UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016 **N° d'ordre : 207**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Présentée par :

El hadji NDIAYE

Biodiversité et rôle des moustiques dans les processus de maintien et d'émergence des arbovirus au Sénégal : exemple du virus de la fièvre de la vallée du Rift

Soutenue le 31 mars 2016 devant le jury composé de :

Président :	**Cheikh Tidiane BA**	**Professeur**	**FST-UCAD**
Rapporteurs :	**Jacques-André NDIONE**	**HDR**	**CSE, Dakar**
	Oubri Bassa GBATI	**Maître de Conférences Agrégé**	**EISMV, Dakar**
	Roger Clément TINE	**Maître de Conférences Agrégé**	**FMPOS-UCAD**
Examinateur	**Ibrahima DIA**	**HDR**	**IPD, Dakar**
Directeur de thèse	**Mawlouth DIALLO**	**Directeur de recherche**	**IPD, Dakar**
Co-Directeur de thèse	**Ousmane FAYE**	**Professeur**	**FST-UCAD**

DEDICACES

ALHAMDOULILAH

Je dédie ce travail à :

Mes parents : mon père Mamadou et son frère Birama Ndiaye, à tous leurs frères et sœurs qui nous ont élevé, éduqué et surtout à ma mère Fatou BOP qui n'est plus de ce monde depuis mon enfance. Merci maman.

A mon guide spirituel El Hadji Ibrahima NIASSE.

A tous mes frères et sœurs ainsi que mes amis.

A mon Moukhadam Babacar FAYE.

Mes promotionnaires avec qui nous avons cheminé ensemble jusqu'en maîtrise et Master II surtout Ablaye WADE, Mbaye FAYE, Alfonsse Birame BAKHOUM, Toffène DIOME, les deux Mansour GUEYE et DIEYE, Tapha qui est mon frère et mon promotionnaire, BASSENE, Nabou DIEDHIOU, DIONOU, Ousmane, Yacine, Ndèye Seyni,...

A mes amis avec qui j'ai partagé les mêmes chambres au campus universitaire : Mbade, Niane, Mawdo, Gabriel, Fape mak Diaga, Moussa, Abbe Jean, Ndigue, Ablaye et Aliou FAYE Babacar, Bassirou, Aliou Ngor, Lansana, Lamine Modji, Khamadi, Tamsir, Diaga, Issa FAYE, Babacar FAYE, Serigne MANGANE…à tous

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette Thèse a été réalisé à l'Unité d'Entomologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar sous la direction de Dr **Mawlouth DIALLO** responsable de ladite unité. Elle est le résultat d'un travail d'équipe, de concertations, conseils et critique. Elle est arrivée à bout parce que des personnes y ont cru et mon soutenu et qui sont d'une ouverture et d'une simplicité sans limite. Elle m'offre ainsi l'agréable opportunité d'exprimer mes sentiments d'une profonde gratitude à un certain nombre de personnes dont le soutien et le précieux concours ont facilité sa réalisation. Il me plait de remercier ici :

Je tiens à remercier le Dr **Mawlouth DIALLO**, Responsable de l'Unité d'Entomologie Médicale (UEM) de l'Institut Pasteur de Dakar, qui m'a accueilli au sein de son équipe et a dirigé ce travail. Il m'a appris beaucoup au fil des ans, et je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé et soutenu, tant sur le terrain qu'au laboratoire, sur le chemin complexe de l'Entomologie Médicale. Son ouverture d'esprit, sa rigueur scientifique, son souci de perfection bien connu en font un scientifique résolument singulier ! Il démontre tous les jours et faces à toutes les situations sa capacité de leadership, de réactivité et de dynamisme.

Un remerciement spécial au Pr **Ousmane FAYE** notre maître, père spirituel en Entomologie dont ses nombreuses publications avec la somme des connaissances qui y est synthétisée constituent une puissante incitation pour la mise en chantier et l'achèvement du présent document. Co-Directeur de cette thèse, il a toute ma gratitude pour sa confiance, son soutien et sa disponibilité qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie le Pr **Cheikh Tidiane BA** qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Nous vous devons une large part de reconnaissance pour les efforts fournies dans le cadre de notre formation depuis la première année de Sciences Naturelles. J'ai toujours été impressionné par votre simplicité, vos compétences et votre rigueur scientifique appréciées par tous. Plus qu'un maître, vous êtes et resterez toujours une référence, un modèle pour moi.

Mes sincères remerciements au Dr **Jacques A. NDIONE**, chercheur au Centre de Suivi Ecologique. Vous me faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Cela traduit votre disponibilité et votre humanisme qui ont toujours forcés notre admiration. Veuillez

Je remercie également le Pr **Oubri Bassa GBATI**, chercheur au Service de Parasitologie, Maladies Parasitaires et Zoologie Appliquée. Vous m'honorez de votre présence dans ce jury de thèse. J'espère avoir su m'inspirer de votre style clair et précis pour ma rédaction.

J'adresse mes s'sincères remerciements au Pr **Roger Clément TINE** pour avoir accepté de juger ce travaille malgré un agenda particulièrement chargé. Vos excellentes qualités d'enseignant ont toujours forcé note admiration. C'est grand honneur de vous compter parmi le jury.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr **Ibrahima DIA**. Il m'a appris beaucoup au fil des ans, et je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé et soutenu, tant sur le terrain qu'au laboratoire, sur le chemin complexe de l'Entomologie Médicale. Il est d'une nature énergique, active et tenace. Il aime l'ordre et a le sens pratique et un esprit organisateur. Il jouit d'une haute considération morale et a de solides compétences et une grande expérience pratique en matière de recherche.

Je tiens à remercier le Dr **Yamar BA**. Il m'a appris beaucoup au fil des ans, et je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé et soutenu, tant sur le terrain qu'au laboratoire, sur le chemin complexe de l'Entomologie Médicale. Il est à la fois un scientifique de haute qualité qui est doté d'un esprit critique sans faille et un homme de terrain riche d'une très grande expérience. C'est une personne très active, sociable, généreuse et sincère.

Il me plait de remercier ici le Dr **Diawo DIALLO**. Il m'a appris beaucoup au fil des ans, et je lui suis reconnaissant de m'avoir guidé et soutenu, tant sur le terrain qu'au laboratoire, sur le chemin complexe de l'Entomologie Médicale. Il n'a cessé de me prodiguer ses conseils. Je lui exprime toute ma gratitude. Il est à la fois un scientifique de haute qualité qui est doté d'un esprit critique sans faille et un homme de terrain riche d'une très grande expérience.

J'exprime m'a profonde gratitude au Pr **André SPIEGEL**, Administrateur Générale de la Fondation IPD, qui a bien voulu m'accueillir, en tant que stagiaire. Je le remercie sincèrement pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse dans des conditions favorables.

J'adresse ma sincère et profonde reconnaissance aux Drs **Amadou Alpha Sall** (Directeur scientifique au sein de la Fondation IPD) et **Ousmane FAYE** qui dirigent l'Unité des Arbovirus et Virus de Fièvres Hémorragiques (UAVFH) à l'IPD. Ils ont mis à notre

disposition les souches virales utilisées dans cette présente étude ainsi que le matériel pour les tests Virologiques. J'ai été très heureux de pouvoir bénéficier de leurs qualités scientifiques.

Je tiens également à remercier le personnel de cette Unité (Arame BA, Nabou, Maguèye, Carlos, Aïssatou NDIAYE, Fany, Mousa Dia, Idrissa, Khardjata MBAYE, Fatou DIA, Moussa Moise, Fatim BA, Cheikh LOUCOUBAR, Henriette Martin, Ndèye Saha BOP, Fatou SOW, Oumar NDIAYE, Bakary SADIO, Cheikh FALL, NAEMA etc…) pour leur accueil et leur collaboration à ce travail.

Etant donné que j'apprécie énormément les commentaires et les suggestions, je remercie le Dr Lassana KONATE pour ses remarques constructives sur ce document. Il n'a pas hésitez une seule fois à nous dire ce qu'il pensait de ce travail.

Je formule tous mes remerciements aux Drs Oumar FAYE et Gamou FALL pour leurs soutiens et leurs informations fournis sur les différentes réactifs et souches virales utilisés et sur les tests virologiques. Au Dr Abdourahmane SOW auprès duquel j'ai eu le plaisir de travailler.

J'associe dans cette même pensée amicale à tout le corps professoral de la Faculté des Sciences et Techniques qui se sont investi à fond dans notre formation. Ils sont d'une nature réaliste et positive, avec un sens pratique très prononcé.

Je remercie Amadou THIAW, Abdou Karim BODIAN et Malick MANGA pour leur excellente assistance technique et l'entretien des moustiques et sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible dans le temps limité dont je disposais.

Je tiens à remercier le personnel du service technique et Infrastructure (STI) ainsi que le service Informatique de l'IPD pour leur disponibilité sans faille, leur aide et conseils qu'ils mont apportés. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma vive reconnaissance.

Il m'est agréable d'exprimer ici mes remerciements très particulières à tous ceux dont l'aide constante et divers m'a permis de mener à bien ce travail : Drs Elhadji Amadou NIANG, Badara SAMB, Cheikh TD DIAGNE, Elhadji Malick NGOM, Alioune GAYE, Faty Amadou SY, Marième GUEYE, Libasse SALL, Myriam Diarra, Ndèye Django Faye, Constantin Diémé, Boubacar Mbaye…

Il m’est agréable de remercier tout le personnel de la fondation IPD : Abdoulaye FALL, Jean Pierre VIREY, Mme Camille ABBEY, Mame Birame NDIAYE, Mme SECK, Santiago…Et le personnel du département de Biologie Animale de l’UCAD, chercheurs, experts, agent administratif, et techniciens, qui de près ou de loin ont contribué à l’élaboration de ce travail.

L’échantillonnage des moustiques, dont les résultats sont présentés dans ce document, a été mené à la station de Barkédji. Nous remercions vivement l’ensemble des habitants de cette localité et ceux des villages environnants ayant participé à cette étude, pour leur accueil et coopération, en particulier Alioune SY (le vigile de la station qu’on considère comme un parent) pour avoir rendu les séjours à Barkédji très sympathique ainsi à Sadio SOW qui est notre GPS vivant sans qui notre échantillonnage allai être très difficile et considère comme un frère qui est d’une simplicité et d’une ouverture sans limité. Sans oublié Amath SECK qui est notre appât humain et qui d’une simplicité sans limite ainsi notre restauratrice Awa FALL avec ses délicieux plats qui nous ont permis d’avoir de la force pour travailler.

