être utiles pour la détermination du sérototype infectant.

Les sujets déjà immunisés lors d'une infection antérieure par un flavivirus ou du fait d'une vaccination montrent une réponse secondaire en anticorps lorsqu'ils sont infectés par le virus de la dengue. Dans les infections secondaires à flavivirus, cas le plus souvent rencontré chez les malades atteints de DH, l'isotype dominant est l'IgG. Des IgM anti-dengue apparaissent dans la plupart des cas et si la cinétique de la production des IgM est semblable à celle observée dans les primo-infections, leur concentration est considérablement plus faible. Contrairement à la primo-infection, l'infection secondaire par le virus de la dengue provoque l'apparition de fortes concentrations d'IgG anti-dengue avant, ou en même temps que la réponse en IgM. Une fois décelées, ces concentrations d'IgG s'élèvent rapidement, atteignant un pic deux semaines environ après le début des symptômes, puis diminuent progressivement en 3 à 6 mois. Les IgM anti-dengue culminent également au bout de 2 semaines, puis commencent à décroître, et sont encore décelables chez environ 30 % des malades 2 mois après les premiers symptômes. Physiologiquement, l'infection secondaire se caractérise par une faible fraction molaire d'IgM anti-dengue et une forte fraction molaire d'IgG réagissant contre de nombreux flavivirus (**figure 4**).

Les IgM et les IgG anti-dengue neutralisent le virus de la dengue. Ces anticorps neutralisants augmentent rapidement lorsque la fièvre tombe et rendent difficile l'isolement du virus dans le sérum.

1.5 Données entomologiques

De nombreuses souches du virus DEN-2 ont été isolées à partir de différentes espèces d'*Aedes* au cours de la saison des pluies, en 1980, en Côte d'Ivoire (7) et au Burkina-Faso (30), puis en 1981 à Kédougou au Sénégal (9). En Côte d'Ivoire, les recherches mensuelles de virus, ont montré que les isolements sont positifs dès le début de la saison des pluies (mois de mai) et qu'une circulation virale a lieu au cours des six mois de la saison pluvieuse avec une amplification assez brutale vers le milieu de saison. Les moustiques concernés appartiennent aux espèces *Aedes luteocephalus*, *Ae. africanus*, *Ae. opok*, *Ae. furcifer* et *Ae. taylori*. Ils sont tous des vecteurs du virus de la fièvre jaune. Ils se rencontrent essentiellement au niveau de la voûte des arbres, en contact étroit avec les populations simiennes. Au Burkina-Faso, le virus a été isolé une fois de *Aedes cumminsii*, moustique terrestre, non vecteur de fièvre jaune (5). Il semblerait que le virus circule naturellement entre ces vecteurs et les singes hôtes vertébrés (*Cercopithecidae*) (53).

Cependant, les femelles d'*Aedes*, qui vivent dans la canopée, sont capables à des degrés divers de descendre au niveau du sol. Dans les savanes humides on peut ainsi trouver, au sol, des *Ae. africanus* et des *Ae. luteocephalus* tout comme des *Ae. furcifer*, alors que *Ae. taylori* ne se rencontre qu'au niveau de la voûte des arbres. *Ae. furcifer* est aussi la seule espèce de vecteur selvatico qui se rencontre au sol en dehors de la galerie forestière, à l'entrée et même parfois à l'intérieur des villages. Elle peut donc établir un lien direct entre les populations simiennes et les populations humaines. De plus, une partie des femelles agressives (parfois plus de 30 %) prennent deux repas de sang au cours d'un seul et même cycle trophogonique, ce qui augmente les risques de transmission virale (39).

L'isolement du virus à partir de mâles d'*Aedes* du groupe *furcifer/taylori* a prouvé, en Côte d'Ivoire en 1980 (7) puis au Sénégal en 1981 (9), qu'il y avait transmission verticale du virus par l'intermédiaire des œufs, ce qui permet au virus de se maintenir localement au cours de la saison sèche, période sans moustiques selvatico, puis de réapparaître à la saison des pluies, en même temps qu'émergent les nouvelles générations de moustiques.

La transmission verticale pourrait exister dans les deux sous-genres, puisqu'elle existe chez *Ae. aegypti* qui appartient au sous-genre *Stegomyia* (37).

Ae. aegypti est d'ailleurs le principal vecteur actuel de la dengue épidémique et endémique (principalement dans les pays où n'existe pas de cycle selvatico) mais l'introduction d'*Ae. albopictus* dans un nombre croissant de pays d'Afrique (Madagascar, Nigeria, Afrique du Sud et dernièrement Cameroun) (52,22) est inquiétante car c'est un vecteur confirmé de la dengue en Asie du Sud-Est, capable de transmettre verticalement les 4 souches de dengue (58). De plus lorsqu'il entre en compétition avec *Ae aegypti*, il a souvent tendance à le remplacer surtout dans les gîtes péri-domestiques (52). On ne peut pas encore évaluer les conséquences épidémiologiques d'une telle modification des populations vectorielles mais on peut se poser la question du risque de sélection de variants viraux plus adaptés à un vecteur qu'à un autre et plus facilement transmissibles à l'homme ou plus pathogènes.

1.6 Epidémiologie

En Afrique, l'endémicité de la dengue chez l'homme n'est pas établie et les épidémies sont généralement introduites. Ces épidémies sont alors de type urbain et la transmission est effectuée par *Ae. aegypti*.

En Afrique occidentale, le virus DEN-2 peut parfois émerger de foyers selvatico enzootiques et passer chez l'homme (68). La transmission est alors assurée par des *Aedes* sauvages, vecteurs connus de nombreux arbovirus dont celui de la fièvre jaune.

L'isolement du virus DEN-2 chez *Ae. aegypti* en 1999 au Sénégal Oriental, montre qu'il existe cependant un risque potentiel d'épidémisation de la dengue dans cette région (33). Par ailleurs le rôle de vecteur de liaison joué par *Ae. furcifer* pourrait créer les conditions pour qu'apparaisse une épidémie de dengue de type intermédiaire pouvant déboucher sur une épidémie urbaine quand le vecteur domestique *Ae. aegypti* est présent, de la même manière qu'en ce qui concerne la fièvre jaune (6).

Ainsi, les conditions du passage du virus de la dengue de son cycle selvatico actuel à l'homme sont-elles réunies : nombreuses espèces de vecteurs sauvages potentiels en contact avec les singes, contamination possible des humains en forêt, introduction potentielle par *Ae. furcifer* du virus dans les villages, présence souvent abondante du vecteur domestique *Ae. aegypti*. Cependant, ni en 1980 ni en 1981 le virus n'a été isolé d'humains ou d'*Ae. aegypti*. Pourtant, en 1990, le virus a été isolé à la fois de moustiques et de sérums humains au Sénégal oriental (40), ce qui montre que ce risque d'épidémisation existe réellement.

Il est aussi étonnant de constater qu'en Afrique, les cycles selvatico de la dengue ont été décrits uniquement pour la souche DEN-2 alors qu'en Asie, et notamment en Malaisie, les 4 sérotypes de dengue ont été mis en évidence chez les vecteurs sauvages (*Aedes niveus*) et les singes (*Presbytis obscura*, *Macaca fascicularis*) (59,60).

2 ETUDE DE L'IMPLICATION DES SINGES DANS LE CYCLE SELVATIQUE DE LA DENGUE DANS LA REGION DE KEDOUGOU (SENEGAL ORIENTAL)

2.1 Hypothèses de travail

Le contexte particulier de la dengue en Afrique par rapport à l'Asie, le Pacifique et l'Amérique du Sud soulève plusieurs interrogations : pourquoi ne sont pas notifiées des épidémies avec des formes hémorragiques alors que les quatre sérotypes circulent sur le continent africain ; comment expliquer la circulation enzootique selvatique du sérototype DEN-2 en Afrique de l'Ouest sans épidémisation et ses périodes de silence-émergence ; les singes ont-ils un rôle d'hôte réservoir et/ou amplificateur dans ce cycle comme il l'a été prouvé pour la fièvre jaune ?

Les réponses à ces questions sont nécessaires pour mieux comprendre le cycle épidémiologique de la dengue et pouvoir ainsi mieux appréhender la lutte contre cette maladie en pleine expansion et pour laquelle le continent africain est pour le moment peu touché.

Notre stage d'étude limité à une courte période sur une zone bien définie se propose d'améliorer les connaissances sur l'implication des singes dans le cycle selvatique de la dengue au Sénégal oriental et plus particulièrement dans la région de Kédougou déjà bien connue pour être le lieu d'une intense surveillance des arbovirus (40).

Cette étude est un prologue à une étude pluridisciplinaire longitudinale sur le sujet. Bien que fondamentaux, les aspects entomologiques, pour des raisons matérielles et de temps, ne seront pas abordés dans cette étude.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Chronologie de l'étude

Le stage a compris trois volets :

- Une analyse rétrospective des prélèvements recueillis pendant les missions de terrain effectué en 2002.
- Deux missions de terrain en 2003 :
 - o une mission de suivi des singes, de prospection des sites de capture et de mise en place des pièges (février 2003)
 - o une mission de capture (avril, fin mai, début juin 2003)
- Une étude des prélèvements recueillis lors de la mission de capture en 2003.

2.2.2 Sites d'études

2.2.2.1 Région de Kédougou

2.2.2.1.1 *Cadre géographique*

La zone de Kédougou est située à l'extrême Sud-Est du Sénégal dans la région de Tambacounda à $12^{\circ} 33'$ de latitude Nord et $12^{\circ} 11'$ longitude Ouest. Elle est limitée au Nord par le département de Bakel et au Sud par la République de Guinée, à l'Est par la République du Mali et à l'Ouest par le département de Tambacounda et la République de Gambie (**figure 5**).

Figure 5 : carte montrant les positions géographiques du Sénégal en Afrique et de la zone de Kédougou au Sénégal (MAE).



Elle s'étend sur une superficie de 16 896 km² et compte une population de 71 573 habitants. La population est essentiellement rurale (84 %), peu scolarisée (27 %), et d'une grande diversité ethnique. Les Wolof, les Bassari, les Koniagui, les Peulh, les Bédick, les Malinké, les Badiranké, en sont les principaux groupes (61).

Le relief est très accidenté et dépasse par endroit 200 m d'altitude. C'est dans cette zone que se situe le point culminant du Sénégal : 581 m ($12^{\circ} 22'N$; $12^{\circ} 33'W$).

Le réseau hydrographique y est très dense, les pluies sont abondantes et fréquentes et les roches sont presque toujours imperméables.

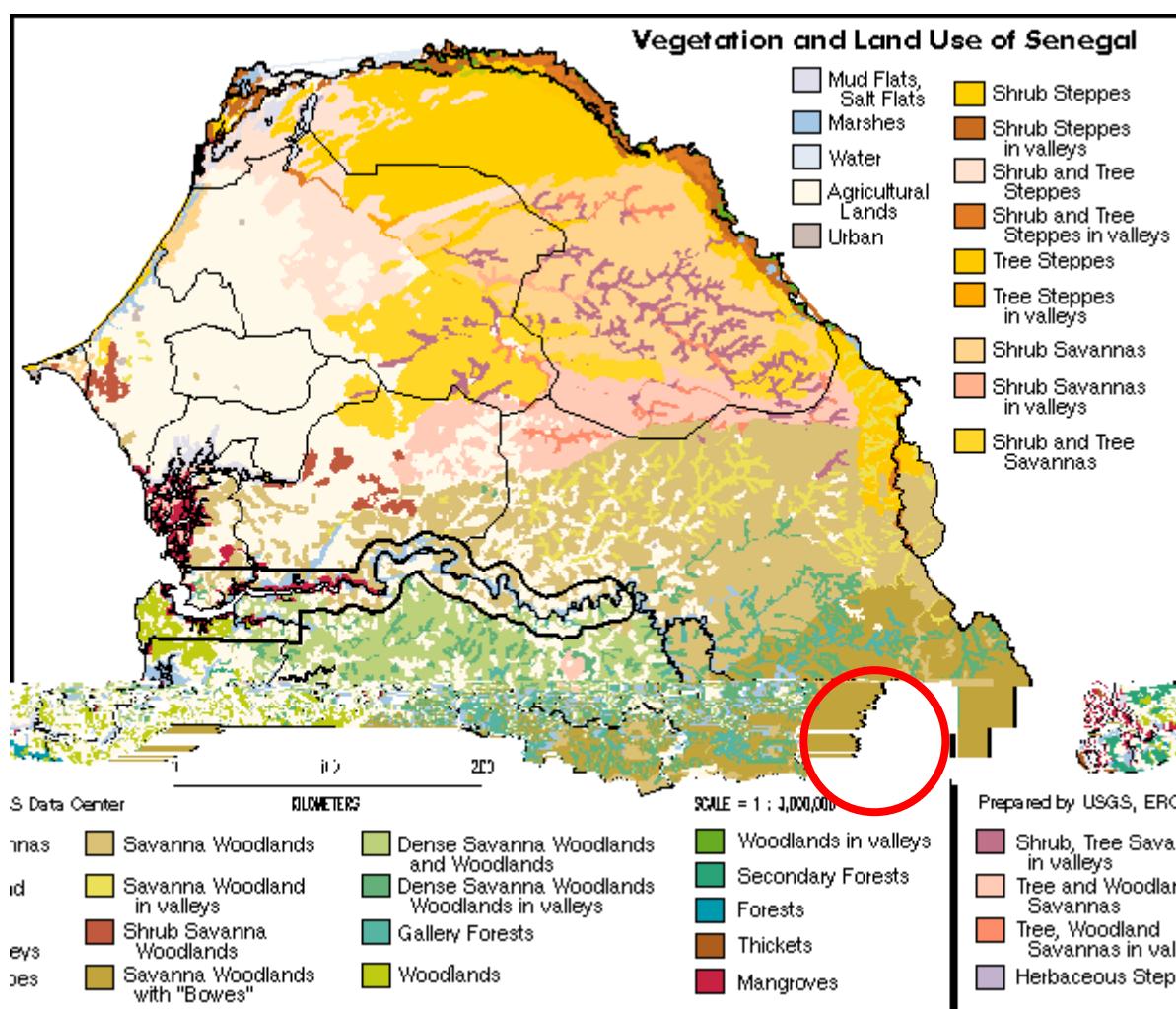
Ces facteurs favorisent la création de cours d'eau temporaires. Le fleuve Gambie dans sa partie sénégalaise traverse ces terrains imperméables. Son écoulement est au maximum (90 %) en période hivernale (Juin à Octobre). Des mares, alimentées par les précipitations annuelles constituent par endroits d'importantes ressources en eaux. Ces mares ont un volume d'eau variant dans le temps en fonction des précipitations annuelles. Elles se dessèchent pour certaines aussitôt après la saison des pluies et un peu plus tard pour d'autres.

2.2.2.1.2 Faune et flore

Le département, situé dans la zone soudano-guinéenne, est à la frontière du bloc forestier guinéen présentant un climat spécifique, une végétation abondante et une bonne pluviométrie (61). Ces caractéristiques ont conduit à la création du plus vaste parc national (Niokolo-Koba) de l'Afrique occidentale avec 913 000 ha.

La zone de Kédougou constitue une zone de transition entre forêt et savane ou écotone. Elle abrite des savanes boisées et des forêts-galeries aux essences très variées (**figure 6**).

Figure 6 : végétation du Sénégal, la zone de Kédougou est dans le cercle rouge (EROS Data center).



Le couvert végétal est formé de 2 strates : l'une herbacée, dense à dominance de graminées qui offrent une bonne alimentation au bétail et l'autre arborée riche et variée dont plusieurs espèces offrent également une bonne alimentation à la population humaine. Les produits de cueillette correspondent aux fruits de *Saba senegalensis*, de *Tamarindus indica*, de *Ziziphus mauritiana*, de *Detarium senegalensis*, de *Andasonia digitata*, aux noix de *Bytiospermum parkii*...

Sur le plan faunistique, la zone de Kédougou reste une des régions où il existe encore des espèces animales aujourd'hui raréfiées dans la plupart des autres régions du Sénégal. La faune est diverse et comprend de grands herbivores (Elan de Derby, Buffles, Hippotragues...), des insectivores (Hérissons, Musaraignes,...), des chiroptères (chauve-souris), des lagomorphes (lièvres), des fauves (lion, lyacon, panthère, hyène tachetée,...), d'antilopes (le céphalope, le guib harnaché, l'ourébi...) et des rongeurs.

L'avifaune est constituée d'espèces qui présentent des fluctuations saisonnières suivant leur période de nidification.

Les primates sont représentés par quatre espèces de simiens : les babouins ou cynocéphales (*Papio papio*), les patas (*Erythrocebus patas*), les cercopithèques (*Cercopithecus aethiopicus sabaeus*) et les chimpanzés (*Pan troglodytes*). Les prosimiens sont représentés par les galagos (*Galago senegalensis*).

Les animaux domestiques sont constitués de bovins de race Ndama trypanotolérante, d'ovins, de caprins et de la volaille. L'absence d'équins dans la sous-région est due à la trypanosomiase animale ou maladie du sommeil dont l'agent pathogène est un parasite du genre *Trypanosoma* transmis par les Glossines.

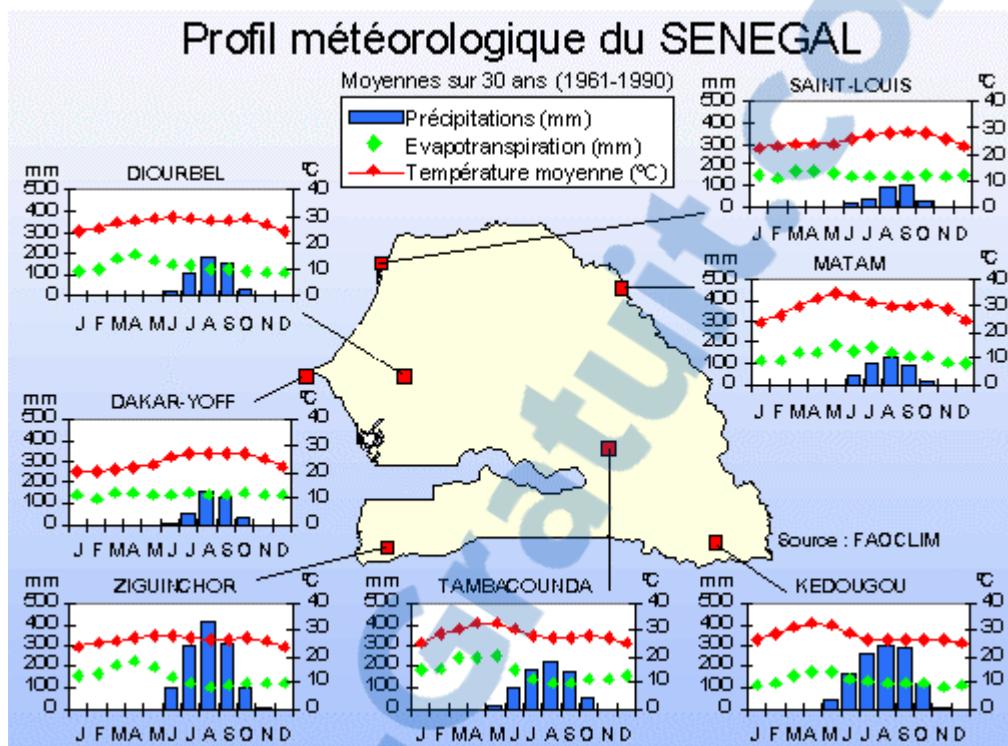
2.2.2.1.3 Climat

Le département de Kédougou se situe entre les isohyètes 1200 mm et 1300 mm (61). Il fait partie des premières zones du pays à être atteintes par la partie active du front intertropical (limite extrême de l'avancée de la mousson) et des dernières à subir son influence. La saison des pluies y débute selon les années, au mois de mai ou plus tard en juin avec des précipitations espacées dans le temps. Ces pluies se régularisent, du mois de juillet au mois de septembre, avant de se raréfier en octobre pour s'arrêter en novembre (**figure 7**).