Nous sommes reconnaissants à toutes les personnes qui ont aimablement fourni des données utiles, références bibliographiques ou des connaissances particulières. Ceux dont le nom a ici été omis nous pardonneront ; ce n’est en rien intentionnel.

GLOSSAIRE

Antigène : substance qui, introduite dans l'organisme, engendre des anticorps.

Arbovirus : se dit des virus dont la transmission biologique se fait par l'intermédiaire d'un arthropode (e.g. moustiques, ticks, etc…). Dans le cas des arbovirus transmis à l'homme, les moustiques sont les plus importants.

Arthropode : animal constitué d'une suite d'anneaux durs extérieurement, souplement articulés entre eux et dont certains portent une paire d'appendices ventro-latéraux (pattes par exemple), eux même divisés en segments articulés. L'embranchement des arthropodes comprend entre autres la classe des insectes (poux, puces, punaises, phlébotomes, simulies, glossines, moustiques, etc…).

Capacité vectorielle : la capacité vectorielle d'une population de vecteurs représente le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'on hôte infectant est susceptible de générer par l'intermédiaire de la population vectrice par unité de temps.

Cycle gonotrophiques : ce cycle correspond à la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez un arthropode vecteur entre le repas de sang et la ponte des œufs.

Effet cytopathogène : changement dans l'architecture confluente des cellules d'un système de culture dû à leur épaississement et un rétrécissement de leur noyau (pycnose), la formation de corps d'inclusion et de cellules géantes (syncytia), déplacement nucléolaire, réarrangement et marginalisation de la chromatine nucléaire et une vacuolisation.

Endémie/enzootie : persistance dans une région d'une maladie, qui se manifeste en permanence ou périodiquement, les termes d'endémie et d'épizootie s'appliquent respectivement à une maladie humaine et animale.

Epidémie/enzootie : émergence ou augmentation subite et rapide de l'incidence d'une maladie infectieuse dans une population humaine d'une région donnée. Dans le cas d'une population ou d'un groupe de populations animales, on parle d'épizootie.

Epidémiologie : étude de la distribution et des déterminants d'évènements de santé (i.e. des facteurs individuels et d'environnement qui peuvent avoir une influence positive ou négative), dans une population humaine, animale ou végétale.

Hématophage : se dit d'un animale qui se nourrit de sang [hémato = sang, phage =manger].

Hôte d'amplification : hôte dans lequel un agent infectieux se réplique pour atteindre des concentrations suffisamment élevées pour sa transmission à des nouveaux hôtes.

Hôte réservoir : toute espèce dans l'organisme de laquelle au moins un agent pathogène (ex : virus, bactérie, nématode, parasite, prion pathogène, etc…) prolifère de manière prépondérante (généralement sans préjudice majeur à elle-même) et se produit d'une manière telle qu'il peut être transmis à un hôte sensible.

Infection : pénétration et multiplication d'une entité étrangère dans un organisme réceptif. Son issue peut être apparente (maladie) ou inapparente (portage).

Maladie endémique : présence permanente ou à une certaine période une maladie ou d'un agent infectieux dans un groupe de populations humaines dans une zone géographique donnée.

Péridomestique : se dit d'un vecteur dont ses activités se déroulent principalement à l'intérieur et en marge des habitats humains.

Réponse immune : activation du système immunitaire face à une agression d'un organisme.

Réservoir : espèce, milieu ou mécanisme permettant la survie, sans en souffrir, d'un agent pathogène considéré en tant qu'espèce dans la nature.

Selvatique : ayant trait à une forme d'une maladie ou d'un virus qui circule chez les animaux sauvages (dans le cas de la fièvre jaune, chez les primates non humains) dans la forêt.

Souche : un clone ou variante génétique ou sous-type d'un micro-organisme (e.g. virus, bactérie ou champignon) qui diffère par une ou plusieurs caractéristiques héritées provenant d'autres organisme de la même espèce.

Susceptible : individu hôte n'étant pas immunisé contre une maladie.

Transmission verticale : transmission d'un pathogène d'une femelle infectée à sa descendance (mâles et femelles) via les œufs.

Trophie : processus d'alimentation d'une espèce donnée.

1) **Anthropophile :** se dit de la tendance, affinité des espèces à vivre à vivre au contact de l'homme en tant que source de nourriture.
2) **Primatophile :** se dit l'attraction d'une espèce aux primates en particulier en tant que source de nourriture.
3) **Simiophile :** indique l'attraction par rapport aux singes en tant que source de nourriture.
4) **Zoophile :** se dit de l'affinité d'une espèce à vivre au contact d'un animal en tant que source de nourriture.

Vecteur (d'une maladie) : arthropode (insecte, tique) hématophage pouvant assurer la transmission biologique ou mécanique active d'un agent infectieux (virus, parasite, bactérie, etc…) d'un individu infecté (un hôte vertébré : homme ou animal) à un autre vertébré sensible.

Virémie : la présence d'un virus dans le système circulatoire de l'hôte vertébré, qui peut éventuellement permettre au virus de se disséminer sur d'autres tissus. Cela est essentiel pour la transmission du virus par un arthropode vecteur.

Virus : agent infectieux qui se compose généralement d'une molécule d'acide nucléique dans une enveloppe protéique, trop petit pour être visible au microscope optique et capable de se multiplier uniquement à l'intérieur des cellules vivants d'un hôte.

Zoonose : une infection ou une maladie infectieuse transmissible dans des conditions naturelles des animaux vertébrés à l'homme. Elle peut être enzootique ou épizootique.

Liste des Abréviations et Acronymes

°C : Degré Celsius

aa : Acides aminés

ACAV : Virus Acado

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ae : *Aedes*

AFO : Lignée Afrique de l'Ouest

An : *Anopheles*

ANOVA : Analyse Of Variance

ANSD : Agence National de la statistique et de la Démographie

APD : Aide Publique au Développement

AP-61 : Lignée cellulaire d'*Aedes pseudoscutellaris*, clone 61

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine 5'-Triphosphate

BAGV : Virus Bagaza

BKJV : Virus Barkedji

BIGS : Barrière à l'Infection des Glandes Salivaires

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BM : Banque Mondiale

C-17 : Lignée cellulaire d'*Aedes aegypti,* clone 17

C6/36 : Lignée cellulaire d'*Aedes albopictus*

CCEEA : Comité Consultatif d'Ethique en Expérimentation Animale

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CDC-C : Pièges lumineux de type CDC au niveau de la Canopée

CDC-S : Pièges lumineux de type CDC au niveau du Sol

CMC: Carboxyméthyl Cellulose

CNRS: Comité National d'Ethique de la Recherche en Santé

CRORA : Centre Régional OMS de Référence et de Recherche sur les Arbovirus

Cx. : *Culex*

dpi : day post infection

$DICC_{50}$: Dose Infectant 50% des cellules d'un système de culture cellulaire

ECP : Effet Cytopathogène

ED-SEV : Ecole Doctorale Science de la Vie, de la Santé et de l'Environnement

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (test d'immunoabsorption enzymatique)

EISMV : Ecole Inter-Etat des Sciences et Médecine Vétérinaire

Er. : *Eretmapodites*

Fi. : *Ficalbia*

FIPD : Fondation Institut Pasteur de Dakar

FMPOS : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie

FST : Faculté des Sciences et Techniques

GAVI: Global Alliance for Vaccine and Immunization

FVRV : Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift

h : Heure

HR: Humidité relative

IA : Immune Ascite

IFI : Immunofluorescence Indirecte

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

jpi : jours post-infection

IP : Institut Pasteur Paris

IPD : Institut Pasteur de Dakar

LAIV : Laboratoire des Arbovirus et Insectes Vecteurs

L-15 : Milieu de culture Leitbovitz-15

LAV : Lutte antivectorielle

LEVP : Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire

MC : Moustiquaire appâté avec la chèvre

MH : Moustiquaire appâté avec l'Homme

MM : Moustiquaire appâté avec le Mouton

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

min : Minutes

MSASS : Ministère de la Santé et de l'Action Sociale du Sénégal

NDUV : Virus Ndumu

NIH : National Institutes of Health

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAA-C : Piège à Appât Animaux + lumière avec la Chèvre

PAA-M : Piège à Appât Animaux + lumière avec le Mouton

PAA-P : Piège à Appât Animaux + lumière avec le Poulet

PAO-PgC : Piège à Appât Oiseau avec des Pigeons au niveau de la canopée

PAO-PgS : Piège à Appât Oiseau avec des Pigeons au Sol

PAO-PC : Piège à Appât Oiseau avec le Poulet au niveau de la canopée

PAO-PC : Piège à Appât Oiseau avec le Poulet au Sol

PBS : Phosphate

pfu : Plaque Forming Unit

PIE : Période d'Incubation Extrinsèque

RT-PCR : Reserve Transcription-Polymerase Chain Reaction

SANV : Virus Sanar

s.l. Sensu lato

SNN : Souriceaux Nouveau-Nées

sp : Species

spp : Species plurinae

SVF : Sérum de Veau Fœtal

UAVFH : Unité des Arbovirus et Virus de Fièvres Hémorragiques

UCAD : Université Cheikh Anta Diop de Dakar

UEM : Unité d'Entomologie Médicale

UER : Unité d'Enseignement et de Recherche

UNCV : virus non classés

Ur. : *Uranotenia*

USUV : Virus Usutu

VBF : Virus Barmah Foret

VCHIK : Virus Chikungunya

VDEN : Virus Dengue

VEE : Virus de l'Encéphalite Equine

VSIN : Virus Sendbis

VWN : Virus du West Nil

WHO: World Health Organization

YAOV : Virus Yaoundé

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

PARTIE 1: GENERALITES 4
I.1 Moustiques et transmission des arbovirus 4
I.1.1 Définition des Arbovirus.....4
I.1.2 Transmission des arbovirus.....4
I.1.3 Moustiques vecteurs 5
I.1.4 Densité 6
I.1.5 Longévité des vecteurs.....7
I.1.6 Mouvements.....7
I.1.7 Comportements trophiques 8
I.1.8 Influence des facteurs climatiques.....9
I.2 Les réservoirs des arbovirus.....9
I.3 La Fièvre de la vallée du Rift.....11
I.3.1 Agent causal 12
I.3.2 Les symptômes cliniques : 13
I.3.3 Le Diagnostic du VFVR : 16
I.3.4 Traitement et Prévention.....17
I.3.5 Vecteurs et Cycle de transmission :.....17