La continentalité de la région explique les températures généralement élevées (moyenne annuelle de 28,4 °C). Elles varient dans le temps avec les saisons, notamment avec les pluies (juin à novembre). Les minima thermiques (16°C) sont observés au cours du véritable hiver en décembre et janvier (16°C). Les maxima de température (40°C) se situent avant le début des pluies, en mars, avril et mai (**figure 7**).

L'année est marquée par deux régimes hygrométriques : une période humide et une période sèche. L'humidité favorisée par les pluies, est au maximum entre les mois de juillet et octobre ; soit une moyenne mensuelle de 69 %. L'harmattan (vent chaud), avec sa sécheresse et sa forte capacité d'évaporation, est à l'origine d'un climat sec avec des minima hygrométriques variant de 4 % et 5 % depuis le mois de novembre à mai (**figure 7**).

Figure 7 : profil météorologique du Sénégal, le diagramme de précipitations et la courbe de température de Kédougou sont figurés en bas à droite de la figure (FAO CLIM).



2.2.2.1.4 Dégradation du milieu naturel

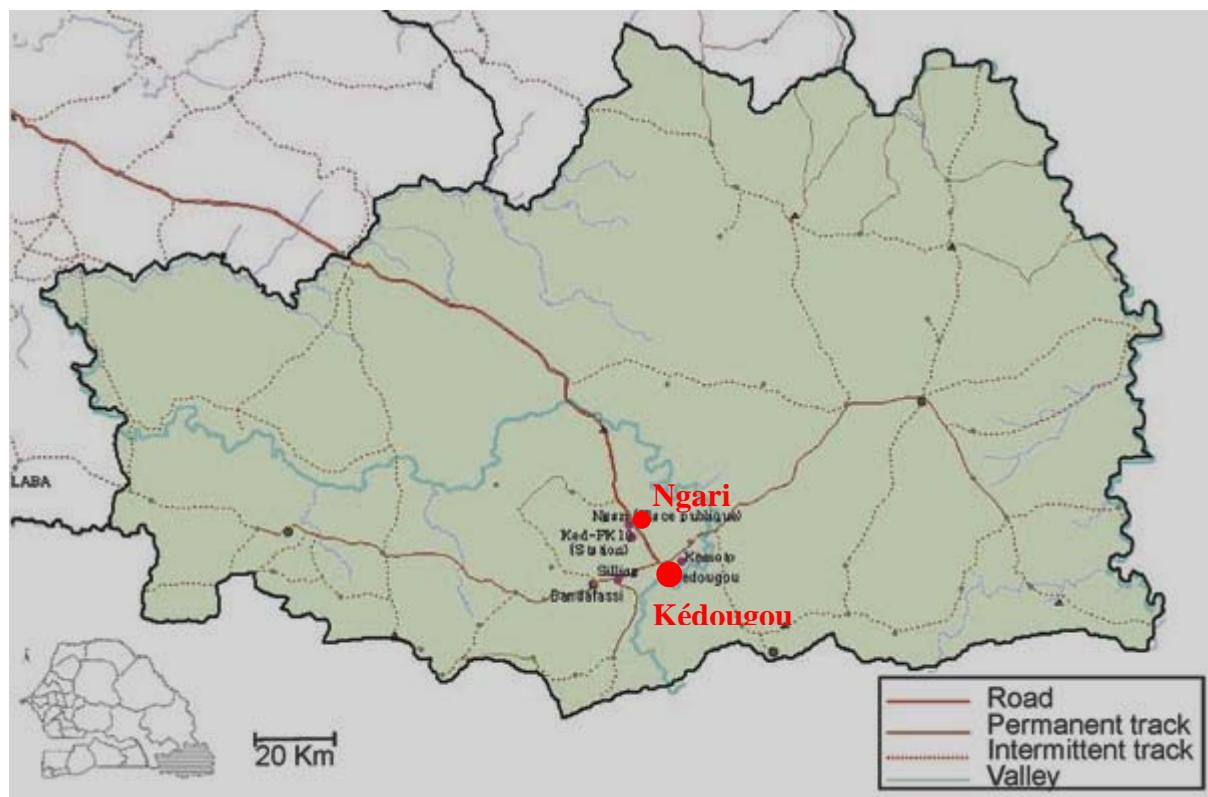
Depuis une dizaine d'années, la dégradation du milieu naturel consécutive aux actions anthropiques (déboisement pour l'obtention de charbon de bois ou bois d'œuvre ; feu de brousse ; transhumance du cheptel) s'est accentuée. Ce phénomène associé à la sécheresse entraîne l'assèchement des cours d'eau et la baisse de la nappe phréatique. Toutes ces actions combinées entraînent la régression du couvert végétal. Les sols sont en général très sensibles à l'érosion hydrique à cause de leur structure, du relief de la région, des courants d'eau pluviales et de l'intensité des pluies. Dans ce contexte, les actions anthropiques sont un élément d'intensification et d'ampliation du processus de dégradation. Ce processus de dégradation a une répercussion sur l'écologie des animaux sauvages.

2.2.2.2 Sites de capture

2.2.2.2.1 Singes sauvages

La zone de capture des singes se situe à proximité du village de Ngari, à 10 km au nord de Kédougou (**figure 8**).

Figure 8 : carte de la région de Kédougou montrant les positions géographiques de la ville de Kédougou et du village de Ngari. Les autres points indiquent les lieux où le virus DEN-2 selvatique a été isolé (12).



Cette zone a été choisie en fonction de différents facteurs :

- présence de zones habitées (Villages de Ngari et Sekoto) et non habitées (galeries forestières)
- présence de singes verts, patas et babouins et de leurs dortoirs
- documentation sur la circulation du virus de la dengue (enquêtes entomologiques, sérologiques) (8,9,33,40,62,68).
- surveillance des arbovirus, notamment par la collecte des vecteurs (tours de capture des moustiques) (40).

Ainsi, pour notre étude, les trois sites qui ont été choisis pour l'emplacement des pièges de capture des singes sont :

- Un site dans une zone habitée : « N » situé à une centaine de mètres du village de Ngari, en bordure d'un champ d'arachide, proche d'arbres fruitiers (manguiers, baobabs, kolatiers,...) qui constituent une réserve de nourriture pour les singes sauvages malgré la présence de l'homme et du bétail (**photo 1**).
- Deux sites dans une zone non habitée : « P » situé à 2-3 km au sud du village de Ngari, appelé « plateau » et « D » à 2-3 km au nord-est de Ngari, appelé « deux rivières ». Ces deux sites sont à proximité d'un marigot temporaire qui constitue un point d'eau, très fréquenté par les animaux en saison sèche, vu la rareté de l'eau. Ces sites sont également situés en lisière d'une galerie forestière, lieu de dortoir pour les singes (**photo 2**).

Photo 1 : filet placé en lisière d'une galerie forestière et à proximité d'un champ dans le lieu (N) dit « Ngari ».

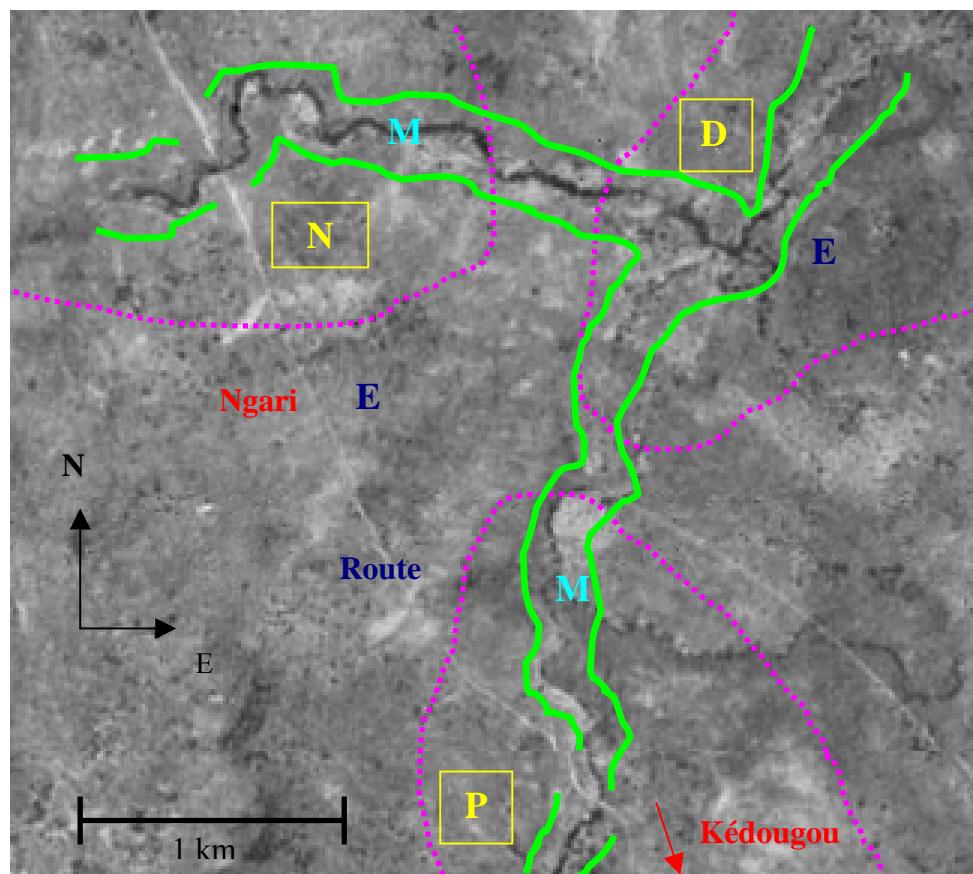


Photo 2 : galerie forestière en lisière du lieu (P) dit « le plateau ».
Ces arbres sont des dortoirs pour les singes.



Ces sites sont visibles sur le cliché aérien (**figure 9**).

Figure 9 : Cliché aérien de la zone d'étude de Ngari (aérodrome de Kédougou).



- Galerie forestière
- Aperçu des domaines vitaux des bandes de singes verts
- M** : marigot
- E** : tour de capture des moustiques
- D** : site de capture des deux rivières
- N** : site de capture de Ngari
- P** : site de capture du plateau

2.2.2.2.2 Singes domestiques

La ville de Kédougou est le quatrième site d'étude (K). 16 singes domestiques appartenant aux trois espèces étudiées ont été recensés et prélevés.

Il est intéressant de prélever ces singes à cause de plusieurs facteurs :

- le contact étroit avec la population humaine
- le contact avec des moustiques provenant des galeries forestières avoisinantes longeant le fleuve Gambie qui entoure la ville de Kédougou
- le contact avec des moustiques se développant sur des gîtes larvaires artificiels et pouvant se déplacer jusqu'aux galeries forestières

Chaque singe prélevé a bénéficié d'un examen clinique et de soins médicaux qui figurent sur une fiche de suivi où sont notés l'identité de l'animal et de son propriétaire, l'examen clinique, le protocole de prélèvement, les soins apportés ainsi que les résultats des sérologies (**annexe 1**).

2.2.3 Espèces étudiées

Les données présentées sur les trois espèces de singe sont issues de l'ouvrage de Dorst et Dandelot, 1970 (18).

2.2.3.1 Babouin de Guinée

2.2.3.1.1 Description

Le babouin de Guinée (*Papio Papio*, Primate, *Cercopithecidae*) a une tête typique qui ressemble à celle d'un chien (cynocéphale) (**photo 3**). La face est glabre et très mobile. Le pelage est rouge brun et forme, chez le mâle, une cape bien développée sur les épaules et le dos. Il tient la queue légèrement incurvée. Le dimorphisme sexuel est important : le mâle adulte, aux fesse glabres, pèse plus de 25 kg alors que la femelle atteint 10 kg.

2.2.3.1.2 Écologie

Aussi bien à l'aise sur terre que dans les arbres, les babouins peuvent se trouver dans tous les types de savane. Leur domaine vital s'étend sur plus de 100 ha, centré sur les galeries forestières où se situent leurs dortoirs. Omnivores opportunistes, ils se nourrissent surtout de parties végétales, fruits, feuilles et racines, mais aussi d'invertébrés et de petits vertébrés. Occasionnellement, ils sont capables de capturer une jeune antilope ou un singe vert. De nombreux arbres dortoirs sont utilisés pour le sommeil nocturne.

2.2.3.1.3 Organisation sociale

Chaque bande comprend plusieurs mâles dominants dont une des fonctions principales est de surveiller. Les groupes familiaux sont constitués de femelles avec leurs petits. La taille d'une bande varie de 10 à 200 individus, mais comprend généralement de 50 à 100. Le noyau stable d'une bande se compose de femelles qui y restent toute leur vie, alors que les mâles quittent la bande à l'adolescence. Les femelles héritent le rang hiérarchique de la mère et le gardent toute leur vie. Les mâles dominants ont une hiérarchie plus complexe qu'ils doivent maintenir par la force et leur habileté à résoudre les conflits par le jeu de coalitions. Les domaines vitaux sont trop grands pour être défendus comme un territoire et peuvent se chevaucher. Cependant des ressources limitées peuvent générer des conflits intergroupes.

2.2.3.1.4 *Comportement*

Le babouin a des répertoires visuel et sonore complexes. Quelques comportements faciles à observer sont la supplantation, quand un individu dominant prend la place d'un subordonné, et la soumission, quand un dominé épouille un dominant. Les aboiements caractéristiques deviennent brefs et explosifs si les babouins ont peur, graves et puissants quand ils sont agressifs. La fréquence des combats dépend de la stabilité du statut hiérarchique des mâles dominants. Les combats sont rares mais sérieux, car les grandes canines tranchantes des mâles peuvent infliger des blessures graves. Les bébés s'accrochent sous le ventre de leur mère puis, après quelques mois, sont portés sur leur dos dans la position des jockeys.

Photo 3 : babouin mâle adulte en déplacement avec son groupe.



Carte de distribution en Afrique



2.2.3.2 Patas, hussard, singe rouge, pleureur

2.2.3.2.1 Description

Le patas (*Erythrocebus patas patas*, Primate, *Cercopithecidae*), avec son corps svelte et ses longues pattes, est souvent surnommé "Lévrier du désert" (**photo 4**). C'est le singe le plus rapide (50 km/h). Le pelage est roux sur le dessus du corps, gris argenté dessous et sur les parties inférieures des membres. Les couleurs des femelles sont moins contrastées. La répartition très variable de poils blancs ou noirs sur la face rose rend les individus aisément reconnaissables. Le mâle adulte (8-10 kg) a le scrotum bleu vif et est deux fois plus grand que la femelle (4-5 kg).

2.2.3.2.2 Écologie

Le patas est une espèce typique des milieux ouverts. Surtout adapté à vivre au sol, il mène une vie semi-terrestre et est également à l'aise dans les arbres. Les patas sont omnivores : ils mangent des fruits, des graines, de l'herbe, des insectes et occasionnellement des petits vertébrés. Ils sont diurnes, avec des phases d'alimentation dans la matinée et l'après-midi, et dorment la nuit dans les arbres. Durant les grosses chaleurs de la journée, ils font la sieste.

2.2.3.2.3 Organisation sociale

Le patas vit généralement en bandes de 15 à 60 individus. L'organisation sociale est de type harémique : un seul mâle adulte contrôle jusqu'à plus de vingt femelles adultes accompagnées de leur progéniture. Les mâles quittent la bande à l'approche de la maturité sexuelle et vivent soit en solitaires, soit rejoignent des bandes de mâles célibataires, soit tentent de prendre le contrôle d'une bande hétérosexuelle, impliquant une forte compétition. Le patas a un grand domaine vital (jusqu'à 80 km²). Le mâle adulte, chef de bande hétérosexuelle, défend les membres de sa bande, plutôt qu'un territoire.

2.2.3.2.4 Comportement

Le répertoire visuel est important et subtil, associant parades gestuelles comme les secouages de branches, les bonds, les " pieds au mur ", à des mimiques faciales variées. Le répertoire vocal est également varié. Le cri d'isolement, appel du jeune à la mère, ressemble à celui d'un bébé humain et vaut au patas son autre surnom de " Singe pleureur ". Le cri fort, un aboiement puissant émis exclusivement par le mâle adulte, est utilisé pour intimider les tentatives d'approche des mâles rivaux et rassemble les membres de la bande en cas de danger. Sa stratégie anti-prédateur est très efficace. Le mâle adulte se met en évidence, et tout en surveillant sa bande, détourne ostensiblement sur lui l'attention des prédateurs. Sa vitesse de pointe de 55 km/h, plus rapide que celle de ses prédateurs, le met lui-même rapidement hors de danger.

Photo 4 : patas mâle sub-adulte.



Carte de distribution en Afrique



2.2.3.3 Singe vert ou callitriche

2.2.3.3.1 Description

Le singe vert (*Cercopithecus aethiops sabaeus*, Primate, *Cercopithecidae*) est reconnaissable à son pelage gris olive, au dessous du corps blanchâtre. La face est noire avec des favoris blancs (**photo 5**). La queue est longue avec l'extrémité fauve. Seul le mâle dominant a le scrotum bleu vif (**tableau 1**).

Tableau 1 : Caractères morphologiques et classes d'âge du mâle et de la femelle du singe vert. (adapté d'après STRUHSAKER (66)).