PARTIE 2: COMPETENCE VECTORIELLE DES MOUSTIQUES DU SENEGAL AVEC DIFFERENTES SOUCHES ET LIGNEES NATURELLES ET VACCINALE DU VIRUS DE LA FIEVRE DE LA VALLÉE DU RIFT 21
II.1. Introduction 21
II.2 Matériels et méthodes 23
II.2.1 Sélection des souches de virus.....23
II.2.2 Choix des espèces et élevage 25
II.2.3 Capture et Élevage des moustiques.....26
II.2.4 Procédures d'infection des moustiques. 28
II.2.4.1. Prélèvement et lavage du sang pour l'infection 30
II.2.4.2. Préparation du repas mixte (sang virémique) 31
II.2.4.3. Exposition des moustiques au repas et leur traitement à la fin du repas 32
II.2.5 Traitement des moustiques après incubation.....35
II.2.6 Détection du virus de la FVR par RT-PCR temps réel 36
II.2.6.1 Broyage.....36
II.2.6.2 Extraction de l'ARN viral :.....37
II.2.6.3 La RT-PCR temps réel.....38
II.2.7 Analyse des données 40
II.3. Résultats 40
II.3.1. Caractérisation moléculaire des souches virales utilisées 41
II.3.2. Compétence vectorielle des populations de moustiques de Barkédji vis- a-vis des souches naturelles de VFVR 43
II.3.2.1. Infection.....43
II.3.2.2. Dissémination :.....46
II.3.2.3. Transmission 48
II.3.3. Susceptibilité et capacité d'*Aedes vexans* à transmettre la souche vaccinale MP_12. 49
II.4. Discussion.....50
II.5. Conclusion.....55

PARTIE 3: ETUDE DU RÔLE DES MOUSTIQUES DANS LES CYCLES DE MAINTIEN DU VIRUS DE LA FIÈVRE DE LA VALLEE RIFT.....56
III.1 Introduction 56

III.2 Matériels et Méthodes....57
III.2.1. Moustique et souche virale utilisés....57
III.2.2. Procédure expérimentale....57
III.3. Résultats....58
III.4 Discussion....59

PARTIE 4: ETUDE DE L'IMPACT DE L'INFECTION SUR LA LONGEVITE DES VECTEURS....61
IV.1. Introduction....61
IV.2. Matériels et Méthodes....62
IV.2.1. Moustiques :....62
IV.2.2. Les souches virales :....62
IV.2.3. Infection Orale des Moustiques....63
IV.2.4. Traitement des moustiques après exposition....63
IV.2.5. Analyse des résultats....63
IV.3. Résultats....64
IV.4. Discussion....67

PARTIE 5 : BIODIVERSITE DES ARBOVIRUS ET LEURS VECTEURS À BARKEDJI70
V.1 Introduction....70
V.2 Matériels et méthodes....71
V.2.1 Zone d'étude....71
V.2.2 Collecte de Moustiques :....74
V.2.3 Traitement des moustiques collectés....78
V.2.3.1 Identification morphologique....78
V.2.3.2. Détection virale sur les échantillons collectés....79
V.2.4 L'analyse des données....80
V.3. Résultats....80
V.3.1 Collectes de moustiques....80
V.3.2 Virus détectés....85
V.3.2.1. Le virus West Nile....89
V.3.2.2. Le Virus Usutu....89
V.3.2.3. Le Virus Acado....90
V.3.2.4. Le virus Bagaza....90
V.3.2.5. Le virus Barkedji....90
V.3.2.6. Le Virus Ndumu....91
V.3.2.7. Le Virus Sanar....91
V.3.2.8. Le Virus Sindbis....91
V.3.2.9. Le Virus Yaoundé....92
V.3.2.10. Le Virus de la vallée du Rift de la fièvre....92
V.3.2.11. Virus non classé....92
V.4 Discussion....96

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES....104

LISTE DES PUBLICATIONS....106

PUBLICATION SOUMISES ET ACCEPTEES....106

PUBLICATION SOUMISES....106

LISTE DES ARTICLES EN PRÉPARATION....107

BIBLIOGRAPHIE....108

Introduction générale

Ces dernières années, les maladies infectieuses, et en particulier les «arboviroses» apparaissent de plus en plus à une fréquence inhabituelle. Depuis leur découverte, le nombre d'arbovirus, responsables de maladies, ne cesse d'augmenter et de s'étendre géographiquement. Les connaissances actuelles font désormais état de plus de 600 prototypes viraux transmis par des arthropodes, dont une centaine serait impliquée dans des pathologies humaines tels que la Fièvre de la Vallée du Rift (FVR), la fièvre West Nile (WN), le Chikungunya (CHIK), la dengue (DEN), le ZIKA, USUTU entres autres arboviroses majeures dans le Monde.

Ce répertoire est loin d'être exhaustif puisque, nous assistons régulièrement à une reclassification d'arbovirus connus et caractérisés mais également à la découverte de nouveaux arbovirus. Pour ne prendre que l'exemple du Sénégal le virus Tattagine longtemps considéré comme un virus à entière est aujourd'hui reclassé comme une lignée de West Nile ; le virus Barkédji suspecté pendant longtemps appartenir aux lignées de West Nile est aujourd'hui considéré comme un virus à part. Dans le cadre d'études réalisées à Barkédji (Ba et *al.*, 1999) des arbovirus trouvés associés aux Phlébotomes sont considérés comme nouveaux et sont encore en attente d'une nomenclature. Des études de description des viromes naturels utilisant des procédés de séquençage à haut débit et d'analyse bio-informatique permettent actuellement la découverte de nouveaux virus à ARN associés aux moustiques. Ces découvertes sont étroitement liées aux avancées technologiques en matière de diagnostic mais également à de nouvelles approches et méthodes d'échantillonnage permettant de collecter une grande diversité de moustiques vecteurs et par conséquent de virus qui leur sont associés.

L'apparition imprévisible de ces maladies à transmission vectorielle montre bien que peu de choses sont connues sur l'écologie des agents étiologiques, leur maintien dans l'environnement en période inter-épidémique et leurs mécanismes d'émergences ou de réémergences.

Au Sénégal, l'intérêt porté à ces arbovirus avait motivé, la mise en place de programmes d'épidémiosurveillance aussi bien à Kédougou (au sud Est) qu'à Barkédji (au centre) afin de suivre régulièrement la situation épidémiologique de certaines arboviroses [Dengue, Fièvre

Jaune (FJ), Fièvre de la Vallée du Rift (FVR)], de détecter l'émergence de maladies connues dont les agents responsables ou les vecteurs ne sont pas encore identifiés (certaines leishmanioses), d'identifier de nouveaux pathogènes ou de suivre l'évolution du pouvoir pathogène de certains virus à la faveur de circonstances particulières. En effet, si dans la plupart des cas, la nature des modifications génétiques spontanées affectant un agent pathogène passent inaperçues, dans d'autres cas, ce changement confère à l'agent pathogène une virulence accrue et une plus grande capacité de diffusion. Ces modifications des propriétés de l'agent pathogène créent des conditions propices à la transmission et à la diffusion d'agents dont l'impact était faible jusque là. Les épidémies de fièvres zikaet chikungunya actuelles illustrent bien cette situation.

Mais quelle que soit la maladie émergente considérée, les données sur les mécanismes à l'origine de son émergence sont fragmentaires et disparates. Une amélioration de nos connaissances dans ce domaine est nécessaire pour aider au diagnostic précoce et à la prévention. Quoiqu'il en soit, ces émergences apparaissent assez souvent comme la conséquence de la rupture d'un état d'équilibre préexistant, rupture qui survient à la faveur de modifications des propriétés de l'agent pathogène ou de profonds changements de l'environnement.

Concernant la FVR, les études réalisées au Sénégal ont permis de mettre en évidence plusieurs amplifications de son cycle enzootique en 1993 et 2002-2003 et des associations naturelles du virus avec plusieurs espèces de moustiques dont *Ae. vexans, Ae. ochraceus, Ae. fowleri, Ae. dalzieli, Cx. poicilipes, Ma. africana* et *Ma. uniformis* (Zeller *et al.,* 1997 ; Ba *et al.,* 2005 ; Ba *et al.,* 2012 ; Diallo *et al.,* 2000 ; Fontenille *et al.,* 1998). Ces études ont également permis en utilisant les données générées sur le terrain, de développer des modèles statistiques mixtes pour quantifier l'impact de la variabilité des facteurs climatiques et environnementaux sur la dynamique spatio-temporelle des principaux vecteurs (Talla *et al.,* 2014). Malgré ces avancées significatives qui ont été obtenues dans la recherche des associations virus- vecteurs dans la nature, beaucoup de questions restent encore en suspends, notamment sur les mécanismes d'émergence et de maintien du virus. C'est le cas de la compétence vectorielle des moustiques trouvés associés au virus dans la nature qui n'est pas encore explorée. Par conséquent, les cycles de transmission proposés demeurent pour la plupart hypothétiques puisque établis à partir des données obtenues du terrain ou extrapolés depuis d'autres contextes géographiques. Concernant le maintien du virus de la FVR, la transmission verticale, a été démontrée expérimentalement (Turell *et al.,* 1990) et mise en évidence dans la nature dans le contexte Est africain (Linthicum *et al.,* 1985 ; Romoser *et al.,*

2011). La rareté de ce phénomène dans la nature et sa non mise en évidence dans le contexte ouest africain ne permet pas de le considérer comme unique mécanisme de maintien et suggère des études approfondies pour l'élucider.

C'est dans ce contexte que nous avons mené cette présente étude avec pour objectifs :

1. Evaluer la compétence vectorielle des moustiques trouvés associés au virus de la FVR au Sénégal pour différentes souches et lignées Est et Ouest du virus FVR afin de mieux préciser leur statut vectoriel.
2. Etudier le rôle des moustiques dans le processus de maintien du virus durant les périodes défavorable à la transmission.
3. d'étudier sur le terrain la biodiversité des vecteurs et des virus qui leurs sont associés.

PARTIE 1

Généralités

I.1 Moustiques et transmission des arbovirus

I.1.1 Définition des Arbovirus

Le terme Arbovirus (*Arthropode borne virus*) provient d'un jargon de laboratoire utilisé pour la première fois par Reeves (Reeves, 2001). Il désigne des virus d'animaux qui sont transmis à des hôtes vertébrés par des arthropodes vecteurs hématophages. Les principales caractéristiques des arbovirus sont leur capacité à se répliquer alternativement chez les hôtes vertébrés et chez les arthropodes vecteurs, la transmission du virus par un arthropode vecteur à un hôte vertébré présentant une virémie et la transmission directe comme mode alternative.

I.1.2 Transmission des arbovirus

La transmission des arbovirus est à l'origine inter_animale mais peut s'effectuer de l'animal à l'homme ou encore entre homme. Les agents infectieux responsables des maladies transmissibles se trouvent confrontés à plusieurs problèmes pour assurer leur persistance et leur dissémination. Les solutions qu'ils ont développées, par adaptation progressive, sont variées, ingénieuses, plus ou moins complexes selon la nature du pathosystème. Parmi ces solutions, la plus élaborée est sans doute le passage par un arthropode hématophage qui sert alors de vecteur (Rhodain, 1989, 1991). La réussite d'une transmission vectorielle nécessite trois étapes successives : l'infection du vecteur, le développement de l'agent pathogène chez le vecteur et enfin la transmission de l'agent pathogène vers un hôte.

L'infection du vecteur a lieu lors d'un repas de sang pendant lequel se réalise le contact entre un arthropode vecteur potentiel et un vertébré infectant.

Suivant la nature de l'agent pathogène l'issue de cette infection sera différente. Pour les virus, une réplication, se déroule dans plusieurs cellules de l'organisme de l'arthropode et dans des conditions physico_chimiques favorables. Cette phase est dite «incubation intrinsèque» et correspond à la période entre le repas de sang infectieux et le moment où le vecteur devient infectant. Pendant cette étape vont intervenir le rôle de la membrane péritrophique, celui des éventuels récepteurs spécifiques au niveau de certaines cellules, ainsi que de nombreux facteurs externes, en particulier la température. L'action conjuguée de tous ces facteurs conditionnera la réalisation ou non du développement du virus et de la durée de ce développement. Une quantité minimale de particules virales, appelée dose infectante, est nécessaire pour que le moustique s'infecte de façon durable. Une fois infecté, le moustique le demeure toute sa vie. Après ingestion du sang infectant, le virus effectuera d'abord sa réplication dans les cellules épithéliales du tube digestif, première barrière à l'infection. Le virus va interagir avec les récepteurs spécifiques des cellules épithéliales permissives à ce niveau. Après multiplication, il franchira alors l'épithélium intestinal, deuxième barrière, pour atteindre l'hémolymphe, voie lui permettant de se disséminer dans les différents organes, dont les glandes salivaires où il se répliquera de nouveau pour atteindre un titre maximal (Hardy et *al.*, 1983 ; Mellor, 2000). Les passages obligatoires des deux principales barrières (intestins et les glandes salivaires) augmentent considérablement la difficulté de la réalisation du cycle de développement du virus dans l'organisme de l'arthropode. Par conséquent un nombre infime d'arthropodes arriveront à assurer ce processus pour devenir infectant.

Le mode de transmission dépendra du système vectoriel considéré, la localisation du virus au moment des contacts avec le vertébré hôte. Chez les moustiques, il est possible lorsque le virus après dissémination atteint les organes sièges de la transmission que sont les glandes salivaires (transmission horizontale) ou les ovaires (transmission verticale).

I.1.3 Moustiques vecteurs

Un arthropode n'est considéré comme vecteur d'arbovirus que s'il est habituellement infecté dans la nature, entretient avec l'hôte vertébré du virus des rapports trophiques étroits et est capable de transmettre expérimentalement le virus d'un animal infecté à un animal sain après une incubation extrinsèque dont la durée est compatible avec sa longévité dans les conditions naturelles (Rickenbach & Mouchet, 1981).

Les notions de «compétence vectorielle» et «capacité vectorielle» définissent l'efficacité de la transmission d'un pathogène par un vecteur potentiel. La compétence vectorielle exprime le degré de coadaptation entre le virus et le vecteur. La capacité vectorielle, en revanche, exprime le niveau de fonctionnement du système vectoriel dans un environnement donné, à un moment précis. Cette efficacité dépendra de plusieurs facteurs : (i) les facteurs intrinsèques au vecteur (sa durée de survie, son taux de reproduction, ses préférences trophiques, la distribution et la densité des populations, sa probabilité de rencontre avec un hôte vertébré infecté), (ii) les facteurs environnementaux (variation de la température et de l'humidité, des vents, durée du jour et de la nuit…). (Failloux et *al.*, 1999, 2002; Hardy et *al.*, 1983).

I.1.4 Densité

Pour qu'un vecteur puisse jouer un rôle dans la transmission d'un virus, il faut d'abord qu'il soit bien représenté. Cependant, la détermination du nombre de moustiques indispensables pour que la transmission du virus puisse être établie demeure encore problématique. On suppose qu'il y a une densité vectorielle minimale pour qu'il ait passage séquentiel du pathogène d'un hôte à un autre. Lorsque la population de vecteurs se situe en dessous de cette limite, la fréquence de contact entre hôte et vecteur devient trop faible pour que la transmission puisse continuer (Service, 1993). Par contre, dès que la densité de vecteur dépasse ce seuil, la transmission devient plus efficace.

Pour les arbovirus, il est difficile de différencier les niveaux de populations de vecteurs nécessaires pour maintenir le cycle endémique, par rapport au niveau de population susceptible de provoquer des épidémies en permettant l'infection des hôtes accidentels que sont l'homme et les animaux domestiques (Reeves, 1965).

Plusieurs études ont essayé de déterminer les niveaux des populations vectorielles qui coïncident avec les épidémies et le degré avec lequel ils dépassent les populations qui sont associées au cycle de maintien des mêmes virus (Reeves, 1965). (Reeves 1968 ; Reeves 1969), par exemple, a montré que pour des densités de population de *Cx. tarsalis* inférieur ou égales à 10 moustiques par piège par nuit, le risque d'encéphalite chez l'homme due à l'encéphalite équine de l'Ouest (WEE) devient nul et le virus de l'encéphalite de Saint Louis (SLE) va probablement disparaître de l'environnement. Pour des densités de *Cx. tarsalis* inférieures ou égales à 1 moustique par piège par nuit, les deux arbovirus vont disparaître de l'environnement. Il a été noté que les manifestations des arbovirus sont souvent notées au

moment où les densités des vecteurs sont à leurs pics ou juste après (Andreadis *et al.*, 2004). Pour la fièvre de la vallée du Rift, il est généralement admis que les épidémies sont associées à des augmentations considérables des densités de vecteurs à la suite d'importantes pluies ou de la mise en place de barrages (Woods et *al.*, 2002 ; Nabeth et *al.*, 2001).

I.1.5 Longévité des vecteurs

La connaissance de l'âge des vecteurs est d'une importance capitale dans l'épidémiologie des arbovirus. Elle permet de savoir quelle proportion de la population de femelles agressives s'est déjà gorgée et par conséquent celle qui est potentiellement infectée. En effet, pour qu'un moustique puisse transmettre biologiquement un arbovirus, il faut qu'une proportion significative de la population de ce moustique prenne au moins deux repas de sang sur des vertébrés infectés et susceptibles à la fois. Les moustiques doivent aussi avoir une durée de vie suffisante pour permettre l'incubation extrinsèque du virus. Les moustiques infectés peuvent infester d'autres vertébrés le reste de leur vie. Par conséquent, plus une population est âgée, plus sa capacité vectorielle est importante. L'âge des moustiques vecteurs peut être déterminé par l'observation des ovaires des femelles pour l'âge physiologique (Detinova, 1962) ou par la technique du marquage lâcher et recapture pour la longévité des femelles dans la nature.

I.1.6 Mouvements

Les mouvements des moustiques influencent directement la transmission des arbovirus. Ils peuvent être horizontaux (d'une localité à une autre) ou verticaux (entre différentes hauteurs dans la même localité). La détermination de la capacité de dispersion horizontale des vecteurs permet de connaître la distance et la vitesse de dissémination des arbovirus. Elle permet également de délimiter la zone à risque dans le cadre d'une épidémie et la zone à couvrir dans le cadre de la lutte contre ces vecteurs. La dispersion peut se faire à l'échelle micro géographique ou macro géographique. La dispersion micro géographique se fait surtout de manière active, par le vol des femelles à la recherche de repas de sang ou de gîtes de ponte ou de repos. La technique habituelle pour évaluer cette dispersion est le marquage de femelles par des poudres fluorescentes ou des traceurs radioactifs et de tenter de les récupérer, après lâcher dans la nature, à des distances variées par rapport au point de lâcher (Ba et *al.*, 2005). Cette technique permet d'obtenir des informations sur les distances parcourues par les

vecteurs, l'âge des femelles re capturées et la taille des populations. La dispersion à l'échelle macro géographique des moustiques se fait principalement de manière passive par les vents ou les moyens de transport modernes comme la voiture, le bateau et l'avion (Julvez et *al.*, 1994 ; Sechan et *al.*, 1993 ; Jupp et Kemp, 1992). Cette dispersion peut avoir comme conséquence l'introduction d'un vecteur dans une zone où il n'existait pas et la dissémination des arbovirus à une grande échelle. L'étude des flux de gènes entre différentes populations d'une même espèce permet d'investiguer ce type de dispersion (Slatkin, 1985).