Classe d'âge	E1 (enfant 1)	E2 (enfant 2)	J (juvénile)	SA (sub-adulte)	A (adulte)
Age (mois)	0-3	3-12	12-36	4-5 ans	> 5 ans
Caractères morphologiques	Porté en permanence Pelage noir	Détachement occasionnel Changement couleur pelage	Taille non adulte Pas de caractères sexuels secondaires	Taille adulte Pas de caractères sexuels secondaires	Taille adulte Caractères sexuels secondaires Testicules bleus pour le mâle Tétons visibles dépassant la fourrure pour la femelle

2.2.3.3.2 Écologie

On trouve le singe vert dans les habitats boisés, excepté dans les forêts humides et les semi-déserts. Il ne s'observe jamais loin des points d'eau. Bien qu'il soit souvent vu au sol, il ne s'éloigne pas des arbres qui lui procurent l'essentiel de sa nourriture et la sécurité. Omnivore opportuniste, il consomme fruits, graines, fleurs, feuilles, graminées, pousses, épines, écorce, gomme d'Acacia et aussi invertébrés et petits vertébrés : œufs d'oiseaux, oisillons, moineaux, tourterelles, lézards, rats, levrauts. Il est diurne, avec des phases d'alimentation le matin et l'après-midi.

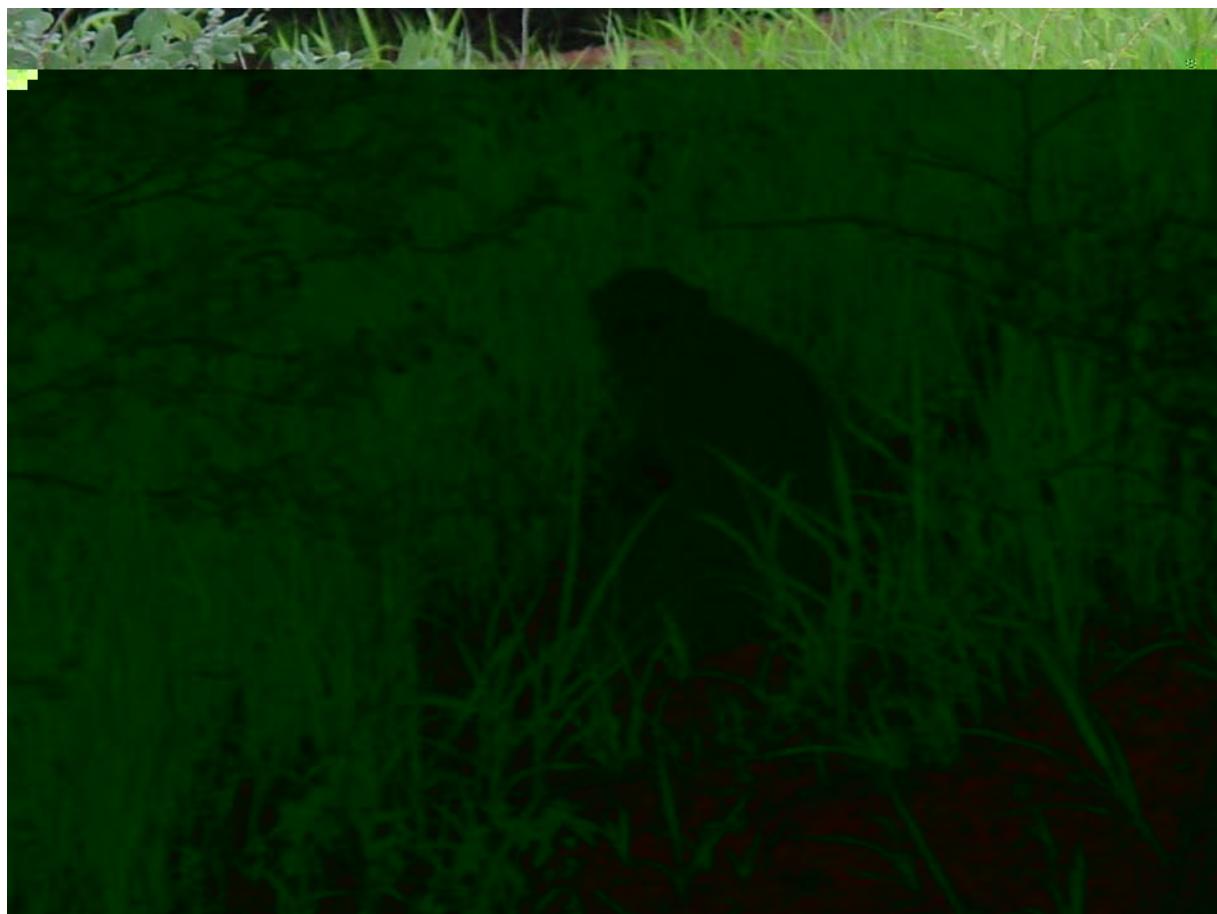
2.2.3.3.3 *Organisation sociale*

Au Sénégal, les bandes, multi-mâles et multi-femelles, comptent de 10 à plus de 100 individus. Cette extrême variabilité, unique chez les Cercopithèques, est liée aux conditions de disponibilités alimentaires. Si le milieu est riche, les singes verts vivent en petits groupes sur de petits domaines vitaux réunissant l'essentiel de la diversité végétale de la région. Le mâle dominant les défend matin et soir à l'aide de parades territoriales très ritualisées. Le reste de la bande peut participer. Si le milieu est pauvre, de très grandes bandes se partagent les ressources sans compétition. La hiérarchie des mâles est liée à leur charisme, leur aptitude à former des coalitions. Les mâles quittent leur bande et gravissent la hiérarchie de la bande d'accueil en faisant la cour aux femelles.

2.2.3.3.4 *Comportement*

Le répertoire comportemental du singe vert a été bien décrit : quelques 36 sons et 60 gestes ont été décrits. Les vocalisations d'alarme distinguent les prédateurs peu ou très dangereux, aériens ou terrestres et les serpents. Les mâles règlent les conflits interindividuels par des parades de dominance en se grandissant de profil, la queue recourbée sur le dos, et les conflits territoriaux par des bonds, un aboiement inspiré-expiré et une exhibition thoraco-abdominale mettant en évidence l'abdomen blanc, le pénis rouge et le scrotum bleu. Les relations privilégiées sont maintenues par de fréquents épouillages mutuels. Les jeunes sont portés sous le ventre et pris en charge par différentes femelles dès leur plus jeune âge. Les jeux, apprentissage de la vie adulte, sont très variés.

Photo 5 : singe vert femelle adulte portant son enfant.



Carte de distribution en Afrique



2.2.4 Protocole d'étude de terrain

2.2.4.1 Prospection

L'étape préliminaire de la prospection est importante et nécessaire pour déterminer :

- les bandes de singes présentes dans le milieu,
- les espèces présentes,
- l'effectif et la composition des bandes,
- les domaines vitaux et la localisation des dortoirs
- le rythme d'activité des singes

afin de pouvoir choisir les sites de capture et mettre en place les dispositifs de piégeage.

Cette étape dure plus d'un mois et est basée sur l'observation des bandes de singes et l'appâtage. Les observations sont notées par l'observateur sur un carnet d'observation.

La première étape consiste à se renseigner auprès des habitants de la zone d'étude s'ils ont vu des bandes de singes dans les environs.

La deuxième étape est de se rendre où les singes sont passés, généralement près d'un point d'eau et d'une galerie forestière.

La troisième étape consiste en l'observation visuelle (à l'aide de jumelles) et auditive (les cris de chaque espèce de singe sont caractéristiques et facilement reconnaissables).

Une fois les circuits journaliers des singes repérés, leurs dortoirs visualisés, les singes sont appâtés à l'aide de circuit de graines d'arachides jusqu'au site de capture.

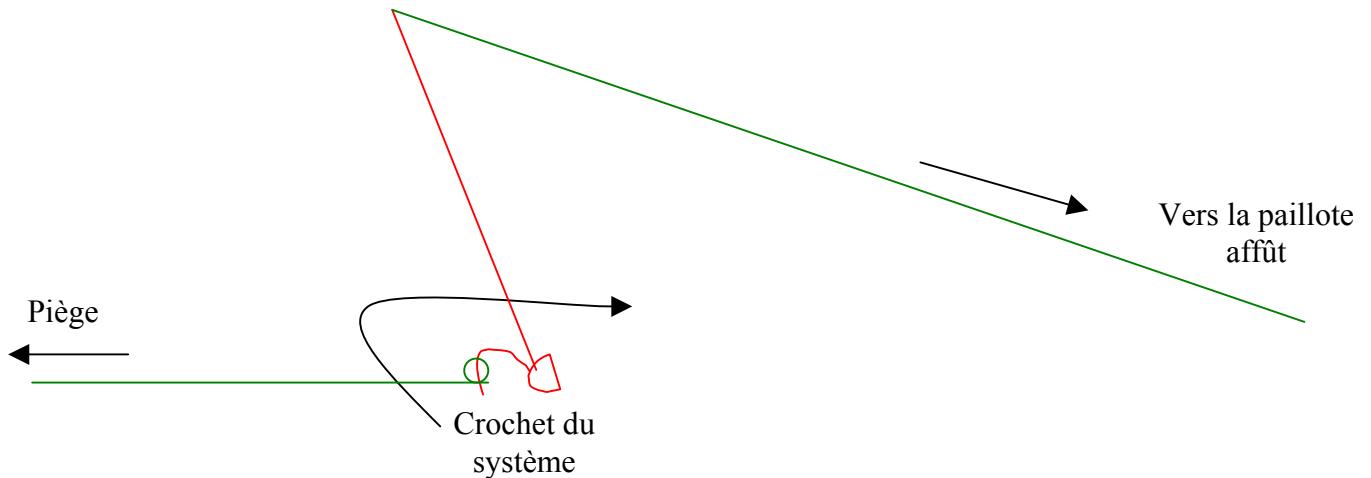
2.2.4.2 Mise en place des pièges et capture

Nous avons utilisé deux systèmes de capture : un dispositif léger de capture simple et efficace, adapté pour les singes verts et les patas (45) et d'un dispositif lourd plus spécifique et efficace pour la capture des cynocéphales.

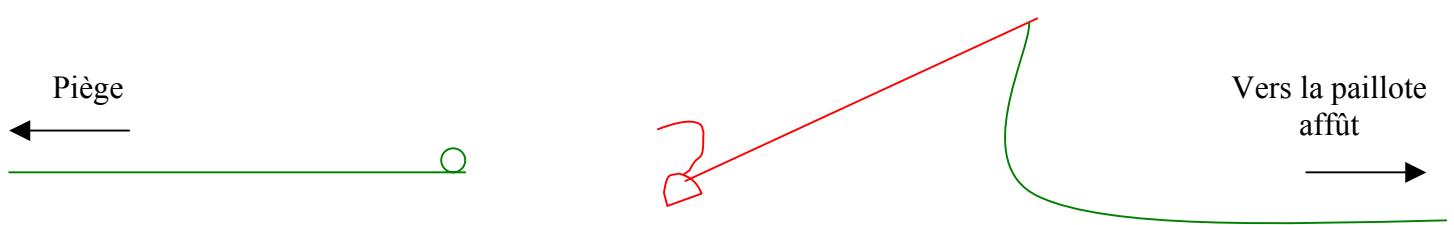
Le dispositif léger est un filet de pêche monté comme une tente rectangulaire de 4m sur 6 ; les mailles d'environ 16 cm² sont en nylon résistant (**photo 6**). Une branche surplombe l'entrée et stabilise l'ensemble. Les six poteaux de soutien en PVC sont maintenus en équilibre par un système (**figure 10**) qui doit être déclenché à distance à l'aide d'une corde qui aboutit à une paillote affût distante selon les sites entre 80 et 100 m. Lorsqu'on tire sur la corde, les poteaux basculent et entraînent le filet, la branche fermant l'entrée.

L'immobilisation de singes sous le filet se fait en douceur au moyen de « raquettes ». Ce sont des cadres rectangulaires en bois, d'environ 80 cm/50 cm, munis de manches et sur lesquels s'attache un second filet.

Figure 10 : système de déclenchement des pièges de capture (poteaux du filet ou porte de la cage).



Système de déclenchement à l'équilibre : les cordes de maintien de l'entrée du piège et de la corde aboutissant à la paillette-affût sont maintenues tirées.



Système de déclenchement relâché : l'observateur a tiré sur la corde depuis la paillette-affût, la corde de maintien du piège s'est décroché de l'anneau du système et est maintenant relâchée, les poteaux du filet ou la porte de la cage sont tombés au sol.

L'autre dispositif, plus lourd est une cage en fer rectangulaire de 3 m sur 4, formée de panneaux métalliques dont les mailles sont en grillage (**photo 7**). L'armature est formée de poteaux plantés dans le sol. Les panneaux viennent recouvrir les quatre côtés de la cage. Un grillage est appliqué sur le toit pour assurer la cohésion et la solidité de l'édifice. Deux poteaux sont plantés dans le sol au niveau de l'ouverture de la cage et servent de cadre à la porte grillagée coulissante, de 2 x 2 m. Celle-ci est maintenue en équilibre à 1 mètre du sol par un système de poulie dont la corde de maintien aboutit au système de déclenchement précédemment décrit. La corde aboutit à la paillote affût. Lorsqu'on tire sur la corde, la porte se ferme, maintenant les singes en captivité.

A l'arrière de la cage se trouve une porte coulissante qui permet aux singes de se diriger dans une cage de contention rectangulaire de 80 cm sur 50 cm où ils seront anesthésiés.

Néanmoins, une capture efficace n'a pu avoir lieu qu'après la réalisation d'étapes préliminaires :

- ◆ Pose sur le sol d'un tas d'arachide (environ 20 kg) à l'endroit où sera disposé le système de capture (filet ou la cage), pour que les singes prennent l'habitude de venir s'y alimenter
- ◆ Installation du piège à distance du tas d'arachide pour que les singes s'habituent à la présence du dispositif
- ◆ Déplacement par étapes des arachides au fond du piège pour que les singes y entrent complètement.

Photo 6 : dispositif de capture léger (filet) dans le lieu (D) dit « les deux rivières ». Un tas d'arachide posé sur le sol est visible au fond du filet.



Photo 7 : dispositif de capture lourd (cage) situé dans le lieu (P) dit « plateau ». A droite de la cage, la cage de contention est visible.



Toutes les observations concernant les singes et leurs mouvements autour et dans le piège sont reportées sur un carnet d'observation (**annexe 2**).

Cependant, plusieurs facteurs sont intervenus pour influencer la fréquentation du piège par les singes :

- Les conditions météorologiques : un vent important et un rafraîchissement de l'atmosphère ont provoqué une baisse d'activité des singes et donc un déplacement moindre.
- La compétition alimentaire, notamment entre singes verts et Patas, ces derniers numériquement supérieurs occupant le plus souvent seuls les pièges.
- Les relations de dominance qui ont empêché un ou plusieurs individus de s'approcher des arachides ou même d'entrer simultanément dans le piège.
- La présence d'animaux domestiques, notamment des bovins, ovins, friands d'arachides, qui ont fait fuir systématiquement tous les singes.
- La proximité avec les hommes et notamment les enfants, qui ont perturbé l'entrée des singes dans le piège.

L'heure limite de capture a été fixée à 15 h pour permettre sans risque aux derniers individus anesthésiés de se réveiller, retrouver leur bande ou regagner directement leur dortoir, ceci afin de permettre une recapture ultérieure.

2.2.4.3 Protocole de prélèvement

Une fois capturés, les singes ont été anesthésiés (45). Lorsqu'un singe n'était pas suffisamment endormi au moment de la manipulation, nous lui avons injecté une demi-dose d'anesthésique supplémentaire.

A chaque fois que cela a été possible, il a été effectué :

- Un examen clinique (**photo 8**)
- Une pesée
- La détermination du sexe et de l'âge (**tableau 1**),
- Une prise de sang par ponction fémorale,
- Un tatouage au bras
- Chez les adultes, un marquage par pose d'un collier portant un code couleur (ou « cravate »).

Le matériel utilisé est décrit ci-dessous :

- Anesthésie :
 - Seringues et aiguilles à insuline à usage unique.
 - Imalgène 1000[®] (kétamine) à la dose de 10 mg/kg.
- Prélèvements sanguins :
 - Seringues 5 ml ou 10 ml et aiguilles (0,6 et 0,8 mm de diamètre) à usage unique.
 - Tubes secs.
 - Désinfection : alcool, eau de javel et coton.
- Pesée :
 - Filet de pesée
 - Pesons de 5, 10 et 20 kg.
- Tatouage :
 - Dermographe adaptable sur 12 V.
 - Encre de Chine.
 - Huile de paraffine (qui facilite l'imprégnation de l'encre).
 - Aiguilles interchangeables.
- Marquage :
 - Colliers de tailles différentes
 - Bande colorée en code, fixée au collier.

(photos 9, 10, 11, 12, 13)

Les singes ont été relâchés à vue et leur réveil contrôlé (**photo 14**).

Photo 9 : anesthésie du singe capturé et maintenu plaqué au sol grâce à une raquette en filet.



Photo 8 : examen clinique du singe anesthésié et tatoué.



Photo 10 : prélèvement sanguin du singe anesthésié par ponction de la veine fémorale.

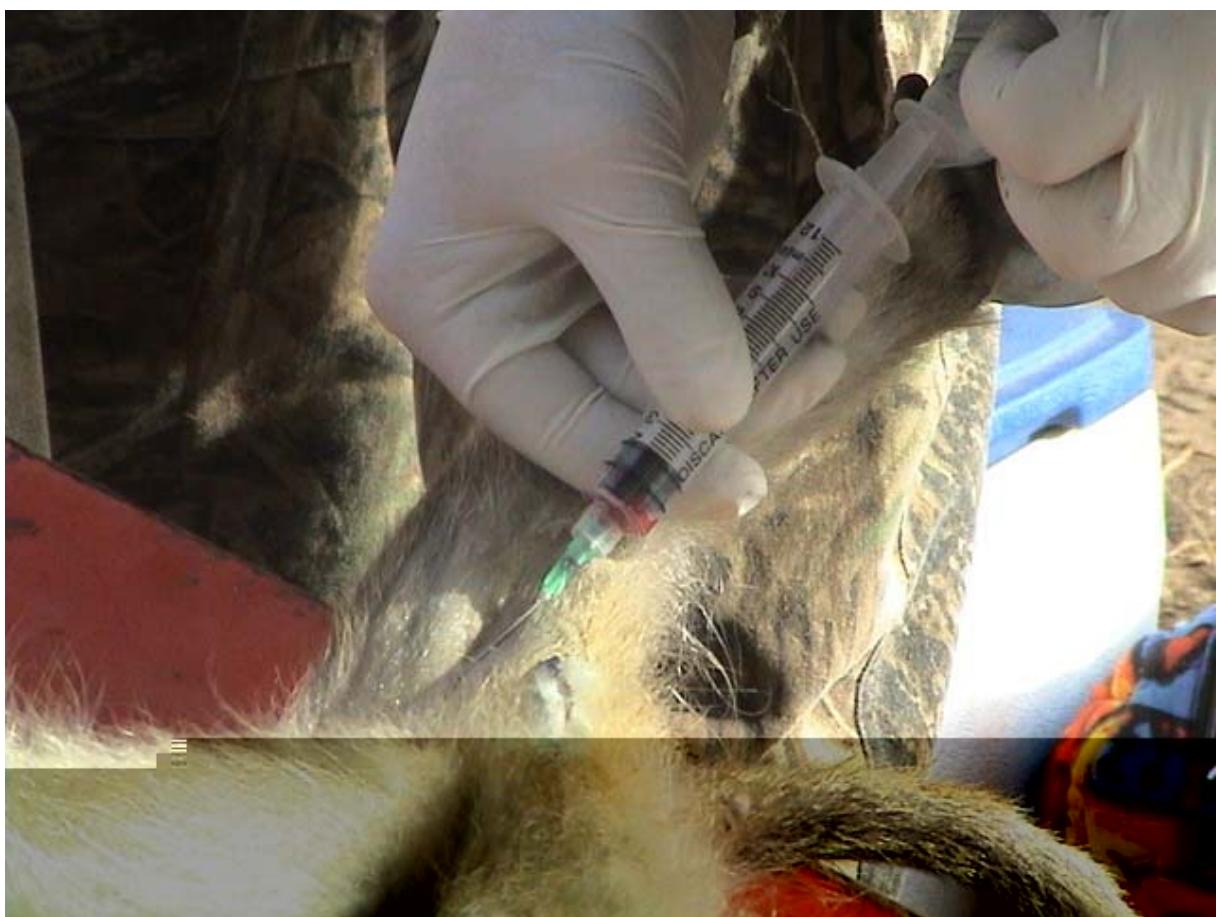


Photo 11 : pesée du singe anesthésié à l'aide d'un filet et d'un peson de 20kg.