La dynamique verticale des vecteurs permet de comprendre leurs degrés d'association avec les hôtes et de connaître leurs rôles vectoriels. Les moustiques vecteurs d'arbovirus fréquentent les habitats où se trouvent leurs hôtes au moment où ils sont les moins actifs. Dans le cas du VWN par exemple, les vecteurs enzootiques sont les vecteurs qui fréquentent la canopée où nichent les oiseaux tandis que les vecteurs de liaison sont ceux qui fréquentent à la fois la canopée et le sol donc qui peuvent piquer les oiseaux et les hôtes accidentels du virus.

I.1.7 Comportements trophiques

L'hématophagie est une caractéristique indispensable pour qu'un moustique puisse jouer un rôle dans la transmission biologique des arbovirus. La plupart des moustiques ont besoin de repas de sang pour la maturation de leurs œufs (Reeves, 1965), mais présentent des comportements trophiques très variés avec des préférences très marquées pour certains hôtes vertébrés. La possibilité pour un vecteur de s'infecter et de transmettre dépend de son comportement trophique. En effet, pour qu'il puisse s'infecter et transmettre un virus, il faut qu'il soit en contact fréquent avec à la fois des hôtes vertébrés infectants et susceptibles à ce virus. Par exemple, la fièvre jaune est transmise en ville par *Ae. aegypti* qui est un moustique très anthropophile tandis que la fièvre de la vallée du Rift est transmise principalement par les *Aedes* zoophiles (*Ae. mcintoshi, Ae. vexans et Cx. poicilipes*) et la fièvre West Nile par les *Culex* ornithophiles (*Cx. pipiens* et *Cx. univittatus*).

Les repas multiples augmentent considérablement la possibilité pour un vecteur de s'infecter et de transmettre les virus entre hôtes vertébrés et ceux des infections multiples et par conséquent des recombinaisons et des réassortiments entre souches de virus. Ces repas multiples sont des repas de moustiques pris sur deux ou plusieurs hôtes vertébrés. Ils sont dus au fait que les femelles n'ayant pas pris un repas de sang suffisant sur un hôte donné, à cause des réactions défensives de celui-ci par exemple, cherche d'autres hôtes pour le compléter.

Il existe différentes méthodes d'étude du comportement trophique des vecteurs. La méthode directe consiste à l'identification des sources des repas de sang des femelles gorgées capturées dans la nature. Cette identification peut être faite par les tests sérologiques comme l'ELISA (Beier et *al.*, 1988) ou par la technique PCR (Boakye et *al.*, 1999 ; Molaei et *al.*, 2006). Une approche indirecte consistant à exposer des hôtes vertébrés, dans des pièges, et à capturer les moustiques vecteurs qui sont attirés par eux (Hamon et *al.*, 1964) permet également d'évaluer le degré d'interaction hôte-vecteur.

I.1.8 Influence des facteurs climatiques

Les éléments climatiques comme la température, l'humidité relative et la pluviométrie ont un impact direct sur la transmission des arbovirus en agissant à la fois sur les vecteurs, les virus et les hôtes.

La température influence la transmission des arbovirus en modifiant la reproduction et le rythme de piqûres des vecteurs. En effet, des températures élevées entraînent une accélération du cycle de développement des vecteurs avec une réduction de la durée de la phase aquatique mais également de la digestion du repas sanguin et de la maturation des œufs. Ceci à comme conséquence une augmentation de la densité des vecteurs et du rythme de leurs repas sanguins. La température peut modifier également la répartition géographique des vecteurs, altérer la durée d'incubation extrinsèque des virus et, en augmentant ou diminuant le degré de contact vecteur-virus-hôte, affecter la susceptibilité des hôtes (McManus et *al.*, 1992).

L'humidité relative influence la longévité, l'accouplement, la dispersion, le comportement trophique et la ponte des moustiques (McMichael et *al.*, 1996). Les moustiques vivent généralement plus longuement et se dispersent plus lorsque l'humidité relative est importante. La pluviométrie est un des éléments clés du développement des moustiques (Hennessy et Whetton, 1997) puisque les pontes ainsi que les larves et les nymphes de moustiques ont besoin d'eau pour se développer. En plus, les épidémies d'arboviroses sont généralement précédées par de fortes pluviométries entraînant une pullulation de moustiques vecteurs (Linthicum et *al.*, 1999).

I.2 Les réservoirs des arbovirus

Les réservoirs d'arbovirus sont les organismes chez lesquels les virus circulent à bas bruits, sans causer des dommages significatifs. Ils servent de maintien de l'agent infectieux,

lors des périodes inter_endémiques et d'amplificateur pendant les périodes d'épidémies. Les réservoirs primaires des arbovirus sont sans aucun doute les moustiques vecteurs. En effet, en dehors de leurs rôles de vecteurs, les arthropodes peuvent jouer le rôle de réservoirs assurant la survie du virus lorsque son mode de transmission habituelle doit se ralentir ou même s'arrêter temporairement (Rodhain, 1998). Ce rôle de réservoir peut être assuré par les œufs qui résistent à la dessiccation et qui permettent au virus de passer la saison défavorable ou par des individus adultes infectés qui passent en état de vie ralentie pendant les périodes défavorables en hibernation ou diapause selon les contextes écologiques. C'est le cas du VFVR en Afrique de l'Est qui est conservé d'une saison pluvieuse à une autre dans les œufs d'*Ae. mcintoshi* (Linthicum et *al.,* 1985).

Les recherches des réservoirs secondaires hors épidémie sont sujettes à controverse. Par exemple, différents travaux font état de séropositivité vis à vis de CHIKV, DENV et VFVR (Sidenko et Grekov., 1974 ; Kaschula et *al.,* 1978 ; Wolfe et *al.,* 1998 ; Inoue et *al.,* 2003) chez divers vertébrés comme les singes verts (*Cercopithecus aethiops*), le babouin (*Papio papio*), un primate du Sénégal (*Galago senegalensis*), le moineau doré (*Auripasser luteus*), la chauve-souris (*Scotophilus* sp). En revanche, aucun de ces travaux n'apporte des données sur la réplication et la persistance du virus chez ces hôtes, en dehors des épisodes épidémiques. Cependant, il a été établi une périodicité d'épidémie du CHIKV en forêt en liaison avec le renouvellement des populations de singes (au sol et en canopée). Du fait de la résurgence des arboviroses (CHIK, Dengue et FVR en particulier), des recherches sur l'identification de réservoirs potentiels (actifs ou passifs) des arboviroses sont en augmentation dans les régions épidémiques et endémiques. Malgré l'accumulation de nombreuses données au fil des années concernant le maintien et la transmission des arbovirus, des questions demeurent posées. En effet, l'existence d'un cycle enzootique des virus emmène à s'interroger sur le mécanisme de leur diffusion et de leur maintien annuel ou sur plusieurs années. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer l'existence des réservoirs. (i) le virus se maintient dans les œufs de moustiques en période défavorable à travers la transmission verticale de femelle infectée à sa descendance. (ii) le virus se maintient à travers des cycles secondaires de transmission à bas bruit impliquant des vertébrés sauvages. Il est généralement admis que les primates et les oiseaux représentent des réservoirs potentiels impliqués dans le cycle de transmission dans les zones selvatiques. Cependant, la transmission verticale, bien que démontrée expérimentalement (Turell et *al.*, 1990) et mise en évidence dans la nature (Linthicum et *al.*, 1985 ; Miller et *al.,* 2000) se produit à des taux habituellement si faibles qu'il parait difficile de la considérer comme l'unique mécanisme de maintien du virus dans le cycle enzootique.

C'est pourquoi d'autres mécanismes de maintien du virus impliquant des hôtes vertébrés sauvages non encore identifiés pouvant jouer le rôle de réservoirs sont soupçonnés (Ba et *al.*, 2006). Une telle hypothèse est étayée par les infections notées pendant des manifestations de la maladie chez un certain nombre d'animaux domestiques comme les ânes, les chevaux, les chiens, les rongeurs et les chauves_souris et de certains vertébrés sauvages (Diop et *al.*, 2000). Mais la brève durée de la virémie chez les animaux, leur immunité acquise suite à leur première infection et la difficulté de recenser tous les vertébrés qui pourraient intervenir dans le cycle de transmission limite l'exploitation de ces hypothèses alternatives.

I.3 La Fièvre de la vallée du Rift

La maladie a été décrite cliniquement pour la première fois en 1912, près du lac Naivasha dans la région du Rift au Kenya. L'agent pathogène responsable n' a été isolé chez un mouton qu'en 1930 par Daubney (Daubney et *al.*, 1931). Depuis les années 70 des épidémies se sont succédées au fil des années en Egypte en 1977 (Préhaud & Bouloy, 1997), 1997 (Abd-El-Rahim et *al.*, 1999) et en 1993 (Arthur *et al.*, 1993) ; en Afrique du Sud pour la première fois en 1951 (Lefèvre, 1989), en 1975 (Van Velden *et al*, 1977) et en 1999 (EMPRES 1999) ; au Madagascar en 1990 et en 1991 (Peters, 1997; Morvan et *al.*, 1992[b]), (Morvan et *al*, 1992[c]) ; en Somalie et au Kenya en 1997-1998 (Woods et *al.*, 2002).

En Afrique de l'Ouest et centrale, des enquêtes sérologiques et entomologiques ont montré la présence du virus dans de nombreux pays : Mali (Diallo, 2001), RCA (Meegan et *al*, 1983), Nigeria, Guinée (Boiro et *al*, 1987), Niger (Akakpo et *al.*, 1991), Burkina Faso (Gonzalez et *al*, 1992), Congo (Olloy et *al*, 1994), Cameroun, Bénin, Togo (Zeller, 1993), Tchad (Durand et *al*, 2003), et Gambie (Thiongane et Martin, 2002). mais également au Mayotte en 2008 (Sissokho et *al.*, 2009).