Photo 12 : tatouage à l'aide d'un dermographe et d'encre de Chine de la face médiale du bras gauche du singe capturé.



Face médiale du bras gauche tatouée d'un patas capturé.

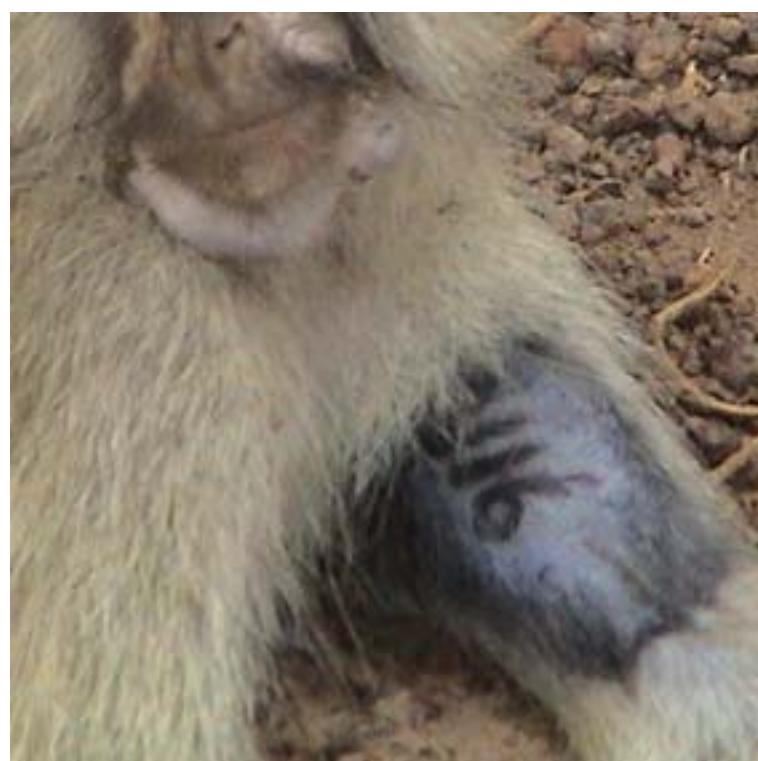


Photo 13 : marquage d'un singe capturé à l'aide d'un collier et d'une cravate colorée.



Photo 14 : réveil à vue de deux patas mâles adultes anesthésiés.



Ce protocole d'anesthésie et de prélèvement a été suivi pour le prélèvement des singes domestiques à Kédougou.

Pour chaque animal prélevé, un code de terrain, comportant une lettre correspondant au lieu de prélèvement (N,K,P,D) et un chiffre d'ordre de prélèvement, a été attribué et noté sur chaque tube de prélèvement avec la date.

Pour les singes recapturés et présentant déjà un tatouage, le code de terrain est précédé du préfixe « Re ».

Conservés dans une glacière entre + 4 et + 8 °C, les prélèvements de sang ont été ramenés à Kédougou où ils ont été centrifugés. Les sérums des prélèvements sanguins de singes ont été récupérés dans des tubes de 2 ml, le caillot de sang a été également mis dans des tubes de 2 ml.

Les tubes contenant les sérums ont ensuite été placés dans une bonbonne contenant de l'azote liquide avant d'être acheminés à l'Institut Pasteur de Dakar où ils ont été mis dans un congélateur à – 70°C avant analyse.

2.2.5 Techniques biologiques utilisées

Les techniques biologiques utilisées pour l'analyse des sérum de singes sont des techniques de référence du diagnostic humain. Ces techniques pratiquées dans le centre de référence collaborateur OMS sont normalisées (43).

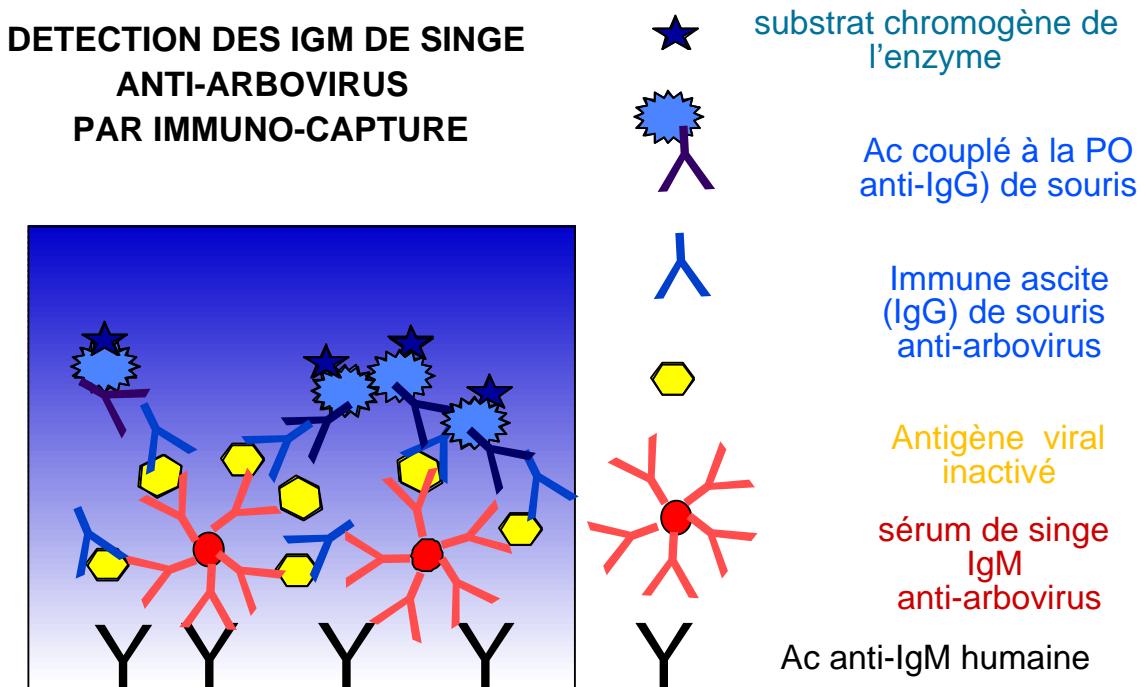
2.2.5.1 Technique immunoenzymatique (ELISA)

Le matériel nécessaire est listé en **annexe 3**.

Pour la détection des IgM anti-dengue 2, nous avons adapté la technique « IgM antibody-capture enzyme linked immunosorbent assay » (MAC-ELISA) décrite par Saluzzo (64).

La méthode en **annexe 4** décrit l'utilisation du titrage immunoenzymatique pour la recherche dans les sérum des singes, des IgM dirigés contre les virus de la fièvre jaune (YF), de la fièvre de West Nile (WN), de Chikungunya (CHIK) et de la dengue 2 (DEN-2) (**figure 11**).

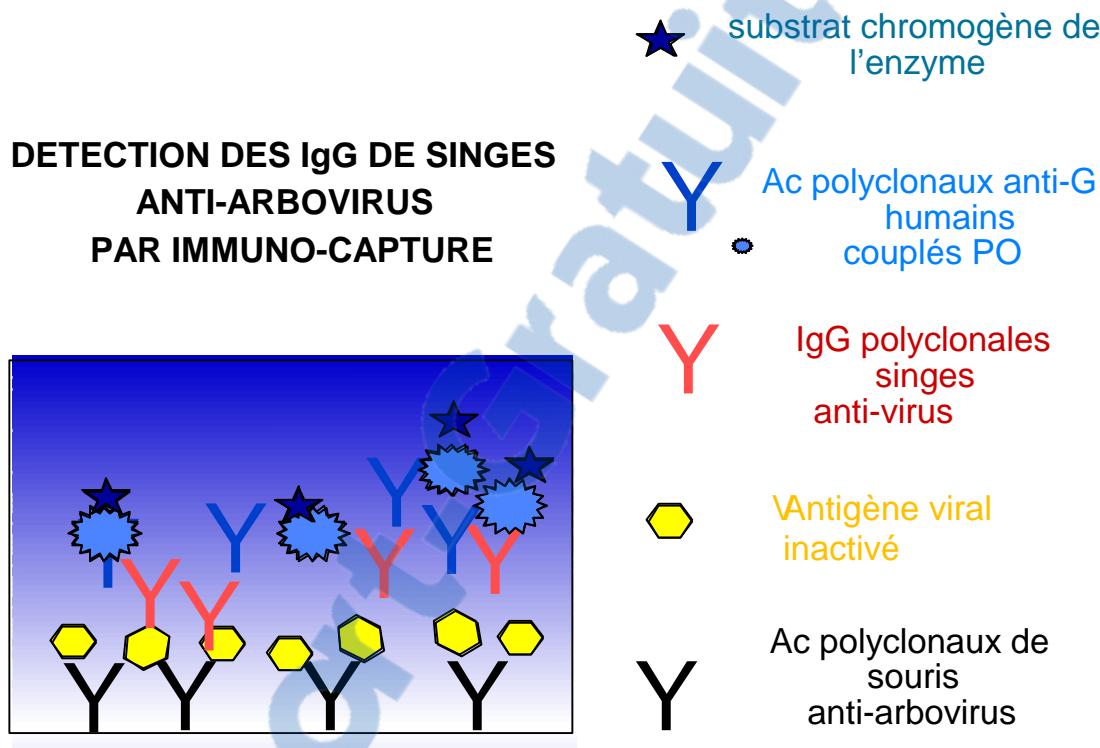
Figure 11 : schématisation des étapes de l'ELISA pour la détection des IgM de singe anti-arbovirus.



Pour la détection des IgG anti-dengue 2, nous avons adapté la technique ELISA décrite par Thonnon (67).

La méthode en **annexe 6** décrit l'utilisation du titrage immunoenzymatique pour la recherche dans les sérums des singes, des IgG dirigés contre les virus de la fièvre jaune (YF), de la fièvre de West Nile (WN), de Chikungunya (CHIK) et de la dengue 2 (DEN-2) (**figure 12**).

Figure 12 : schématisation des étapes de l'ELISA pour la détection des IgG de singe anti-arbovirus.



2.2.5.2 Isolement sur cultures cellulaires et IFI

La méthode utilisée est bien connue puisqu'elle est utilisée dans le cadre de la surveillance des arbovirus (8). Elle a été décrite par Digoutte *et al.*(16,17).

Nous avons cultivé des cellules de moustiques AP61. Nous les avons ensuite inoculées par les sérums de singes prélevés. Huit jours après, nous avons récolté les cellules inoculées. Par la technique d'immunofluorescence indirecte, nous avons dépisté les sérums de singe porteurs d'arbovirus. Le protocole utilisé est décrit en **annexe 7**.

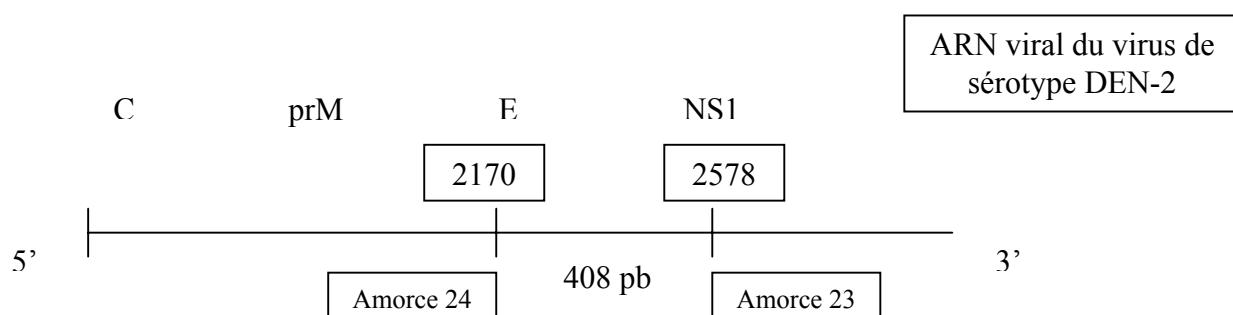
2.2.5.3 Extraction de l'ARN et RT-PCR

La RT-PCR vient en appui et offre de réelles possibilités dans le cadre du diagnostic des arbovirus en plus des études d'épidémiologie moléculaire.

Nous avons extrait l'ARN viral dans les sérums des singes prélevés par la méthode QIAGEN® (**annexe 8**).

La méthode de RT-PCR utilisée a été décrite par Deubel *et al.* (14).

La zone du génome spécifique du sérotype DEN-2 qui est amplifié, est situé entre le nucléotide 2170 et le nucléotide 2578, ce qui correspond à une partie du gène codant pour la protéine E et à une partie du gène codant pour la protéine NS1 :



Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

23 5' TTACTGAGCGGATTCCACAGATGCC 3'
24 5' ATGCCATTAGGTGACACAGCCTGGGA 3'

La méthode a été adaptée au kit RT-PCR TITAN® (laboratoires Roche) (**annexe 9**).

Nous avons visualisé les amplificats issus de la RT-PCR sur gel d'agarose et sous lampe UV (**annexe 10**).

2.2.6 Analyse des données

Toutes les données recueillies sur les singes capturés (code de terrain, singe domestique, singe sauvage, espèce, sexe, âge, poids, date de prélèvement, observation) ont été reportées dans une base traitée sur Excel® (**annexe 11**). Chaque singe capturé (domestique ou sauvage) a été prélevé. Toutes les données relatives aux sérologies et aux données sur les singes ont été traitées par le logiciel Excel®.

Les résultats statistiques obtenus ont été soumis au test χ^2 avec un seuil de positivité p de 0,05. Par respect du critère de validité du test χ^2 : « les effectifs théoriques sont supérieurs ou égaux à 5 », certaines classes des catégories de faibles effectifs ont été regroupées.

2.3 Résultats

2.3.1 Singes

51 singes ont été capturés sur la période de juin 2002 à juin 2003 (**tableau 2**). Parmi ces 51 singes capturés, 11 étaient des animaux recapturés. Par conséquent, 62 sérums ont été prélevés.

Parmi ces 51 singes distincts capturés, 16 singes étaient les singes domestiques prélevés à Kédougou, les 35 autres étaient des singes sauvages ayant été capturés sur les différents sites décrits plus haut. Parmi les 11 singes recapturés, 8 étaient des singes domestiques et 3 étaient des singes sauvages.

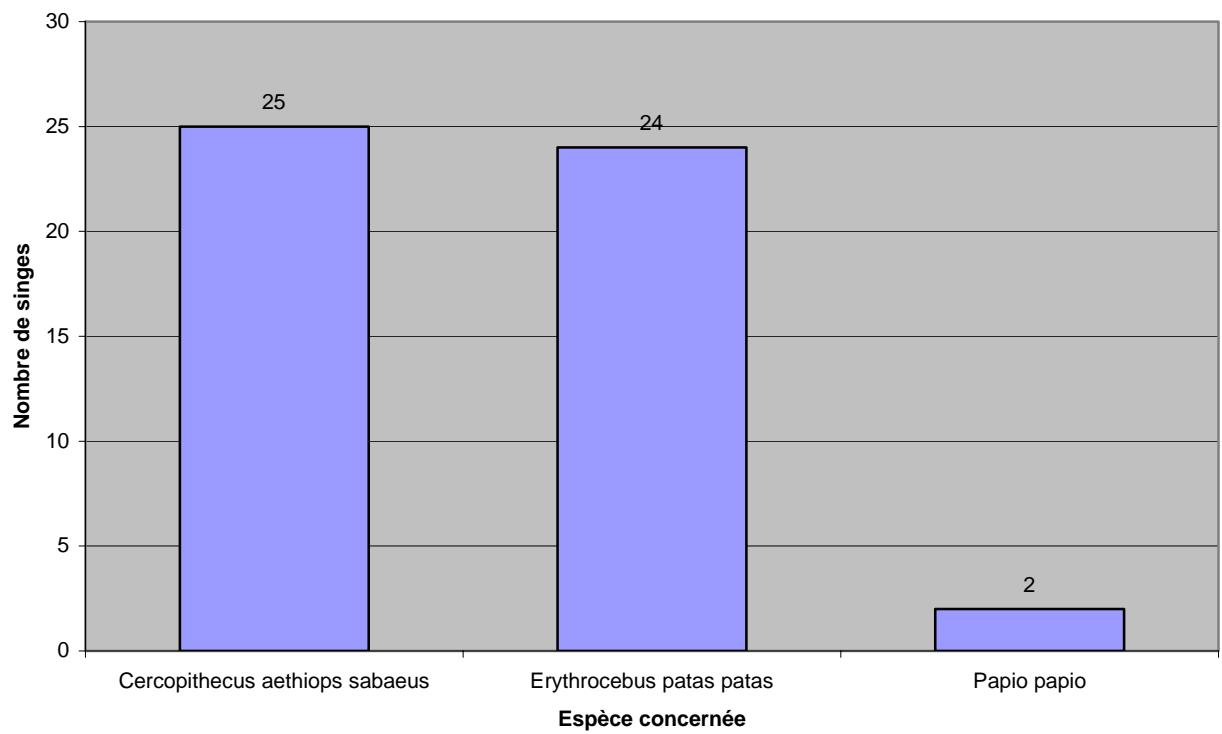
Parmi les espèces de singe concernées, 25 singes verts et 24 patas ont été capturés (**figure 13**). Seulement 2 singes étaient des babouins et correspondaient à 2 singes domestiques prélevés à Kédougou.

Des bandes de babouins, de plus de 30 individus, ont été observées régulièrement sur les sites de capture mais ils ne s'aventuraient pas dans les pièges. Plusieurs causes étaient possibles : la taille des pièges utilisés n'était pas adaptée à leur grande taille ; ces animaux grégaires et agressifs étaient plus méfiants que les autres espèces de singes ; ces animaux se déplaçaient sur de longues distances et sont des omnivores opportunistes, ce qui peut expliquer qu'à l'approche des pièges ils avaient déjà trouvé leur nourriture. Ils avaient par ailleurs un rythme d'activité les conduisant à se déplacer sur de longues distances et à moins fréquenter les pièges que les autres espèces.

Tableau 2 : nombre de singes capturés, recapturés et de sérums prélevés.

	singes domestiques	singes sauvages	Total
nombre de singes distincts capturés	16	35	51
nombre de singes recapturés	8	3	11
nombre de sérums prélevés	24	38	62

Figure 13 : Nombre d'individus capturés par espèce.



17 des 51 singes distincts capturés étaient des femelles et 34 étaient des mâles, soit 2 mâles pour une femelle. Mais un biais existait puisque 10 femelles étaient des singes domestiques et donc des individus isolés. L'écart observé dans les proportions de femelles dans les groupes de singes domestiques et sauvages est significatif ($p = 0,002$) (**tableau 3**). Ainsi, pour mieux comprendre le déséquilibre mâle/femelle dans les bandes de singes sauvages, il ne faut considérer que les singes sauvages (**figure 14**). Peu de femelles sauvages ont été capturées (7) par rapport aux mâles (28), soit une femelle pour 4 mâles (**tableau 3**). Ce phénomène démographique a été remarqué lors des observations (**extrait de carnet de bord, annexe 2**). En effet des bandes de mâles solitaires étaient présentes, montrant le manque de femelles pour former des groupes hétérosexuels, surtout pour le patas.

Figure 14 : nombre de singes capturés, mâles et femelles en fonction du type (d : domestique, s : sauvage) et de l'espèce.

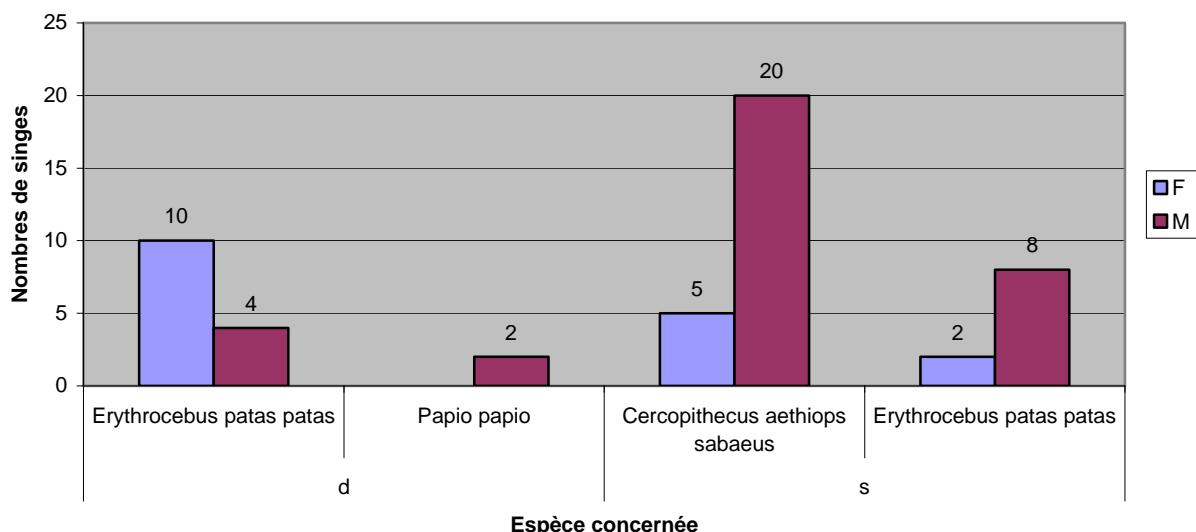


Tableau 3 : nombre de singes capturés mâles et femelles dans les groupes de singes domestiques et sauvages.

	Femelles	Mâles	TOTAL
Domestiques	10	6	16
Sauvages	7	28	35
TOTAL	17	34	51

$P = 0,002$

Concernant l'âge des 51 singes distincts capturés, 29 singes étaient des juvéniles, 13 singes étaient des adultes, 6 singes étaient des sub-adultes et 3 singes étaient des enfants 2 (**figure 15**). Cette répartition était intéressante car elle comprenait toutes les catégories d'âge et surtout de jeunes animaux dont on veut connaître le profil sérologique vis-à-vis du virus de la dengue. Cependant les faibles effectifs des différents groupes d'âge nous ont obligés à les regrouper en deux catégories, adultes et jeunes, afin de respecter un des critères de validité d'application du test ² (effectif théorique supérieur ou égal à 5). L'écart observé dans les proportions d'adultes dans les groupes de singes domestiques et sauvages est significatif ($p= 0,01$) (**tableau 4**). Ceci peut s'expliquer par le fait que les singes domestiques sont de jeunes singes trouvés ou capturés dans la brousse.

Figure 15 : nombre de singes capturés en fonction de l'âge.

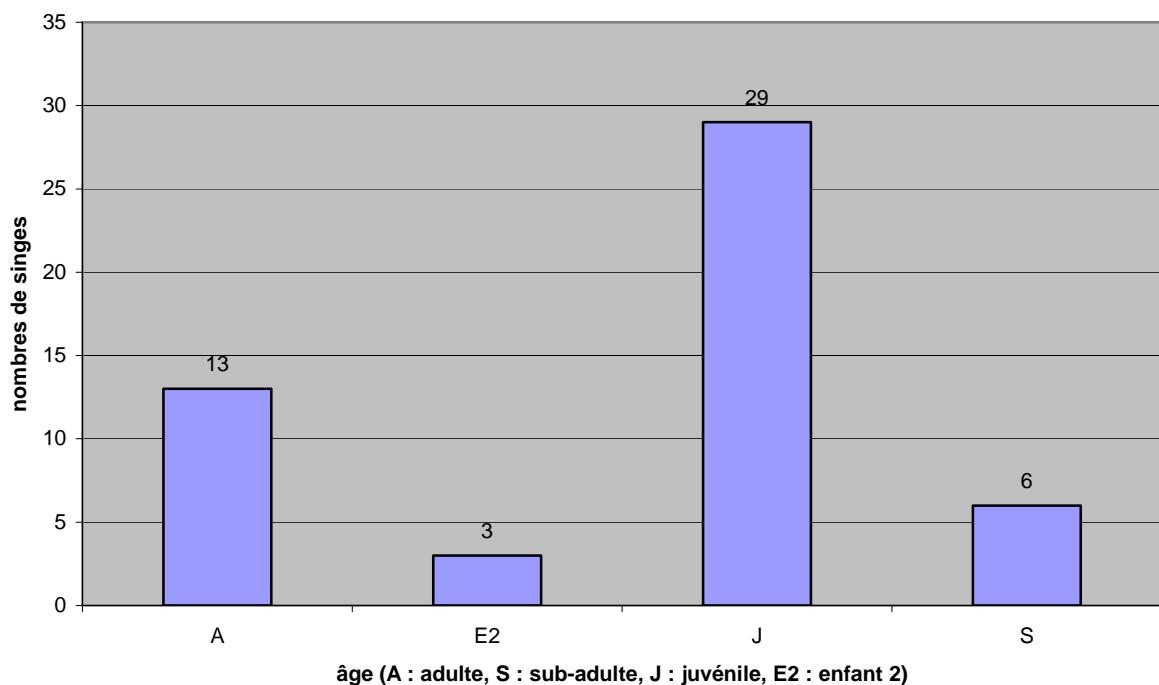


Tableau 4 : nombre de singes capturés en fonction de l'âge (E2 : enfant 2, J : juvénile, S : sub-adulte, A : adulte)

	S	A	<i>adultes</i>	E2	J	<i>jeunes</i>	TOTAL
Domestiques	0	2	2	1	13	14	16
Sauvages	6	11	17	2	16	18	35
TOTAL	6	13	19	3	29	32	51

$P = 0,01$

Le nombre de singes prélevés par mois n'a aucune signification statistique puisque la capture dépendait de facteurs liés à la disponibilité humaine et en matériel. Au mois de juin 2002, 16 singes ont été capturés ; 5 singes ont été capturés pendant la mission d'août 2002 ; 8 singes pendant la mission d'octobre-novembre 2002 ; 6 singes pendant la mission de décembre 2002, 4 singes pendant la mission d'avril-mai 2003, 12 singes pendant la mission de juin 2003, soit 51 singes prélevés en 6 missions. Cependant il est intéressant de voir la répartition du nombre de captures pendant notre période d'étude afin d'améliorer les prochaines saisons de capture et d'avoir des captures réparties de façon homogène sur toute l'année.

La pertinence de la méthode d'échantillonnage sera abordée dans la discussion.

2.3.2 Sérologie par ELISA

Les résultats sont donnés en densités optiques et validés à partir des sérum témoins selon la méthode décrite dans l'**annexe 12**.

Aucun résultat positif n'a été détecté sur les 62 sérum de singe pour la recherche en IgM anti-DEN-2, anti-YF, anti-WN et anti-CHIK.

La démarche de calcul et d'interprétation des résultats est exactement la même pour la recherche en IgG anti-DEN-2, anti-YF, anti-WN et anti-CHIK.

Sur les 62 sérum de singe analysés, 13 sérum possèdent des anticorps IgG dirigés contre le virus de la fièvre jaune et parmi ces 13 sérum, 3 sérum ont également une réponse positive contre le virus West-Nile. La positivité de ces sérum a été confirmée par titrage immunoenzymatique (**annexe 13**). Le fait que ces 3 sérum aient donné une réponse positive sur l'antigène YF et WN s'explique par des réactions croisées entre les différents arbovirus étudiés ou par une co-infection. Ce phénomène de réactions croisées sera évoqué plus tard.

Certaines plaques présentaient un bruit de fond élevé qui semait le doute sur la positivité de certains résultats. Les résultats douteux ont été infirmés par la réalisation de plaques avec une meilleure technique, après analyse des réactifs et donc un bruit de fond moins élevé.

Aucune présence d'anticorps (IgM et IgG) dirigés contre le virus de la dengue 2 n'a été mise en évidence.

Si l'on compare les sérum positifs et négatifs aux données démographiques sur les singes capturés, nous pouvons constater :

- aucun singe domestique ne possède d'anticorps anti-arbovirus, même après l'analyse du second prélèvement pour les recapturés (**tableau 5**).
- les singes capturés puis recapturés ne possèdent pas d'anticorps anti-arbovirus et n'ont pas d'évolution dans leur profil sérologique vis-à-vis des arbovirus (**tableau 5**).
- les singes positifs ont été capturés sur les trois sites, anthropique et non anthropiques (**tableau 6**).
- les singes positifs ont surtout été capturés en juin et août 2002 et juin 2003, soit avant le début de la saison des pluies (**tableau 7**).

Tableau 5 : Nombre de sérums présentant des Immunoglobulines de type G dirigées contre le virus de la fièvre jaune (IgG YF positif) en fonction du type de singe (domestique ou sauvage) et du statut des singes (capturés ou recapturés).

Type de singes	Statut des singes	IgG YF positif	IgG YF négatif	TOTAL
Domestiques	Capturés	0	16	16
	Recapturés	0	8	8
Sauvages	Capturés	13	22	35
	Recapturés	0	3	3
TOTAL		13	49	62

Tableau 6 : Nombre de sérums, prélevés sur les 51 singes distincts, présentant des Immunoglobulines de type G dirigées contre le virus de la fièvre jaune (IgG YF positif) en fonction du site de capture des singes.

Lieu de capture	IgG positif	IgG négatif	TOTAL
Kédougou	0	16	16
Deux-rivières	3	4	7
Ngary	4	15	19
Plateau	6	3	9
TOTAL	13	38	51

Tableau 7 : Nombre de sérums, prélevés sur les 51 singes distincts, présentant des Immunoglobulines de type G dirigées contre le virus de la fièvre jaune (IgG YF positif) en fonction de la saison de capture.

Saison de capture	IgG YF positif	IgG YF négatif	TOTAL
Juin 2002	3	13	16
Août 2002	3	2	5
Oct-nov 2002	0	8	8
Décembre 2002	1	5	6
Avril-mai 2003	1	3	4
Juin 2003	5	7	12
TOTAL	13	38	51

Si l'on ne considère que les 35 singes sauvages (51 singes capturés et prélevés moins les 16 singes domestiques de Kédougou), 13 singes sauvages possédaient des IgG anti-virus de la fièvre jaune, dont 10 étaient des singes verts et 3 étaient des patas.

(tableau 8). L'écart observé dans les proportions de singes positifs dans les groupes de singes verts et de patas n'est pas significatif ($p= 0,18$). La pertinence de l'échantillonnage sera abordée dans la discussion.

Tableau 8 : Sérologie des singes sauvages prélevés en fonction de l'espèce.

Espèce	IgG YF+	IgG YF -	Total
Cercopithecus aethiops sabaeus	10	15	25
Erythrocebus patas patas	3	7	10
Total	13	22	35

P = 0,18

4 des singes positifs étaient des femelles et 9 des singes positifs étaient des mâles (**tableau 9**). L'écart observé dans les proportions de singes positifs dans les groupes de femelles et de mâles n'est pas significatif (p= 0,38)

Tableau 9 : Sérologie des singes sauvages prélevés en fonction du sexe.

sexe	IgG YF +	IgG YF -	Total
F	4	3	7
M	9	19	28
Total	13	22	35

P = 0,38

4 des singes positifs étaient des jeunes (enfant 2 et juvénile), 9 des singes positifs étaient des adultes (sub-adultes et adultes) (**tableau 10**). L'écart observé dans les proportions de singes positifs dans les groupes de jeunes et d'adultes est significatif (p= 0,035)

Tableau 10 : Sérologie des singes sauvages prélevés en fonction de l'âge.

âge	IgG YF+	IgG YF -	Total
Jeunes (E2+J)	4	14	18
Adultes (S+A)	9	8	17
Total	13	22	35

P = 0,035

Ainsi concernant les sérologies, 13 des 62 sérumsprélevés présentaient des anticorps IgG dirigés contre le virus de la fièvre jaune. Ceci s'explique tout à fait par une circulation épidémiologique du virus de la fièvre jaune dans la région de Kédougou pendant l'année 2002 (Saron, communication personnelle, rapport CRORA 2002 en cours de rédaction). De plus il n'est pas surprenant de constater que les singes étaient porteurs d'anticorps anti-fièvre jaune puisqu'ils sont impliqués dans le cycle selvatiche du virus de la fièvre jaune en tant qu'hôte réservoir et amplificateur (6,53). La présence d'anticorps IgG s'explique par une infection par le virus antérieure à la capture.

2.3.3 IFI

Les 62 sérums de singes prélevés ont été mis en culture sur cellules de moustique AP 61. Dix jours après l'inoculation, le surnageant cellulaire a été récolté et inoculé à de nouvelles cultures de cellules pour un passage dit aveugle du fait de l'absence d'effet cytopathogène. Dix jours après, le surnageant cellulaire a été de nouveau récolté. Les surnageants cellulaires des 2 récoltes ont été fixés sur lame pour une révélation par immunofluorescence indirecte. Les 7 pools d'ascites regroupant 70 arbovirus ont été utilisés. Aucune plage d'immunofluorescence n'a été observée, ce qui signifie qu'aucun arbovirus ne s'est développé sur les cellules et que dans les sérums aucun de ces virus n'était présent.

2.3.4 RT-PCR

Les 62 sérums de singes prélevés plus un sérum contenant de l'ARN DEN-2 ont subi une extraction Qiagen®. Les produits de cette extraction ont ensuite subi une RT-PCR TITAN® dengue-2. Les produits de cette RT-PCR ont ensuite été migrés sur un gel. Seul le dépôt issu du sérum contenant de l'ARN DEN-2 a migré et se situe par rapport à l'« échelle d'ADN » à 450 paires de base, qui correspond à la taille du fragment amplifié grâce aux amorces 23 et 24 (**annexe 14**).

La négativité de la RT-PCR montre l'absence d'ARN DEN-2 dans les sérums de singes et est un argument supplémentaire en faveur de l'absence du virus DEN-2 dans les sérums de singe prélevés.

2.4 Discussion

13 sérum sur les 62 sérum de singes prélevés présentaient des IgG dirigées contre le virus de la fièvre jaune et parmi ceux-ci, 3 sérum présentaient également des IgG dirigées contre le virus West-Nile. Aucun anticorps (IgM et IgG) dirigés contre le virus DEN-2 n'a été détecté.

Dans un premier temps nous aborderons la particularité des sérum porteurs d'IgG dirigées contre le virus de la fièvre jaune et dirigées contre le virus West-Nile. Puis nous évoquerons les facteurs qui peuvent expliquer l'absence d'isolement d'arbovirus dans les sérum. La question de l'échantillonnage sera discutée dans une troisième partie. Seront ensuite exposées les limites des méthodes biologiques utilisées pour l'analyse des sérum. Nous conclurons cette discussion par le facteur moustique qui n'a pas été étudié dans notre étude.

2.4.1 Particularités des arbovirus

Trois sérum positifs sur l'antigène fièvre jaune (YF) présentaient également des IgG dirigées contre le virus West-Nile (WN). Pourrait-il s'agir de réactions sérologiques croisées ? Pendant les deux épidémies récentes de fièvre jaune au Sénégal, aucun sérum humain n'a eu de réponse positive sur l'antigène WN alors que ces sérum étaient positifs sur l'antigène YF (Saron, communication personnelle, rapport CRORA 2002 en cours de rédaction). Par ailleurs, le virus WN a une structure différente de celle du virus YF (26). La positivité des

2.4.2 Echantillonnage

Se pose également la question du choix de l'échantillonnage. Nous avons choisi d'effectuer un échantillonnage ciblé où nous nous sommes intéressé à des groupes de singes définis et inféodés à l'environnement des sites de capture (3 bandes de singes verts dans les galeries forestières, 1 bande de patas sur les 3 sites). Ainsi à Ngari, un groupe de singes verts d'une vingtaine d'individus se présentait régulièrement au filet de capture. La circulation importante des singes et particulièrement des patas et des babouins a rendu difficile l'identification des groupes. Par ailleurs, la difficulté de capturer des singes, les processus d'« habituation » des singes aux pièges de captures étant longs et les singes perturbés dans cette région du Sénégal où ils sont chassés, ne nous a pas permis au cours de cette étude limitée dans le temps d'avoir un nombre important de prélèvements.