En Afrique de l'Ouest, la première épidémie a eu lieu en Mauritanie en 1987 après la mise en eau du barrage de Diama en 1986 (Jouan et *al.*, 1988) bien que le virus ait été détecté avant dans plusieurs contextes géographiques à travers des isolements (connu à l'époque sous le nom de Zinga) chez les moustiques mais aussi la détection d'anticorps chez les animaux et les humains en RCA, Madagascar, Guinée, Nigeria, Sénégal (Digoutte, 1981 ; Meegan et *al*, 1983 ; Boiro et *al*, 1987). A la suite de cette épidémie plusieurs enquêtes sérologiques et entomologiques ont montré la présence du virus dans de nombreux pays : Mali (Diallo, 2001), Nigeria, Guinée (Boiro et *al*, 1987), Niger (Akakpo et *al*., 1991), Burkina Faso (Gonzalez et *al*, 1992), Congo (Olloy et *al*, 1994), Cameroun, Bénin, Togo (Zeller, 1993), Tchad (Durand

et *al*, 2003), et Gambie (Thiongane et Martin, 2002). mais également au Mayotte en 2008 (Sissokho et *al.*, 2009). Egalement plusieurs manifestation épidémique ont été notifiée en Mauritanie en 1998 (Nabeth et *al.*, 2001) en 2003 (Faye et *al.*, 2007), en 2010 (Faye et *al.*, 2014 ; Ould El Mamy et *al.*, 2011) et plus récemment en 2012 (Sow et *al.*, 2014). En octobre-décembre 1994, un foyer de FVR a été déclaré autour de Ross-Béthio, dans le delta du fleuve Sénégal (Sall, 2001).

Au Sénégal, le virus de la fièvre de la vallée du Rift a été isolé en 1974 d'un moustique *Aedes dalzieli* à Kédougou. En novembre 1999, un foyer épizootique a éclaté à Ranérou, au Sénégal, zone de mares temporaires située dans le Ferlo, causant un nombre important d'avortements chez les petits ruminants (Sall, 2001). En 2002, deux foyers épizootiques ont éclaté au Sénégal, près de Galoya et Thilogne (Thiongane et Martin, 2002). Enfin, en 2003, de nombreux troupeaux de petits ruminants ont été touchés par la maladie dans le delta et la vallée du fleuve Sénégal (Faye et *al.*, 2007).

Pour la première fois, le virus a traversé le continent africain et a causé une épidémie dans la péninsule arabique au Yémen et en Arabie saoudite en 2000-2001 (Miller et *al.*, 2002, Jupp et *al.*, 2002) mais également au Mayotte en 2008 (Sissokho et *al.*, 2009).

I.3.1 Agent causal

Le virus de la fièvre de la vallée du rift (VFVR) appartient à la famille des *Bunyaviridae*, au genre *Phlebovirus.* Comme tous les virus de la famille des *Bunyaviridae*, le VFVR estcomposé de trois segments d'ARN simple brin de polarité négatif ou ambisense L (Large), M (Medium) et S (Small) (**Figure 1**). Les segments L et M sont de polarités négatives. L code pour l'ARN polymérase ARN dépendante (Protéine L) et M pour le précurseur des glycoprotéines d'enveloppe (GN et GC). Le clivage post_traductionnel du précurseur génère également une protéine non structurale (NSm) qui n'est pas essentielle pour le déroulement du cycle viral (Won et *al.*, 2006 ; Gerrard et *al.*, 2007). Le segment S utilise la stratégie de codage ambisense (en partie négative et en partie positive). Il code aussi pour la nucléoprotéine N en polarité anti_sens et pour la protéine non_structurale NSs (responsable de facteur de virulence du VFVR), en polarité sens (Giorgi et *al.*, 1991). L'ensemble du cycle se déroule dans le cytoplasme, caractéristique de tous les virus de la famille des *Bunyaviridae,* même si la protéine NSs forme des filaments dans le noyau des cellules infectées par le VFVR (Swanepoel et *al.*, 1979). Le virus fait preuve d'une grande variabilité aussi bien dans son mode de transmission que dans ses choix de vecteurs, mais aussi dans la gravité de ses

symptômes. Il semble donc qu'il ne soit pas encore bien adapté à son environnement, ni à ses hôtes vertébrés et invertébrés.

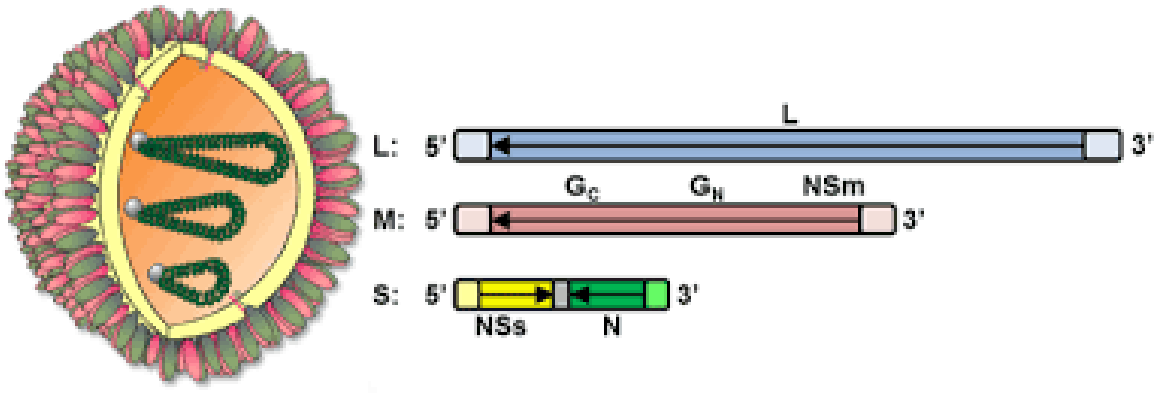

Figure 1 : coupe structurale du virus de la Fièvre de la vallée du Rift (VFVR) (https://www.google.fr/search?q=rift+valley+fever+virus+structure)

Le virus VFVR, comme tout virus enveloppé, est sensible aux solvants des lipides (éther, chloroforme). Il est également inactivé par les désinfectants usuels, tels que le formol, la bétapropiolactone à 0,1% ou le disoxycholate de soude. Il est stable pour un pH compris entre 6,2 et 8,0 et dans le sang ou le sérum : il peut y être conservé pendant 8 mois à 4°C (1 mois à -20 °C et 1 an à -40 °C et plusieurs années à -80°C). A température ambiante (25-30°C), il résiste environ 80 minutes (Balkhy et Memish, 2003). Dans un liquide physiologique, le virus peut donc résister plus ou moins longtemps dans le milieu extérieur selon les conditions. Sa dispersion sous forme d'aérosols est une source de contamination humaine importante dans la nature. Sa manipulation en laboratoire haute sécurité (niveau 3) est obligatoire.

Le séquençage de la région du segment S codant pour NSs, M et L a permis de différencier 3 lignées majeures : la lignée d'Afrique Centrale et de l'Est, la lignée d'Afrique de l'Ouest et la lignée égyptienne. (Sall et *al.*, 1998, 1999).

I.3.2 Les symptômes cliniques

- Chez l'Homme

Chez l'homme, l'incubation de la FVR varie de 2 à 6 jours. Elle est ensuite suivie d'un syndrome «*dengue_like*», caractérisé par une fièvre brutale, de céphalées, de myalgies et de rachialgies. Une photophobie et une raideur dans la nuque font penser à une méningite. La

maladie évolue en 4 à 7 jours vers une guérison sans séquelles chez la forme bénigne caractérisée essentiellement par un syndrome grippal avec une convalescence qui peut durer 2 à 3 semaines. Cette forme dite bénigne représente plus de 95% des cas. Chez les formes graves la maladie se manifeste sous la forme d'un ou plusieurs syndromes : atteintes oculaires, méningo_encéphalite, fièvre hémorragique. L'atteinte oculaire apparaît en général entre une à trois semaines après les premiers signes cliniques. Les lésions siègent au niveau de la rétine et peuvent entraîner une baisse permanente de l'acuité visuelle, voire une cécité. La méningo_encéphalite apparaît une à trois semaines après les premiers symptômes. Des séquelles sont possibles, notamment un type de paralysie et de détérioration mentale. Deux à quatre jours après le début de la maladie, le patient peut également présenter une hépatite avec ictère et syndrome hémorragique : vomissements de sang, méléna, purpura, gingivorragies. Ces formes graves ne s'observent que dans 1% des cas. La mortalité des formes hémorragiques serait d'environ 5% (Morrill & McClain, 1996 ; Al_Hazmi et *al.*, 2003; Madani et *al.*, 2003).

- **Chez les animaux**

De très nombreux animaux sont réceptifs au virus de la FVR mais leur sensibilité varie en fonction de l'espèce, de l'âge (Tableau 1). Les ruminants domestiques (les bovins, les moutons, les chameaux et les chèvres) sont les hôtes vertébrés les plus sensibles. Il semble que les moutons soient plus sensibles que les bovins ou les chameaux. On a montré que l'âge jouait aussi un rôle important dans la sensibilité de l'animal à la forme grave de la maladie : plus de 90 % des agneaux infectés par la FVR meurent, alors que cette proportion peut baisser à 10 % chez le mouton adulte. Le taux d'avortement chez les brebis pleines atteint près de 100 %. Les avortements inexpliqués et de mortalités néo-natales dans le cheptel sont les principaux signes annonciateurs d'une épizootie.

Tableau 1: espèces affectées par le virus VFVR et leur sensibilité (d'après Swanepoel et Coetzer, 1994).

Létalité > 70 %	Létalité élevée 10-70 %	Maladie grave mais rarement mortelle	Elaboration d'Anticorps	Réfractaires
Agneaux	Ovins	Humains		Oiseaux
Chevreaux	Veaux	Bovins	Chevaux	Reptiles
Chiots	Certains rongeurs	Caprins	Chats	Amphibiens
Chatons		Buffles africains	Chiens	Amphibiens
Souris		Buffles asiatiques	Porcs	
Rats (certaines lignées)		Singes	Anes Lapins	

Les formes inapparentes, qui se traduisent seulement par une séroconversion, sont très fréquentes, notamment dans les zones d'endémie. Des animaux sauvages, comme l'hippopotame ou certaines espèces de singes, peuvent développer une forme subclinique ou inapparente (Meegan et Bailey, 1989). Des sérologies positives ont été retrouvées chez des éléphants, des rhinocéros blancs et noirs, des buffles et des cobes (Lefèvre, 2003).

Les formes subaiguës prédominent chez les adultes. Elles se traduisent par des avortements dans les troupeaux (avec des taux atteignant 90-100%), deux semaines après l'infection, une hyperthermie, une diminution de la production de lait (Balkhy et Memish, 2003). Des avortements ont été aussi rapportés chez les buffles (Meegan et Bailey, 1989).