En effet la faiblesse des effectifs nous a imposé de regrouper les classes d'âge pour respecter le premier critère de validité du test ². Quant à l'effet « groupe », il altère l'interprétation du ² par le non respect du deuxième critère de validité, car les individus ne sont pas indépendants.

Par ailleurs, avant de pouvoir envisager un échantillonnage plus important et plus représentatif de la population simienne de la région, il nous faudrait connaître précisément les groupes ainsi que les caractéristiques démographiques des singes circulant dans la zone où le virus de la dengue 2 circule. En effet dans de nombreuses études antérieures des résultats ont été apportés sans que l'on sache d'où provenaient les singes, s'ils appartenaient au même groupe (caractéristique importante de ces espèces) et quelles étaient leurs données démographiques (9,62,15).

Pour pouvoir fixer un échantillonnage précis, il nous faut connaître le seuil limite qui nous permettrait de détecter le virus dengue-2. Or ce seuil limite est inconnu, en effet nous ne connaissons ni la taille de la population simienne de la région, ni le taux d'infection des singes par le virus dengue-2. Comment alors définir la taille de l'échantillon et le nombre de groupes de singes pour avoir une chance de détecter le virus dengue-2 ? Pour qu'il existe un cycle, quel pourcentage minimal peut être nécessaire ? Aucune donnée à ce sujet n'est pour le moment précisée.

Il s'avère alors nécessaire d'envisager la nécessité d'une modélisation comme donnée nécessaire à l'interprétation des résultats afin de pouvoir affirmer « il n'existe pas de cycle sauvage ».

Le suivi des singes déjà capturés, à l'aide de marqueurs, l'augmentation du nombre de captures, le recensement précis des groupes simiens de la région devrait permettre une meilleure détection.

Cette étude longitudinale de grande envergure se poursuit dans l'équipe de recherche qui nous a accueilli.

Une autre inconnue qui rend difficile la détection du virus de la dengue chez le singe est l'absence de données expérimentales sur l'infection du singe par le virus de la dengue. En effet l'absence de données, chez le singe, sur la symptomatologie de la dengue, sur la durée de la virémie, sur la persistance des anticorps dans le sang et sur l'incidence de l'infection complique la détermination de la taille de l'échantillon et le moment où les prélèvements doivent être effectués.

2.4.3 Limites des méthodes diagnostiques

Le choix des méthodes diagnostiques est également un facteur important dans la détection du virus de la dengue chez le singe. Les particularités décrites ci-dessous pour chaque technique sont valides chez l'homme et peuvent être extrapolées chez le singe avec une probabilité d'erreur certaine puisque aucune forme clinique de la dengue n'a été décrite chez celui-ci.

La détection du virus de la dengue en culture est une épreuve diagnostique de confirmation, mais, des problèmes pratiques en limitent l'utilisation (69). En effet, la période pendant laquelle on peut détecter le virus de la dengue chez l'homme est brève. Dans les 24 ou 48 heures suivant la défervescence, l'augmentation des concentrations d'anticorps rend difficile la culture virale. En outre, comme on l'a indiqué plus haut, le virus de la dengue est en général thermolabile, et il convient donc de prendre des précautions particulières pour éviter l'inactivation thermique des prélèvements. La détection de l'ARN de la dengue à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques (12), de la transcriptase inverse et de la polymérase thermostable (RT-PCR) est utilisée avec succès dans plusieurs laboratoires. Cette épreuve s'applique sur de l'ARN extrait du sérum, du plasma ou des cellules. Si la détection de

Pour toutes ces infections à flavivirus on pourra poser un diagnostic plus précis en ne recherchant que les réponses en IgM anti-dengue, même si cela ne permet pas de déterminer à coup sûr le sérotype à l'origine de l'infection.

En résumé, le diagnostic sérologique est en général moins spécifique que le diagnostic posé après culture virale. Dans les populations exposées à d'autres flavivirus, le diagnostic sérologique pose des problèmes, et un certain degré d'incertitude est inévitable. Le diagnostic sérologique sera posé avec davantage de certitude si l'on utilise des épreuves de neutralisation, qui permettent en général de distinguer, lors d'une primo-infection, les réponses immunitaires aux différents sérotypes de la dengue. Cependant, bien trop souvent, le diagnostic sérologique le plus précis posé par de nombreux laboratoires est celui d'*infection aiguë à flavivirus*, et non de *dengue aiguë*.

Ainsi les techniques de laboratoire utilisées surtout dans le diagnostic de la dengue chez l'homme peuvent compliquer le diagnostic d'infection du singe par le virus de la dengue.

2.4.4 Conclusion

La connaissance des relations entre le moustique et l'homme, le moustique et le singe, le moustique et le virus de la dengue est importante pour comprendre les particularités du cycle selvatique de la dengue en Afrique de l'Ouest. L'absence de données précises sur les vecteurs simiophiles et anthropophiles de la dengue est également un handicap pour déterminer si le virus de la dengue peut circuler chez les singes. Dans une enquête sérologique sur les singes, il faudrait également s'intéresser aux vecteurs vivant dans l'environnement du singe. Par exemple en effectuant une PCR sur le repas de sang d'un moustique prélevé autour ou sur un singe, on peut déterminer si ce moustique est un vecteur potentiel du singe, et si de plus on isole un virus chez ce moustique et des anticorps chez le singe on pourrait affirmer que ce moustique est vecteur du virus chez le singe et que le singe est un hôte pour ce virus.

Par conséquent pour réunir toutes les conditions favorables à une détection du virus de la dengue chez le singe, il faut envisager une étude à long terme recouvrant plusieurs cycles de silence-émergence du virus, avoir défini un échantillon ciblé des groupes de singes dont on connaît la structure démographique et les zones de circulation qui doivent être superposables à celles des vecteurs, connaître et récolter les vecteurs dans l'environnement des singes, être dans une zone où la présence humaine est proche, et disposer de techniques plus spécifiques de détection du virus de la dengue pour éviter toute confusion avec un autre arbovirus qui circule dans la même zone.

CONCLUSION

Notre étude, limitée à une période d'un an (juin 2002-juin 2003) et ayant pour cadre une zone bien définie (zone de Kédougou) n'a pas permis d'établir si le virus de la dengue circule chez les singes de cette zone. Seuls 13 sérums des 62 sérums de singes prélevés présentaient des anticorps tardifs dirigés contre le virus de la fièvre jaune, parmi lesquels 3 sérums présentaient également des anticorps dirigés contre le virus West-Nile. De nombreux facteurs ont été évoqués afin d'expliquer ce résultat.

Ce travail s'inscrit dans une étude longitudinale qui doit être pluridisciplinaire. En effet l'étude des singes et la collecte des sérums sont indissociables de la connaissance des vecteurs, de leur écologie et de leur collecte. Ces deux disciplines doivent être cimentées par une bonne connaissance du virus, de ses cycles de silence-émergence et de sa physiopathologie chez le singe.

Notre étude nous a permis de montrer que les singes étaient porteurs d'anticorps dirigés contre le virus de la fièvre jaune et contre le virus West Nile. Elle illustre le rôle bien connu d'hôte réservoir et amplificateur du singe dans le cycle selvatiche de la fièvre jaune. Les caractéristiques similaires entre ce virus et le virus de la dengue doivent envisager de poursuivre la recherche d'une implication des singes en tant qu'hôte-réservoir dans le cycle selvatiche de la dengue. La détection d'anticorps dirigés contre le virus West Nile chez les singes est une donnée nouvelle ouvrant de nouvelles perspectives.

Enfin ce travail a montré les limites des différentes méthodes de diagnostic utilisées et les contraintes imposées par l'arbovirologie.

Une autre donnée est intéressante et doit être approfondie en arbovirologie. Elle concerne l'infection concomitante de deux arbovirus et les influences que les virus exercent entre eux. Existe-t-il une inhibition entre ces virus ou bien une synergie ? Comment expliquer les périodes de silence d'un arbovirus alors qu'un autre circule et est détecté ?

Les particularités des arbovirus en Afrique et surtout du virus de la dengue doivent être mieux connues. La connaissance de ces caractéristiques singulières pourrait permettre de mieux appréhender l'épidémiologie et ainsi de mieux lutter contre la dengue qui est endémique et en constante progression dans les autres continents. Il ne faut donc pas négliger l'étude de la dengue en Afrique malgré son évolution clinique peu spectaculaire, son apparente rareté et le fait qu'elle soit très probablement sous-diagnostiquée, car souvent confondue avec d'autres pathologies fébriles comme l'accès palustre. Le fait de mieux comprendre ces cycles selvatiche permettraient également d'anticiper une émergence de la dengue en Afrique.

ANNEXE 1 : Fiche de suivi des singes domestiques

UR 034
BP 1386, Dakar

**Enquête épidémiologique sur les singes domestiques de la région de Kédougou :
dépistage des principales arboviroses (Fièvre jaune, Dengue, Chikungunya, CCHF,
WN, FVR), prise en charge et suivi de la santé des animaux**

Propriétaire

- **Nom : Bendia Lucien**
- **Adresse : Quartier Dinguesso, Kédougou**

Singe

- **Nom : Armando**
- **Espèce : *Erythrocebus patas***
- **Sexe et age : Femelle juvénile**
- **Poids : 3 kg**

Opération effectuée : le 27/06/2002

Anesthésie (10 mg/kg de kétamine)

Examen clinique : RAS

Prise de sang 5ml

Administration de Vermox (20 mg/kg, 2 fois à 15 jours d'intervalle) et Multivitamines (Alvityl, 10 jours)

Résultat des analyses sérologiques : Négatif

Nouveau contrôle prévu en octobre 2002.

Contact

*Dr Xavier Pourrut, Vétérinaire
IRD, BP 1383, Dakar
Tél : 849 36 12*

ANNEXE 2 : Extrait du carnet d'observation

Ngari, le 28 mai 2003

6h : début de l'observation

6h54 : arrivée d'une bande de singes verts :

2 femelles adultes
3 mâles juvéniles
1 femelle adulte portante avec son petit
les autres de la bande ne sont pas visibles

6h56 : entrée sous le filet des 6 individus

6h58 : entrée d'un mâle adulte dominant

6h59 : sortie du filet de 2 mâles juvéniles

7h00 : entrée de 3 mâles juvéniles

7h02 : sortie d'une femelle

7h06 : 7 singes verts sous le filet

7h10 : arrivée d'une bande de singes rouges (patas)

7h11 : entrée d'un patas mâle juvénile

sortie de 5 singes verts

7h13 : restent dans le filet 2 singes verts et un singe rouge

7h15 : sortie des 2 singes verts

7h16 : entrée dans le filet de 2 patas mâles juvéniles

3 singes rouges sous le filet

8h10 : sortie des singes rouges après être sortis et rentrés à 8-10 reprises

8h13-16h : rien à signaler

16h : fin de l'observation.

ANNEXE 3 : Matériel nécessaire pour la réalisation des ELISA

- Anticorps de capture des IgM humaines, Cappel. Dilution 1:1 000.
- Sérum de singe à tester, dilution 1:100.
- Sérum témoin positif dilution 1:100.
- Sérum témoin négatif, dilution 1:100.
- Antigène viraux cerveau (YF, Den-2, CHIK, CCHFV, WN) ou foie de souriceaux infectés (RVF), dilution 1:40 sauf 1/10 pour YF.
- Antigène négatif (cerveau ou foie de souriceaux sains), dilution 1:40 sauf 1/10 pour YF.
- Immune ascite (IA) contenant des IgG de souris anti-arbovirus correspondant.
- Anticorps anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (PO), ICN, Ref :55558. A reconstituer dans 2ml d'eau distillée stérile et à diluer au 1/2 avec du glycérol. Conservation sous parties aliquotes à -20°C. Dilution de travail : 1 :15 000.
- Anticorps anti-IgG Fc humaines conjugué à la peroxydase, Cappel. A reconstituer dans 2ml d'eau distillée stérile et à diluer au 1/2 avec du glycérol. Conservation sous parties aliquotes à -20°C. Prédiluer au 1/2 en glycérol et à diluer 1:20 000 (dilution finale 1 :40 000).
- Substrat : O-tolidine.(Sigma)
 - O-tolidine 5 mg
 - Diméthyl-formamide 250µl
 - Tampon citrate pH 4,0 30ml
 - H₂O₂ 10 Vol 12µl
 - N'UTILISER QU'UNE SOLUTION DE SUBSTRAT FRAÎCHEMENT PREPAREE.
- Tampon citrate pH 4,0
 - Acide citrique 1H₂O 11,77g
 - Soude NaOH en pastille 4,48g
 - Dissoudre la soude dans 200ml d'eau bidistillée.
 - Ajouter l'acide citrique.
 - Ajouter 400ml d'eau bidistillée.
 - Ajuster la solution à pH 4 avec de l'acide chloridrique 0,5 ou 1N goutte à goutte.
 - Compléter à 11 avec de l'eau bidistillée. Conserver maximum 15 jours à +4°C.
- Solution d'arrêt : H₂SO₄ 4N dans de l'eau distillée
- Eau distillée.
- PBS : Soluté salin tamponné aux phosphates, pH 7,2 :
 - NaCl 8 g
 - Na₂HPO₄ 1,15 g
 - KH₂PO₄ 0,02 g
 - Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée.
 - Ajuster le pH à 7,2 au moyen de HCl si nécessaire. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Tampon de dilution : PBS (soluté salin tamponné aux phosphates) + 0,05 % de Tween 20, pH 7.2 + 1% lait écrémé
 - Lait écrémé (0,1g) + (PBS +0,05% Tween 20)(10ml)
- Tampon de lavage PBS + 0,05 % de Tween 20
 - Ajouter 0,5 ml de Tween 20 (monolaurate de polyoxyéthylènesorbitanne) à 1 litre de PBS.
- Tampon de sensibilisation : carbonate-bicarbonate, pH 9,6
 - Carbonate de sodium (Na₂CO₃) 1,59 g
 - Hydrogénocarbonate de sodium (bicarbonate) (NaHCO₃) 2,93 g
 - Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Ce réactif peut être fourni prêt à l'emploi.
- Microplaques Maxisorp (NUNC) à 96 trous à fond plat. A JETER APRES USAGE.
- Laveur de microplaques ou pissettes.
- Lecteur de microplaques, filtre à 450 nm.
- Réservoirs à réactif.
- Micropipetteurs, 1-20 µl et 1-200 µl.
- Pipetteur multicanaux, distributeurs + combitips (A JETER APRES USAGE.).
- Pointes pour pipettes. A JETER APRES USAGE.
- Papier absorbant.
- Minuterie ou réveil.
- Incubateur à 37°C, chambre humide avec contrôle de température par thermomètre.
- Réfrigérateur et congélateurs -20°C avec contrôle de température par thermomètre.

ANNEXE 4 : Mode opératoire du titrage immunoenzymatique pour la recherche dans les sérums des singes, des IgM dirigés contre les virus de la fièvre jaune (YF), de la fièvre de West Nile (WN), de Chikungunya (CHIK) et de la dengue 2 (DEN-2).

Sensibilisation des puits d'une plaque de microtitrage par l'anticorps anti-IgM humaine qui croise avec les IgM de singes

En utilisant la figure en **annexe 5** comme modèle, marquer la plaque de microtitrage Maxisorp Nunc avec puits à fond plat.

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant de les introduire dans les puits de la plaque.

Introduire, dans chacun des puits de la microplaqué, 100 μ l d'une dilution 1/500 de l'anticorps monoclonal de capture des IgM humain (Cappel) dans le tampon de sensibilisation.

Incuber une nuit à 4°C.

Addition du sérum / blocage des sites

Laver la plaque 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.

Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.

Introduire 100 μ l d'une dilution 1/100 de chacun des sérums dans la solution PBS + 1 % lait écrémé + 0,05% Tween 20.

Incuber la plaque 1 h à 37°C.

Laver la plaque 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.

Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.

Addition de l'antigène / blocage des sites

Introduire, dans les puits appropriés, 100 μ l d'une dilution 1/20 de l'antigène viral et 1/10 (YF) dans la solution PBS + 0,05% Tween+ 1% lait.

Changer de cônes.

Introduire dans les puits appropriés, 100 μ l d'une dilution 1/20 ou 1/10 (YF) de l'antigène normal dans la solution PBS + Tween + 1% lait.

Incuber les plaques 1 h à 37°C.

Laver les plaques 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.

Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.

Addition de l'immune ascite de souris (IgG) anti-virus

Introduire dans tous les puits, 100 μ l d'une dilution 1/1000 de l'immune ascite en PBS + 0.05% Tween 20 + 1% lait.

Incuber 1 h à 37°C.

Laver les plaques 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.

Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.

Addition de l'anticorps anti-IgG de souris

Distribuer 100 μ l de l'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase au 1/20000.

Incuber 1 h à 37°C.

Laver les plaques 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.

Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.

Addition du substrat de l'enzyme

Distribuer 100 μ l d'o-tolidine dans tous les puits.

Incuber exactement 10 min à température ambiante.

Ajouter 100 μ l de H₂SO₄ 4N pour arrêter la réaction et lire à 450 nm.

ANNEXE 5 : Schéma de distribution et identification de la microplaque du titrage immunoenzymatique pour la mise en évidence des immunoglobulines de singe anti-arbovirus

DEN-2 CHIK YF WN

Date :											
N° de plaque :											
Nom du manipulateur :											
N° réf sérum à tester :											
Substrat : <input type="checkbox"/> o-tolidine <input type="checkbox"/> TMB											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

<input type="checkbox"/>	Antigène viral	<input type="checkbox"/> S -	Contrôle négatif	
	Antigène négatif	<input type="checkbox"/> S +	Contrôle positif	

COMMENTAIRES :

ANNEXE 6 : Mode opératoire du titrage immunoenzymatique pour la recherche dans les sérum des singes, des IgG dirigés contre les virus de la fièvre jaune (YF), de la fièvre de West Nile (WN), de Chikungunya (CHIK) et de la dengue 2 (DEN-2).

- *Sensibilisation des puits d'une plaque de microtitrage par l'immune ascite de souris anti-virus*
En utilisant la figure en **annexe 4** comme modèle, marquer la plaque de microtitrage Maxisorp Nunc avec puits à fond plat.
Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant de les introduire dans les puits de la plaque.
Introduire, dans chacun des puits de la microplaqué, 100 μ l d'une dilution 1/1000 de l'immune ascite de souris anti-virus dans le tampon de sensibilisation.
Incuber une nuit à 4°C.
- *Addition de l'antigène / blocage des sites*
Laver la plaque 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.
Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.
Introduire, dans les puits appropriés, 100 μ l d'une dilution 1/20 de l'antigène viral et 1/10 (YF) dans la solution PBS + 0,05% Tween+ 1% lait.
Changer de cônes.
Introduire dans les puits appropriés, 100 μ l d'une dilution 1/20 ou 1/10 (YF) de l'antigène normal dans la solution PBS + Tween + 1% lait.
Incuber les plaques 1 h à 37°C.
Laver les plaques 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.
Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.
- *Addition du sérum / blocage des sites*
Introduire 100 μ l d'une dilution 1/100 de chacun des sérum dans la solution PBS + 1 % lait écrémé + 0,05% Tween 20.
Incuber la plaque 1 h à 37°C.
Laver la plaque 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.
Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.
- *Addition de l'anticorps anti-IgG humaine PO*
Distribuer 100 μ l de l'anticorps anti-IgG humaine couplé à la peroxydase au 1/15000.
Incuber 1 h à 37°C.
Laver les plaques 3 fois avec la solution de lavage PBS + Tween.
Retourner la plaque sur du papier absorbant et tapoter le fond pour vider les puits.
- *Addition du substrat de l'enzyme*
Distribuer 100 μ l d'o-tolidine dans tous les puits.
Incuber exactement 10 min à température ambiante.
Ajouter 100 μ l de H₂SO₄ 4N pour arrêter la réaction et lire à 450 nm.

ANNEXE 7 : Protocole d'isolement sur cultures cellulaires et d'immunofluorescence indirecte.

1. Rappel des précautions

- Décontaminer la surface de la hotte avant et à la fin de toute manipulation.
- Préparer avec soin la verrerie, les réactifs et les milieux de culture stériles.
- Utiliser des antibiotiques et des antifongiques.

2. Réactifs

- Type de cellules en lignée continue utilisée : cellules *d'Aedes pseudocutellaris* AP61 (moustiques).
- Milieux de culture : milieu de croissance et de survie
 - L15 pH 7,6
 - 10 % sérum foetal de veau pour le milieu de croissance et 5 % pour le milieu de survie
 - 10 % de tryptose phosphate BROTH
 - fungizone-amphotéricine B 0,5 %
 - pénicilline -streptomycine 1% pour le milieu de croissance.
- Agents de dispersion : dispersion mécanique à l'aide d'un grattoir.

3. Isolement sur culture cellulaire

❖ culture cellulaire

- Etiqueter chaque flacon de culture de 25 cm² à raison d'un flacon par sérum plus un flacon pour la culture témoin
- Incrire le type de cellules (AP 61), la date (ex : 24.03) et le nombre de passages (ex : 73) sur les flacons vides
- Mettre 4 ml de trypsine dans chaque flacon d'entretien (2 flacons de 75 cm² (3-4 ml de cellules en suspension et 25 ml de milieu de culture) passés une fois par semaine)
- Remettre en suspension avec 10 ml de milieu de croissance.
- Disperser complètement les cellules par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette (une 20^{aine} de fois)
- Remettre 20 ml de milieu de culture
- Ensemencer les flacons en mettant 1 ml de la suspension puis 4 ml de milieu de culture
- Incuber à 28°C dans une étuve sèche.

❖ inoculation des cellules

- Vider les flacons de 25 cm²
- Noter la référence du sérum sur chaque flacon correspondant
- Mettre 200 µl de sérum pur (ou dilué au 1/100 pour les sérum hémolysés) par flacon
- Ne pas injecter directement sur le tapis cellulaire mais sur le côté opposé pour éviter le décollement du tapis
- Homogénéiser la suspension
- Incuber une heure à température ambiante sous la hotte pour permettre l'adsorption
- Mettre 5 ml du milieu de survie (5% de SVF)
- Mettre dans l'étuve sèche à 28 °C
- Regarder les cellules 2-3 jours après au microscope inversé.

Exemple de planning de culture, d'inoculation et de récolte des cellules :

Culture : J1
Inoculation : J2
Récolte : J8-10
Passage : J11-J14
Récolte : J19-J24

4. Récolte des cellules

Surnageant cellulaire

- A l'aide du surnageant cellulaire des flacons (inoculés 8-10 jours avant), remplir 1 tube de 2 ml puis remplir 1 tube de 5 ml avec le volume restant
- Conserver les tubes à -70 ° C.

Tapis cellulaire

- Mettre 5 ml de PBS dans les flacons
- Agiter
- Vider dans un tube de 5 ml
- Centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 minutes pour éliminer les débris cellulaires
- Mettre les flacons usagés dans l'autoclave pour décontamination
- Jeter le surnageant dans de l'eau de Javel
- Relaver une deuxième fois en mettant dans le tube de 5 ml de PBS
- Remettre les cellules en suspension en vortexant légèrement
- Recentrifuger à 1500 tours/min pendant 5 minutes
- Jeter le surnageant dans l'eau de Javel
- remettre en suspension dans 5 ml de PBS en vortexant légèrement.

5. Immunofluorescence indirecte

- Dépistage virale dans les sérum par 7 mélanges d'ascites
- Dans chaque mélange d'ascites, 10 immune-ascites différents (70 arbovirus)
- Chaque lame représente un mélange et peut contenir 12 sérum
- Déposer dans le puits correspondant une goutte des cellules inoculées en suspension correspondant à chaque sérum
- Sécher pendant au moins 2 heures à l'étuve sèche à 37° C
- Fixer 20 minutes à l'acétone froide puis diluer les pools d'ascite au 1/10
- Mettre une goutte de chaque mélange d'ascites sur la lame correspondante
- Incuber 20 minutes à 37 ° C en chambre humide
- Laver les lames deux fois 5 minutes dans un bain agité de PBS
- Sécher les lames au sèche-cheveux
- Diluer l'anticorps anti-IgG de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine au 1/80 en PBS contenant 1/1000 de bleu Evans (Ac-FITC)
- Distribuer une goutte de l'Ac-FITC dans tous les puits
- Incuber 20 minutes à 37 ° C en chambre humide
- Laver la lame deux fois 5 min dans un bain agité de PBS
- Sécher la lame au sèche cheveux
- Monter en glycérine tamponnée (PBS+75% glycérol)
- Lire au microscope à fluorescence obj. x 40.

ANNEXE 8 : Extraction de l'ARN viral (méthode QIAGEN®).

- Dissoudre le tampon AVL (lyse des virus) à 80 °C pendant 5 min puis mettre 400 µl dans un microtube de 1,5 ml
- Ajouter 100 µl de l'échantillon (sérum ou surnageant de culture cellulaire)
- Vortexer pendant 15 s pour bien homogénéiser
- Incuber à la température ambiante (15 – 25°C) pendant 10 mn
- Centrifuger brièvement à 8000 tours/min pendant 1 minute pour faire descendre les gouttes dans une centrifugeuse Ependorf®
- Ajouter 400 µl d'éthanol (précipitation de l'ARN) à 100% dans chaque tube
- Bien homogénéiser en vortexant pendant 15 s
- Centrifuger brièvement à 8000 tours/min pendant 1 minute
- Remplir soigneusement la colonne (silice : filtre) sans toucher le fond avec la pipette avec 500 µl (max. 630 µl) du mélange AVL-Surnageant-Ethanol
- Centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 min
- Changer ou vider le tube de collecte du liquide
- Remplir à nouveau la colonne avec le restant du mélange
- Re-centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 min.
- Mettre 500 µl de tampon AW1 et centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 min pour éliminer le tampon
- Mettre 500 µl de tampon AW2 et centrifuger à 12000 tours/min pendant 3 min
- Vider le tube
- Re-centrifuger à 12000 tours/min pendant 1 min
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 1,5 ml
- Ajouter 60 µl de tampon AVE (élation)
- Incuber à la température ambiante pendant 1 min et
- Centrifuger à 8000 tours/min pendant 1 min.

ANNEXE 9 : Protocole de RT-PCR TITAN® DEN-2

Le mode opératoire est le suivant :

- Mettre, dans un tube approprié au thermocycleur, 22,8 µl d'extrait ARN et ajouter 27,2 µl de Mix.
- Mix à préparer pour un volume réactionnel de 50µl (par réactions) :
 - 5µl de l'amorce 23 (100ng/µl)
 - 5µl de l'amorce 24 (100ng/µl)
 - 10µl de tampon Taq (5 x)
 - 4µl de dNTPs (10mM total)
 - 2µl DTT (100nM)
 - 0,2µl Rnasine
 - 1µl enzyme
- Conditions d'amplification

▪ 1 cycle de reverse transcription	50°C pendant 30 min
▪ 1 cycle de dénaturation	95°C pendant 2 min
▪ 40 cycles	dénaturation 95°C pendant 40 secondes hybridation 55°C pendant 40 secondes elongation 68°C pendant 40 secondes
▪ 1 cycle d'elongation	68°C pendant 7 minutes

ANNEXE 10 : Protocole de visualisation sur gel d'agarose.

TAE 50X :

- 242 g tris base
- 57,1 ml acide acétique 5 %
- 100 ml EDTA 0,5 M pH 8
- qsp 1 litre eau distillée

○ Préparer un gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE 1 X :

Pour un gel de 100 ml :

- 1 g d'agarose
- 100 ml de solution normale TAE 50 X diluée au 1 /50

- Mettre 100 secondes au four à micro-ondes à la puissance 800 W.
- Ajouter 2 gouttes de BET
- Contrôler l'amplificat sur gel en chargeant par puits 10 µl d'échantillon additionné de 2 µl de bleu de bromophénol
- Faire migrer pendant 30 min à 100 V et 600 mA
- Visualiser sous UV.

ANNEXE 11 : Données sur les singes capturés dans la zone de Kédougou
(juin 2002-juin 2003).

Code terrain	Type	Espèce	sex	age	poids(kg)	Date Prél	Observation
K1	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	3	27/06/2002	
Re K1	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	3	18/08/2002	
K2	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	A	4	27/06/2002	
Re K2	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	A	4	09/11/2002	
K3	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	2	27/06/2002	
Re K3	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	2	18/08/2002	
Re K3	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	2,5	09/11/2002	
K4	domestique	<i>Papio papio</i>	M	J	6	27/06/2002	
Re K4	domestique	<i>Papio papio</i>	M	J	8	27/10/2002	
ReK4	domestique	<i>Papio papio</i>	M	J	8	18/04/2003	
K5	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	A	4	27/06/2002	
K6	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	3	27/06/2002	
K7	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	1,5	27/06/2002	
Re K7	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	2	27/10/2002	
K8	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	2,5	28/06/2002	
K9	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	E2	1	28/06/2002	
Re K9	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	1,5	14/11/2002	
K10	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	1,5	27/10/2002	
K11	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	3	03/11/2002	
K12	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	1,75	03/11/2002	
K13	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	3,5	03/11/2002	
K14	domestique	<i>Papio papio</i>	M	J	5	03/11/2002	
K15	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	2	06/11/2002	
K16	domestique	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	J	2	06/11/2002	
D1	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	4,8	19/06/2002	
D2	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	4,7	19/06/2002	
D3	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	F	A	4,1	19/06/2002	
D4	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	F	J	1,9	19/06/2002	
D5	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	E2	0,75	19/06/2002	
D6	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,75	19/06/2002	
D7	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,9	19/06/2002	
P1	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	2	17/08/2002	
P2	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	F	A	4	17/08/2002	
P3	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	6	17/08/2002	
P4	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,7	17/08/2002	
P5	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	3,5	17/08/2002	
P6	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	5	14/11/2002	
P8	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	S	8	03/06/2003	collier JO
P7	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	S	8	03/06/2003	plaie tête
P9	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	S	4	04/06/2003	plaie tête

Code terrain	Type	Espèce	sex	age	poids(kg)	Date Prél	Observation
N1	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,5	21/12/2002	
ReN1	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,5	03/06/2003	
N2	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	6,5	21/12/2002	
N3	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	3	21/12/2002	
N4	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	F	J	2	21/12/2002	
ReN4	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	2	03/06/2003	
N5	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	3	21/12/2002	
N6	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,4	21/12/2002	
ReN6	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	1,5	03/06/2003	
N7	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	A	10	16/04/2003	collier JBJ
N8	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	A	8	31/05/2003	
N9	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	S	7	31/05/2003	
N10	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	S	6	31/05/2003	
N11	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	3	03/06/2003	
N12	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	2,5	03/06/2003	
N13	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	A	4	03/06/2003	collier BRB
N14	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	M	J	2,5	03/06/2003	
N15	sauvage	<i>Cercopithecus aethiops sabaeus</i>	F	J	2,5	03/06/2003	
N16	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	J	3	03/06/2003	
N17	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	A	5,5	03/06/2003	
N18	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	M	E2	1	03/06/2003	
N19	sauvage	<i>Erythrocebus patas patas</i>	F	S	4	03/06/2003	

ANNEXE 12 : Méthode pour l'analyse des résultats des sérologies par ELISA

DO moyenne du sérum témoin positif sur l'antigène viral - DO moyenne du sérum témoin positif sur l'Ag négatif

DO moyenne du sérum témoin négatif sur l'antigène viral - DO moyenne du sérum témoin négatif sur l'Ag négatif

Le rapport P/N doit être supérieur ou égal à 2.0 pour valider le test. Il faut valider le test pour chaque plaque. On ne peut lire les résultats concernant les échantillons que si le test est valide. S'il ne l'est pas, il faut refaire la plaque. Si après cette opération, le test n'est toujours pas valide, c'est qu'il y a vraisemblablement une erreur concernant un ou plusieurs réactifs ou les paramètres du test, et il faut la rechercher.

Pour déterminer si les échantillons contiennent des IgM dirigées contre l'antigène viral il faut calculer la différence suivante pour chaque échantillon :

DO moyenne de l'échantillon sur l'antigène viral - DO moyenne de l'échantillon sur l'Ag négatif.

Pour qu'un échantillon soit considéré comme positif, cette différence doit être supérieure à la moyenne plus 3 écarts-type des sérum non réactionnels et des contrôles négatifs.

On se rappellera que les IgM ne sont détectables moins d'une semaine après le début de la maladie chez l'homme. Par conséquent, si la cinétique est identique chez le singe, un résultat peut être négatif alors que l'animal développe une infection. Il faut aussi se souvenir que les IgM persistent pendant au moins un mois et souvent au-delà chez l'homme (56).

La valeur seuil pour la positivité est une valeur empirique expérimentale. Pour des valeurs de P-N proche de 0,100, il y a suspicion de fausse positivité. D'autres tests sont alors nécessaires pour déterminer ce qu'il en est exactement de ces échantillons. Il est également recommandé que tous les résultats positifs obtenus pour les sérum soient confirmés par un titrage sur six dilutions de raison 2 des échantillons. Si les DO obtenues s'alignent sur une droite ou sur une sigmoïde, les échantillons sont de vrais positifs. Si les courbes sont plates ou présentent des ondulations, ce sont de faux positifs.

Les densités optiques obtenues pour la recherche d'IgM anti-arbovirus ont été reportées dans un tableau où figurent le code de terrain de l'échantillon, la DO sur l'antigène viral, la DO sur l'antigène négatif, la différence de DO P-N, les DO sur antigènes positif et négatif des sérum négatif et positif (**tableau**).

La valeur seuil de la plaque est calculée par la moyenne des DO P-N des sérum sans réaction plus trois écarts-type. Cette valeur seuil ou « cut-off » nous permet d'une part d'obtenir la DO au-dessus de laquelle les valeurs P-N sont positives et d'autre part de savoir si la technique est bonne. En effet, si cette valeur est supérieure à 0,200, on risque de passer à côté des faibles positifs, il faut alors voir quelle erreur a été commise dans la réalisation du test.

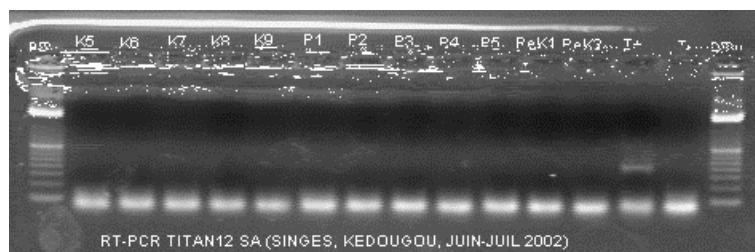
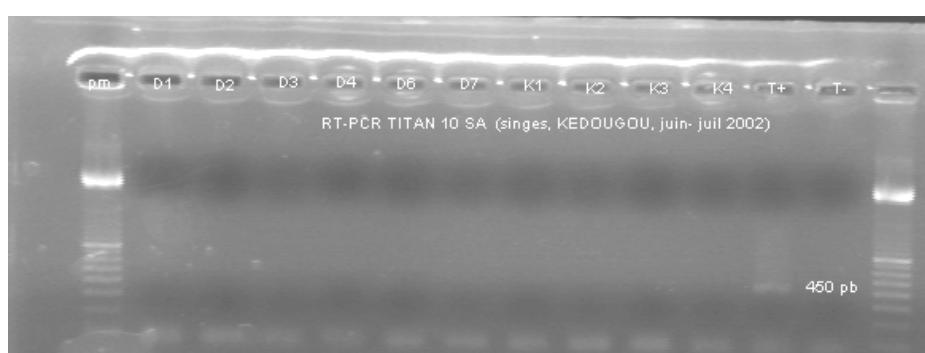
Exemple de résultats obtenus pour le recherche dans des sérum de singe, en IgM dirigés contre le virus de la fièvre jaune.

juin-03		IgM anti-YF		
n° terrain		Ag viral	Ag négatif	DO P-N
N7		0,057	0,048	0,009
N8		0,047	0,047	0
N9		0,047	0,045	0,002
N10		0,056	0,053	0,003
N11		0,051	0,046	0,005
N12		0,048	0,048	0
N13		0,057	0,044	0,013
N14		0,048	0,043	0,005
N15		0,052	0,046	0,006
N16		0,049	0,043	0,006
N17		0,047	0,047	0
N18		0,047	0,049	-0,002
N19		0,056	0,044	0,012
P7		0,049	0,043	0,006
P8		0,047	0,050	-0,003
P9		0,055	0,041	0,014
ReK4		0,052	0,041	0,011
ReN1		0,045	0,042	0,003
ReN4		0,047	0,051	-0,004
ReN6		0,05	0,050	0
s+		0,428	0,041	0,387
s-		0,047	0,043	0,004
		EC =	0,00345612	
		MOY =	0,04605	
		cut-off =	0,05641835	

ANNEXE 13 : Sérum présentant des IgG anti-arbovirus (YF et WN)
parmi les 62 sérum prélevés, la valeur de la DO P-N, le cut-off et le titre
sont précisés.

n° terrain	IgG anti	DO P-N 1/100	Cut-off	Titre
N3	YF	0,385	0,134	1/400
N7		0,223	0,105	1/200
N13		0,298	0,092	1/100
N15		0,390	0,099	1/200
D2		0,515	0,098	1/800
D3		0,473	0,097	1/400
D4		0,227	0,087	1/100
P2		0,527	0,132	1/400
P3		0,597	0,156	1/800
P5		0,499	0,117	1/200
P7		0,245	0,157	1/100
P8		0,248	0,112	1/100
P9		0,279	0,116	1/200
P2	WN	0,395	0,089	1/100
P3		0,334	0,111	1/200
N7		0,442	0,127	1/200

ANNEXE 14 : Photographies des gels d'agarose sous UV traitées par le logiciel Biocapt®. Seul le témoin positif a migré au niveau du fragment de taille 450 paires de bases.