Les formes aiguës atteignent les jeunes de plus de 3 semaines et les adultes (très rarement les chèvres qui développent le plus souvent une forme subaiguë). Les principaux symptômes observés sont l'hyperthermie et des avortements. Sur certains animaux, on peut aussi observer un jetage mucopurulent, une diarrhée hémorragique, de l'anorexie, de l'asthénie, et parfois un ictère, quand la maladie évolue sur une ou deux semaines. Le taux de létalité est de 20 à 30% (parfois jusqu'à 60% [Abd-El-Rahim et *al.*, 1999]) chez les ovins adultes. Il dépasse rarement les 10% chez les bovins. Il y a des séquelles d'infécondité après guérison.

Les formes suraiguës sont rencontrées chez les nouveau-nés et les jeunes de moins de 3 semaines. Après une incubation très courte (12 à 72 heures), l'évolution de la maladie est le

plus souvent mortelle (Taux de létalité : 90% chez les agneaux et les chevreaux, 10 à 70% chez les veaux). Les symptômes observés sont peu évocateurs : très forte hyperthermie (41-42° C), inappétence, très grande faiblesse, suivi d'un coma puis la mort de l'animal en 12 à 36 heures. Certains animaux présentent de l'ictère, une diarrhée hémorragique, de l'hématurie et du jetage.

Figure 2 : photo des avortons causés par le virus

I.3.3 Le diagnostic du VFVR

On peut poser le diagnostic de la FVR aiguë à l'aide de plusieurs méthodes. Les tests sérologiques, comme le dosage immuno-enzymatique (méthodes "ELISA" ou "EIA") peuvent mettre en évidence la présence d'IgM spécifiques pour le virus. En effet, les protéines G1 et G2 induisent la production d'Ac neutralisant protecteurs (IgM et IgG), la protéine N la formation d'Ac fixant le complément (IgM uniquement). Les IgM sont détectables à partir du troisième ou quatrième jour suivant l'infection (Lefèvre, 2003). A Madagascar, seulement 27% des bovins présentent des IgM deux mois après une infection naturelle par le virus de la FVR (Morvan et *al.*, 1992[a]). Les IgG apparaissent plus tardivement mais peuvent persister au moins quatre à cinq ans chez les ovins et les bovins, et vraisemblablement toute la vie de

l'animal (Lefèvre, 2003). On peut détecter le virus dans le sang au début de la maladie ou dans les tissus prélevés postmortem à l'aide de diverses techniques d'isolement viral (cultures de cellules ou inoculation d'animaux) ou de détection des antigènes par RT-PCR.

I.3.4 Traitement et Prévention

A ce jour, il n'y a pas de traitement spécifique de la FVR même s'il a été montré que de faibles doses d'interféron entre le début de l'exposition et l'apparition des symptômes cliniques pouvait prévenir la fièvre hémorragique et que la ribavirine est efficace chez les singes et les souris en entraînant la diminution de la virémie. Seul un traitement symptomatique est administré.

La prévention et le contrôle des épidémies repose sur la lutte anti-vectorielle et la vaccination des troupeaux et des personnes à risque (vétérinaires, personnel de l'abattoir…). Cependant, le vaccin disponible pour l'homme est cher à produire et nécessite plusieurs rappels ; raison pour laquelle il n'est pas commercialisé. Ainsi, son utilisation est limitée à la protection des personnels à risque (personnels de laboratoire manipulant le virus, troupes militaires déployées en zone d'endémie…). Deux vaccins vivants atténués, les souches MP12 et SNS (Smithburn Neurotropic Strain) sont disponibles (Smithburn, 1949 ; Baskerville et *al.,* 1992 ; Morill et *al.,* 1991 ; Morill et *al.,* 1997a ; Morill et *al.,* 1997b) pour les animaux. Cependant, même s'ils se sont montrés efficaces, ils présentent l'inconvénient d'entraîner des avortements et ont des effets tératogènes chez les femelles gestantes (Hunter et *al.,* 2002).

D'autres vaccins vivants atténués (clone 13, R566) ainsi que des vaccins recombinants (Muller et *al.,* 1995 ; Wallace et *al.,* 2006 ; Sunitet Daniel, 2013) sont à l'essai.

I.3.5 Vecteurs et Cycle de transmission

La transmission se fait par contamination directe (aérosol, contact directe de liquide ou de tissus d'animaux infectés etc…) ou par un arthropode vecteur.

De nombreuses espèces de moustiques sont des vecteurs efficaces de VFVR, notamment les espèces des genres *Culex, Aedes, Anopheles, Eretmapodites* et *Mansonia*. Il a été démontré que plus de 40 espèces de moustiques sont compétentes pour transmettre le VFVR La transmission mécaniquement par d'autres insectes a aussi été suspectée. Les moustiques s'infectent en prenant leur repas sanguin sur des hôtes virémiques. Les animaux sont contagieux pendant leur période virémique, qui peut être brève (6 à 18 heures) ou persister jusqu'à six à huit jours. La contamination directe n'est pas significative chez les animaux.

On estime que chez l'homme, l'infection peut se faire par piqûres de moustique mais on pense que la majorité des cas humains résulte de la manipulation de sang, de tissus, de sécrétions ou d'excrétions d'animaux infectés, notamment après un avortement. En revanche la transmission vectorielle semble être le mode privilégié d'infection des animaux chez lesquels la contamination directe n'est pas significative. Le genre *Aedes* est souvent considéré comme vecteurs enzootiques dans le cycle de transmission du VFVR. Ses capacité à transmettre le virus à ses descendant (transmission verticale) permet le maintien du virus dans la nature au cours des saisons sèches. Ces espèces enzootiques seraient à l'origine des épizooties alors que d'autres espèces, certainement du genre *Culex*, joueraient le rôle d'amplificateur de l'épizootie voire de l'épidémie (Zeller et *al.*, 1997) (**Figure 3**).

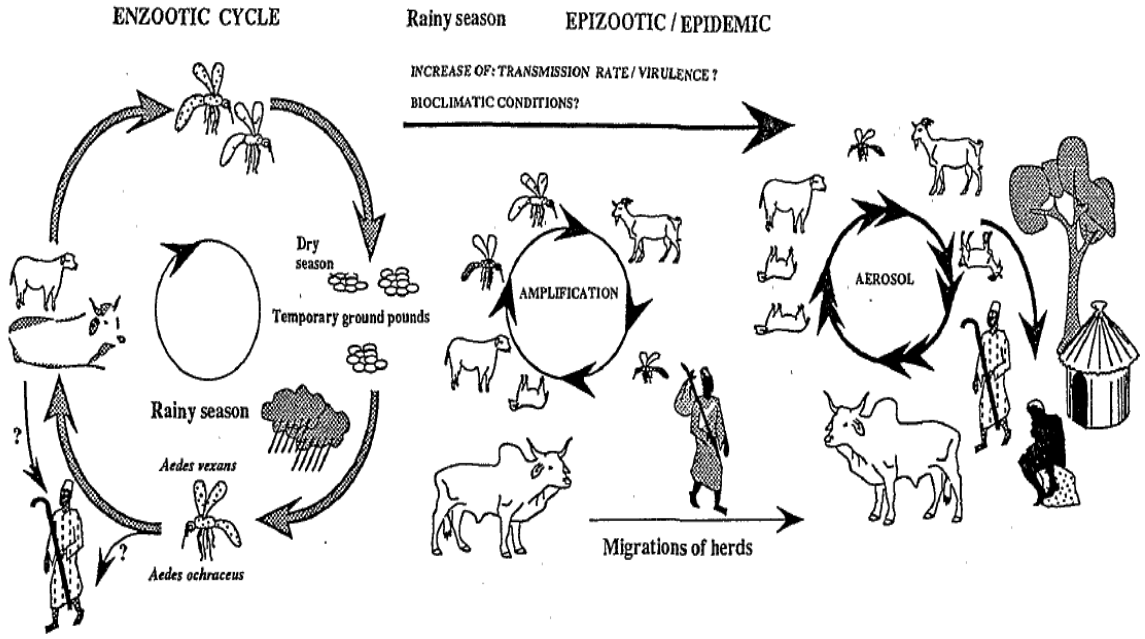

Figure 3 : Cycle possible de la Fièvre de la Vallée du Rift en Afrique occidentale sahélienne avec un maintien enzootique du virus autour des mares temporaires impliquant *Aedes vexans* et *Aedes ochraceus* / vecteurs principale et des amplifications épizootie / épidémie impliquant différentes espèces de moustiques, les mouvements d'animaux, et la transmission directe (aérosol, contact avec des produits d'avortement).

Le maintien interépizootique existe par transmission verticale du virus par les œufs d'*Aedes spp* qui se reproduisent dans les zones inondées et dont les œufs peuvent rester en dormance dans les plaines d'inondation ou dans un habitat de prairie pendant de longues périodes.

Les principales espèces de moustiques vectrices en Afrique de l'Est appartiennent au genre *Culex* et *Aedes*. EIles utilisent des mares temporaires comme gîtes larvaires, remplies par débordement des rivières à l'occasion de fortes pluies. Ces deux genres possèdent donc des modalités de développement très différentes, en relation avec leurs caractéristiques biologiques. En effet, l'évolution et la dynamique des populations d'*Aedes* reposent sur des variations du milieu aquatique, tandis que celles des *Culex* sur sa stabilité. Le régime des pluies et le type de couvert d'eau auront donc des conséquences importantes sur l'abondance et la proportion relative de ces deux espèces tout au long de la saison de transmission. *Cx pipiens, Ae. cumminsii, Ae. circumluteolus* et *Ae. mcintoshi* ont été les principaux vecteurs identifiés.