BIBLIOGRAPHIE

1. BLACKBURN NK, MEENEHAN G, ALDRIDGE N. The status of dengue fever virus in South Africa--serological studies and diagnosis of a case of dengue fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, **81**, 690-692.
2. CALISHER CH, NUTI M, LAZUICK JS, FERRARI JD, KAPPUS KD. Dengue in the Seychelles. *Bull. World Health Organ.*, 1981, **59**, 619-622.
3. CAREY DE, CAUSEY OR, REDDY S, COOKE AR. Dengue viruses from patients in Nigeria 1964-1968. *Lancet*, 1971, **1**, 105.
4. CHANG GJ. Molecular biology of dengue viruses. In : *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York : CAB International, 1997, 175-199.
5. CORDELLIER R. La dengue en Afrique : son histoire, la situation actuelle et les orientations à donner aux recherches. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 1982, **89**(1-2-3-4), 769-775.
6. CORDELLIER R. L'épidémiologie de la fièvre jaune en Afrique de l'ouest. *Bul. Org. Mond Santé*, 1991, **69**, 73-84.
7. CORDELLIER R, BOUCHITE B, ROCHE JC, MONTENY N, DIACO B & AKOLIBA P. Circulation selvatique du virus Dengue 2 en 1980 dans les savanes sub-soudanaises de Côte d'Ivoire. Données entomologiques et considérations épidémiologiques. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 1983, **21**(3), 165-179.
8. CORNET M, ROBIN Y, CHATEAU R, HEME G, ADAM C, VALADE M *et al..* Isolement d'arbovirus au Sénégal Oriental à partir de moustiques (1972-1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les Aedes en particulier du virus amaril. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 1979, **17**(3), 149-163.
9. CORNET M, SALUZZO JF, HERVY JP, DIGOUTTE JP, GERMAIN M, CHAUVANCY MF *et al..* Dengue 2 au Sénégal Oriental. Une poussée épizootique en milieu selvatique. Isolement du virus à partir de moustiques et d'un singe et considérations épidémiologiques. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 1984, **22**(4), 313-323.
10. COULANGES P, CLERCY Y, JOUSSET FX, RODHAIN F, HANNOUN C. Dengue à la Réunion: isolement d'une souche à l'Institut Pasteur de Madagascar. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil.*, 1979, **72**, 205-209.

11. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 1995, **18**, 237-238.
12. DEUBEL V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of Dengue infection. In : *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York : CAB International, 1997, 335-367.
13. DEUBEL V, RODHAIN F. Variations climatiques et dengue : impacts directs et indirects. *Médecine et maladies infectieuses*, 1999, **29**, 289-295.
14. DEUBEL V, LAILLE M, HUGNOT JP, CHUNGUE E, GUESDON JL, DROUET MT *et al.*. Identification of dengue sequences by genomic amplification : rapid diagnosis of dengue virus serotype in peripheral blood. *J. Virol. Methods*, 1990, **30**, 41-54.
15. DIALLO M, BA Y, SALL A, DIOP O, NDIONE J, MONDO M *et al.*. Amplification of the Sylvatic Cycle of Dengue Virus Type 2, Senegal, 1999–2000: Entomologic Findings and Epidemiologic Considerations. *Emerging infectious diseases*, 2003, **9**(3), 362-367.
16. DIGOUTTE JP, SALUZZO JF, CORNET M. Isolation and identification by indirect fluorescence procedure with monoclonal and polyclonal antibody of wild dengue and yellow fever virus on *Aedes pseudoscutellatus* cell line. In : *XI International congress for tropical medecine and malaria*. Calgary, Canada, 16-22 september 1984. University of Calgary, 1984, 38.
17. DIGOUTTE JP, CALVO-WILSON, MA, MONDO M, TRAORE-LAMIZANA M, ADAM F. Continuous cell lines and immune ascitic fluid pods in arbovirus detection. *Research in Virology*, 1992, **143**, 417-422.
18. DORST J, DANDELOT P. *A field guide to the larger mammals of Africa*. St James Place, London : Collins ED, 1970, 436 p.
19. DURAND JP, VALLEE L, DE PINA JJ, TOLOU H. Isolation of a dengue type 1 virus from a soldier in West Africa (Cote d'Ivoire). *Emerg. Infect. Dis.*, 2000, **6**, 83-4.
20. EDINGTON AD. Dengue as seen in the recent epidemic in Durban. *J. Med. S. Afr.*, 1927, **1**, 446-448.
21. FAGBAMI AH, MONATH TP, FABIYI A. Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, **71**, 60-65.
22. FONTENILLE D, TOTO JC. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a New Potential Dengue Vector Widespread in South Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, **7**, 6.
23. GONZALEZ JP, DU SAUSSAY C, GAUTUN JC, Mc CORMICK JC & MOUCHET J. La Dengue au Burkina Faso (ex Haute Volta) endémies saisonnières en milieu urbain à Ouagadougou. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1985, **78**, 7-14.
24. GUBLER DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, 2002, **10**(2), 100-103.

25. GUBLER DJ, CLARK GG. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.*, 1995, **1**, 55-57.

26. GUBLER DJ, KUNO G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York : CAB International, 1997, 477p.

27. GUBLER DJ, SATHER GE, KUNO G, CABRAL JR. Dengue 3 virus transmission in Africa. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 1986, **35**(6), 1280-1284.

28. GUZMAN MG, KOURI G. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.*, 2002, **2**, 33-42.

29. HALSTEAD SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 1988, **239**, 476-481.

30. HERVY JP, LEGROS F, ROCHE JC, MONTENY N & DIAGO B. Circulation du virus dengue 2 dans plusieurs milieux boisés des savanes soudanaises de la région de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Considérations entomologiques et épidémiologiques. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 1984, **22**(2), 135-143.

31. HYAMS KC, OLDFIELD EC, SCOTT RM, BOURGEOIS AL, GARDINER H, PAZZAGLIA G *et al.*. Evaluation of febrile patients in Port Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986, **35**, 860-865.

32. INNIS BL. Antibody response to dengue virus infection. In : *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York : CAB International, 1997, 221-245.

33. INSTITUT PASTEUR. *Virus Dengue 2 CRORA : BASE DE DONNEES SUR LES VIRUS AFRICAINS* [en ligne], mise à jour novembre 2002. [\[http://www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/virus/v010230.htm\]](http://www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/virus/v010230.htm), (consulté le 16 novembre 2002).

34. JOHNSON BK, MUSOKE S, OCHENG D, GICHOGO A, REES PH. Dengue-2 virus in Kenya. *Lancet*, 1982, **24**, 208-209.

35. KANESA-THASAN N, IACONO-CONNORS L, MAGILL A, SMOAK B, VAUGHN D, DUBOIS D *et al.*. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet*, 1994, **12**, 343-678.

36. KANESA-THASAN N, CHANG GJ, SMOAK BL, MAGILL A, BURROUS MJ, HOKE CH JR. Molecular and epidemiologic analysis of dengue virus isolates from Somalia. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, **4**, 299-303.

37. KHIN MM. & THAN KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg*, 1983, **32**, 590-594.

38. MONATH TP, LEE VH, WILSON DC, FAGBAMI A, TOMORI O. Arbovirus studies in Nupeko forest, a possible natural focus of yellow fever virus in Nigeria. I. Description of the area and serological survey of humans and other vertebrate hosts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1978, **68**, 30-8.

39. MONDET B. Importance d'*Aedes (Diceromyia) furcifer* Edwards, 1913 (Diptera : Culicidae), parmi les vecteurs potentiels d'arboviroses, dans l'épidémiologie de la fièvre jaune, en savane sub-soudanienne de Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* (N.S.), 1997, **33**, 47-54.

40. MONLUN E, ZELLER HG, LE GUENNO B, TRAORE LAMIZANA M, HERVY JP, DAM F *et al.* Surveillance de la circulation des arbovirus d'intérêt médical dans la région du Sénégal oriental (1988-1991). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1993, **86**(1), 21-28.

41. MOORE DL, CAUSEY OR, CAREY DE, REDDY S, COOKE AR, AKINKUGBE FM *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1975, **69**, 49-64.

42. MURGUE B, DEPARIS X, CHUNGUE E, CASSAR O, ROCHE C. Dengue : an evaluation of dengue severity in French Polynesia based on an analysis of 403 laboratory-confirmed cases. *Trop. Med. Int. Health.*, 1999, **11**, 765-773.

43. OMS. *Dengue hémorragique : diagnostic, traitement, prévention et lutte*. 2^e éd. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, 1998.

44. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas : guidelines for prevention and control. In : *Dengue guidelines meeting*. Washington DC, 16-20 December 1991. Washington DC : Pan American Health Organization, 1994.

45. POURRUT X. *Les associations plurispecifiques des simiens de la forêt de Fathala : implications sur la transmission du SIV*. Thèse Doct. Vét., ENVT, université Paul Sabatier, Toulouse, 1993.

46. RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 1990, **174**, 479-93.

47. RICO-HESSE R, HARRISSON LM, ALBA SALAS R, TOVAR D, NISALAK A, RAMOS C *et al.* Origins of Dengue Typa 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, 1997, **230**, 244-251.

48. RIGAU-PÉREZ JG, CLARK GG, GUBLER DJ, REITER P, SANDERS EJ, VANCE VORNDAM AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 1998, (352), 971-977.

49. ROBERT V, LHUILLIER M, MEUNIER D, SARTHOU JL, MONTENY N, DIGOUTTE JP *et al.* Virus amaril, Dengue 2 et autres arbovirus isolés de moustiques au Burkina Faso, de 1983 à 1986. Considérations entomologiques et épidémiologiques. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1993, **86**, 90-100.

50. ROBIN Y, CORNET M, HEME G, LE GONIDEC G. Isolement du virus de la dengue au Sénégal. *Annales de Virologie*, 1980, **131**, 149-154.

51. ROCHE JC, CORDELLIER R, HERVY JP, DIGOUTTE JP, MONTENY N. Isolement de 96 souches à partir de moustiques capturés en Côte d'Ivoire et Haute-Volta. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1983, **134**, 233-244.

52. RODHAIN F. Problèmes posés par l'expansion d'*Aedes albopictus*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1986, **89**, 137-141.

53. RODHAIN F. The role of monkeys in the biology of dengue fever and yellow fever. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1991, **14**(1), 9-19.

54. RODIER GR, GUBLER DJ, COPE SE, CROPP CB, SOLIMANA K, POLYCARPE D *et al.*. Epidemic dengue 2 in the city of Djibouti 1991-1992. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1996, **90**, 237-240.

55. ROSEN L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1977, **26**, 337-343.

56. ROSEN L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *South Afr. Med. J.*, 1986, **69**, 40-42.

57. ROSEN L. La dengue hémorragique. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1996, 91-94.

58. ROSEN L, SHROYER DA, TESH RB, FREIER JE, CHING LIEN J. Transovarial transmission of Dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, **32**(5), 1108-1119.

59. RUDNICK A. Ecology of Dengue virus. *Asian J. Infect. Dis.*, 1978, **2**, 156-160.

60. RUDNICK A. The ecology of the dengue virus complex in peninsular Malaysia. In : "PANG T. and PATHMANATHAN R., Proceedings of the International Conference on Dengue/DHF". University of Malaysia Press, Kuala Lumpur, Malaysia, 1980.

61. SALL MM *et al.*. *Atlas du Sénégal*. 5^e éd. Paris : Editions J.A, 2000, 84 p.

62. SALUZZO JF, CORNET M, ADAM C, EYRAUD M & DIGOUTTE JP. Dengue 2 au Sénégal Oriental : enquête sérologique dans les populations simiennes et humaines (1974-1985). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1986, **79**, 313-322.

63. SALUZZO JF, CORNET M, CASTAGNET P, REY C & DIGOUTTE JP (1986) Isolation of Dengue 2 and Dengue 4 viruses from patients in Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1986, **80**(1), 5.

64. SALUZZO JF, LEGUENNO B, VAN DER GROEN G. Use of heat inactivated viral haemorragic fever antigens in serological assays. *J Virol Methods*, 1988, **22**, 165-172.

65. SHARP TW, WALLACE MR, HAYES CG, SANCHEZ JL, DEFRAITES RF, ARTHUR RR *et al.*. Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, **53**, 89-94.

66. STRUHSAKER TT. Social structure among vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Behaviour*, 1967, **29**, 83-121.

67. THONNON J, SIEGEL A, DIALLO M, FALL A, MONDO M, FONTENILLE D. Yellow fever outbreak in Kaffrine, Senegal 1996 : epidemiological and entomological findings. *Trop. Med. Intern. Health*, 1998, **3**, 872-877.
68. TRAORE-LAMIZANA M, ZELLER HG, MONLUN E, MONDO M, HERVY JP, *et al.* Dengue 2 outbreak in Southeastern Senegal during 1990 : Virus isolations from mosquitoes Diptera Culicidae. *Journal of Medical Entomology*, 1994, **31**(4), 623-627.
69. VORNDAM V, KUNO G. Laboratory diagnosis of dengue viruses infections. In : *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York : CAB International, 1997, 313-335.
70. WANG E, NI H, XU R, BARRETT AD, WATOWICH SJ, GUBLER DJ, WEAVER SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.*, 2000, **74**, 3227-3234.
71. WHO. REGIONAL OFFICE FOR THE WESTERN PACIFIC. *Guidelines for dengue surveillance and mosquito control*. Manila : World Health Organization, 1995.
72. YUWONO J, SUHARYONO W, KOIMAN I, TSUCHIYA Y, TAGAYA I. Seroepidemiological survey on dengue and Japanese encephalitis virus infections in Asian monkeys. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1984, **15**(2), 194-200.
73. ZELLER HG, TRAORE-LAMIZANA M, MONLUN E, HERVY JP, MONDO M & DIGOUTTE JP (1992) Dengue-2 Virus Isolation from Humans During an Epizootic in Southeastern Senegal in November, 1990. *Research in Virology*, 1992, **143**(2), 101-102.

IMPLICATION DES SINGES EN TANT QU'HÔTE-RESERVOIR DANS LE CYCLE SELVATIQUE DE LA DENGUE DANS LA RÉGION DE KEDOUGOU (SENEGAL ORIENTAL)

NOM et Prénom : **BELCHIOR Emmanuel**

Résumé

La dengue est une arbovirose majeure en pleine expansion dans le monde. Les particularités de l'épidémiologie de la dengue en Afrique et plus spécialement de la circulation enzootique selvatique du sérototype 2 en Afrique de l'Ouest soulèvent la question du rôle des singes en tant qu'hôte-réservoir

Notre étude, limitée à un an et située dans la région de Kédougou (Sénégal oriental), avait pour principal objectif de montrer si le virus DEN-2 avait circulé pendant cette période dans les populations simiennes de cette région. Nous avons établi un protocole de capture et de prélèvement des singes de la région. Les sérum ont ensuite été analysés pour la recherche d'anticorps précoces et tardifs par ELISA ainsi que pour la recherche du virus par isolement et par RT-PCR. Sur les 62 sérum de singes prélevés, 13 possédaient des anticorps tardifs de type IgG dirigés contre le virus de la fièvre jaune, parmi lesquels 3 possédaient également des anticorps IgG dirigés contre le virus West Nile. Aucun anticorps dirigé contre le virus DEN-2 et aucun autre arbovirus circulant dans la région n'ont été isolés de ces sérum. Ces résultats sont discutés et des hypothèses avancées.

Notre étude était un prologue à une étude pluridisciplinaire (entomologie, primatologie, arbovirologie) longitudinale de plusieurs années, actuellement en cours dans l'équipe de recherche qui nous a accueilli et dont l'objectif est d'élucider les mécanismes complexes de circulation et d'émergence de ces virus dans leur cycle selvatique.

Un approfondissement des connaissances dans les relations entre le singe et le virus DEN-2, le singe et le vecteur moustique, et le vecteur moustique et le virus sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des singes dans le cycle selvatique de la dengue (rôle déjà connu dans le cycle selvatique d'un autre arbovirus, le virus de la fièvre jaune). Il permettra également de mieux appréhender l'épidémiologie particulière de la dengue en Afrique où elle est d'émergence récente.

Mots clés

Dengue 2, singes, épidémiologie, cycle selvatique, sérologie, isolement, RT-PCR, Afrique de l'Ouest.

Jury :

Président : Pr.....

Directeur : Pr. Jean-Jacques BENET

Assesseur : Pr. Marc ELOIT

Adresse de l'auteur :

M. BELCHIOR Emmanuel 18 avenue de Verdun 75010 PARIS

IMPLICATION OF MONKEYS AS HOST-RESERVOIR IN THE DENGUE SELVATIC CYCLE IN THE AREA OF KEDOUGOU (ORIENTAL SENEGAL)

SURNAME : BELCHIOR
Given name : Emmanuel

Summary

Dengue is the most emerging arbovirosis in the tropical world. Dengue epidemiology in Africa and especially in West Africa shows the particularity of the quasi exclusive circulation of the serotype 2 and questions about the role played by monkeys in a putative selvatic cycle.

Our one year study was localized in Kédougou in Senegal. Its main objective was to demonstrate the circulation of dengue 2 virus in the populations of monkeys dwelling in the area. We implemented a capture system permitting to harvest blood from monkeys together with other informations without injury for the animals. The blood samples were used in order to detect early and late antibodies by ELISA, to isolate virus on cell cultures and to detect virus sequences by RT-PCR.

We showed that out of 62 sera, 13 from different monkeys contained anti-Yellow Fever IgG and 3 anti-West Nile virus IgG. None antibody against DEN-2 virus and none other arbovirus circulating in the area were isolated from the 62 sera. Results are discussed and hypothesis brought out.

Our study was included into a long-lasting multifocal program including entomology, climatology, primatology and arbovirology. Such a program is going ahead leads by the IRD unit.

A better knowledge of the relationships between monkeys, mosquitoes and viruses is essential to understand the involvement of monkeys in the selvatic cycle of dengue in Africa (as it has been demonstrated for another flavivirus, yellow fever). It could also explain the particular epidemiology of dengue in Africa where this virus is of recent emergence.

Keywords

Dengue 2, monkeys, epidemiology, selvatic cycle, West Africa, serology, isolation, RT-PCR.

Jury :

Président : Pr.....
Director : Pr. Jean-Jacques BENET
Assesor : Pr. Marc ELOIT

Author's address:

M. BELCHIOR Emmanuel 18 avenue de Verdun 75010 PARIS (France)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 