En Afrique de l'Ouest, le virus FVR a été isolé de plusieurs espèces de moustiques notamment d'Ae. *vexans, Ae. ochraceus, Ae. dalzieli, Culex poicilipes, Ma. africana* et *Ma. uniformis, Ae. cumminsii, Ae. furcifer, Ae. fowleri.*

Au Sénégal, Ae. *vexans* et *Culex poicilipes* sont considérés comme les principaux candidats à la transmission à la lumière de leur abondance, leur affinité trophique avec le bétail et l'homme et leur écologie. Néanmoins leur rôle épidémiologique est à confirmer puisque leur compétence vectorielle n'est pas encore déterminée. A Barkédji, site sentinelle de surveillance du virus, ces deux espèces dominent la faune culicidienne. A Barkédji, 228 000 moustiques répartis en 52 espèces furent capturés de 1993 à 1998. Le genre *Aedes* représentait 29% des captures : *Aedes vexans* était le plus abondant, suivi par *Ae. ochraceus*, alors *qu'Aedes mcintoshi* et *Aedes dalzieli* étaient très rares. A Kédougou, le genre *Aedes* représentait 50% des captures. *Ae. dalzieli* était prédominant alors qu'*Ae. vexans*, *Ae. mcintoshi* et *Ae. ochraceus* étaient beaucoup moins abondants. A Barkédji, dix isolements du virus FVR concernaient *Aedes vexans* et trois *Aedes ochraceus*. A Kédougou, aucun virus ne fut isolé pendant la période d'étude, mais il le fut à plusieurs reprises à partir d'*Aedes dalzieli* en 1974 et 1982 (Fontenille et *al.*, 1998). *Aedes vexans, Ae. ochraceus*, et *Ae. dalzieli,* l'abondance de ces vecteurs, leur tropisme pour l'homme et les grands mammifères (bovins, équins, ovins), ainsi que les isolements viraux réalisés tendent à montrer qu'ils constituent des vecteurs de la FVR au Sénégal : *Aedes dalzieli* pour le Sénégal oriental (zone de Kédougou), et *Aedes vexans* (*Ae. ochraceus* dans une moindre mesure) pour le centre du Sénégal (Ferlo).

Suite à la réémergence de la FVR en Mauritanie en 1998, de nouvelles enquêtes entomologiques furent réalisées dans la zone de l'Hodh El Gharbi, dans les localités où des cas confirmés avaient été signalés, ainsi que le long du fleuve Sénégal pour mesurer le risque

d’extension de la maladie au Sénégal (Thillé Boubacar, Kanel, Dembankané et Diawara). 31 944 moustiques, appartenant à 20 espèces et 6 genres, ont été capturés.

Les genres *Culex* et *Mansonia* furent les plus représentés. Les *Culex* constituaient 50% des prélèvements à eux seuls, et les Mansonia 45%. *Culex poicilipes* et *Mansonia uniformis* ont été les espèces les plus abondantes avec respectivement 47 % et 45% des moustiques capturés. En raison de la période de l'année, les Aedes étaient représentés seulement par deux spécimens d’*Aedes vexans* et *Ae. sudanensis*. Au total, 36 souches du virus RVF furent isolées, toutes à partir de Culex poicilipes sur le site de Diawara (Diallo et *al.,* 2000). L’abondance de *Culex poicilipes*, les nombreux isolats de virus réalisés sur cette espèce et sa compétence vectorielle démontrée expérimentalement (Jupp et *al.*, 1988) sont autant de facteurs suggérant l'implication de l'espèce *Culex poicilipes* dans la transmission du virus RVF. Ainsi le rôle principal de vecteur de FVR au Sénégal est attribué à *Aedes dalzieli* pour le Sénégal oriental, *Aedes vexans* (et *Aedes ochraceus* dans une moindre mesure) et *Culex poicilipes* pour le centre du Sénégal (le Ferlo). *Aedes vexans, Aedes ochraceus* et *Culex poicilipes* sont incriminés dans un cycle domestique, faisant essentiellement intervenir des ruminants domestiques (ovins et bovins), tandis qu’*Aedes dalzieli* serait plutôt impliqué dans un cycle selvatique pour lequel on ne dispose que de peu de données actuellement.

PARTIE 2

Compétence vectorielle des moustiques du Sénégal avec différentes souches et lignées naturelles et vaccinale du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift

II.1. Introduction

Au Sénégal, le virus de la FVR a été isolé pour la première fois en 1974 à partir de moustiques *Ae. dalzieli* capturé à Kédougou au cours d'un programme de surveillance de la fièvre jaune. Suite à la première vaste épidémie de FVR enregistrée jusqu'ici en Mauritanie en 1987, une surveillance active mise en place a conduit à la détection de plusieurs cas d'animaux mais aussi l'isolement du virus à partir de plusieurs espèces de moustiques dont *Ae. vexans, Ae. ochraceus, Cx. poicilipes, Ae. fowleri, Ma. africana* (Fontenille et *al*, 1995 ; Diallo et *al.*, 2000 ; Ba et *al.*, 2012). Ces isolats et les données de séro-épidémiologie recueillies ont permis l'établissement d'un cycle de transmission inspiré de celui de l'Afrique de l'Est (Zeller et *al.*, 1997). Cependant, ce cycle est encore probable puisque certains paramètres entomologiques comme la compétence vectorielle des moustiques localement trouvés associés au virus n'ont pas été prouvés. En effet, pour qu'une espèce de moustique puisse être classée comme vecteur d'arbovirus, il faut que les critères qui suivent soient vérifiés : 1) que le virus soit isolé de l'espèce de moustique récolté dans la nature (ce qui a été le cas pour les espèces susmentionnées), 2) qu'il y ait une association trophique entre le moustique et les vertébrés hôtes du virus, 3) que la capacité de l'espèce culicidienne à s'infecter, à multiplier et à transmettre le virus soit démontrée, 4) que le moustique ait une longévité qui couvre la période d'incubation du virus. En outre, bien que la surveillance

entomologique ait donné des informations importantes sur la circulation du virus et de l'écologie des vecteurs, cette approche n'a pas permis de déterminer l'impact de l'amplification du VFVR sur les populations humaines. Les cas humains sont rares au Sénégal (Thonnon et *al.*, 1999). Les données générées lors de l'étude transversale ou à la suite d'une épizootie, ont révélé une faible séroprévalence IgG dans les populations humaines, allant de 14,02 à 22,3% en 1989 à Yonoféré (Wilson et *al.*, 1994) et de 6,12% à Barkedji en 1993 (Rapport IPD). La séroprévalence enregistrée était de 5 à 26% chez les enfants nés après l'épidémie de 1987 et 25,3% parmi les adultes (Thonnon et *al.*, 1999 ; Zeller et *al.*, 1997). Une faible séroprévalence des IgG contre la FVR a été également enregistré au nord du Sénégal à Diawara pendant une enquête épidémique (5,2%) ainsi que dans le sud (≤3.1%) à Kédougou, Tambacounda et la Casamance (Saluzzo et *al.*, 1987 ; Zeller, 1992 ; Monlun et *al.*, 1993). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la discordance entre l'animal et l'infection humaine, y compris l'efficacité de la transmission vectorielle.

Les seules données disponibles sur la compétence vectorielle des moustiques trouvés associés au virus FVR au Sénégal, notamment *Cx. poicilipes* et *Ae. vexans*, ont été obtenues d'études réalisées sur des populations Sud-africaines (Jupp et *al.*, 1984), et d'Amérique du Nord (Turell et *al.*, 2008). Aucune étude expérimentale n'a encore été faite sur les populations vectrices suspectées au Sénégal.

C'est dans ce contexte que nous avons étudié la compétence vectorielle d'*Ae. vexans* et *Cx. poicilipes*, les deux espèces de moustiques les plus abondants dans la zone de Barkedji et les plus fréquemment associé au VFVR au Sénégal ainsi *Cx. quinquefasciatus* la principale espèce domestique importante pour différentes souches et lignées du virus.

Comme pour toutes les maladies, l'importance de disposer d'un vaccin contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift à usage vétérinaire et/ou médical sans effet secondaire pour un contrôle efficace n'est plus à démontrer. Le seul vaccin efficace disponible pour l'homme contre le virus FVR est actuellement de production restreinte et est limité au personnel à risque travaillant dans les laboratoires. De même, plusieurs types de vaccins à usage vétérinaire ont été mis au point et les plus connus sont la Smithburn (Smithburn, 1949), la MP 12 (Caplen et *al.* en 1985 ; Baskercille et *al.*, 1992), la clone 13 (Muller et *al.*, 1995) et plus récemment la souche R566 (Bouloy et *al.*, unpublished data) de l'Institut Pasteur.

La MP-12 tout comme la Smithburn est un vaccin vivant atténué. La Smithburn a conservé un niveau élevé de neurotropisme et provoque des effets secondaires (avortements et malformations) (Kamal, 2009). La MP-12 a été obtenue à partir d'une souche égyptienne

virulente ZH548 par passages successifs dans des cellules humaines en présence d'un agent mutagène, n'est pas complètement avirulente et provoque des encéphalites chez les hamsters (Rossi et *al.* 1988).

Malgré des tests de stabilité réussis avec différents vertébrés la question de leur passage chez les moustiques à la suite d'une vaccination de troupeaux demeure une préoccupation majeure. Au delà d'une vaccination naturelle par les moustiques suite à leur infection qui pourrait être considéré, le devenir après passage chez le moustique de la souche vaccinale est inquiétante au regards des réassortiments possibles avec les souches naturelles (Turell et *al.*, 1991 ; Sall et *al.*, 1999) mais également d'un simple retour à la virulence d'un virus qui avait perdu cette faculté.

C'est dans ce contexte qu'au cour de l'étude sur la compétence vectorielle, nous avons testé la capacité d'un vecteur majeur de la FVR du Sénégal à s'infecter multiplier et transmettre la souche vaccinale MP-12.

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Sélection des souches de virus

Quatre souches de virus (**Tableau 2**) ont été utilisées pour les infections expérimentales : i) une souche humaine **SH172805** (souche humaine) provenant du sérum d'un homme malade de la Mauritanie en 2003. Elle a subi 3 passages sur cellules Vero : ii) une souche **ArD141967** (souche d'arthropode) isolée en 2000 à partir de *Cx. poicilipes* en Mauritanie et qui a subi 4 passages sur cellules Vero ; iii) une souche **AnD133719** (souche animale) isolée à partir du sérum de caprin en 1998 en Mauritanie et a subi 7 passages sur cellules Vero ; iv) une souche vaccinale la **MP_12.**

La MP-12, a été générée par le passage en série de la souche virulente de VFVR ZH548 en présence de mutagène chimique, le 5-fluorouracile (Caplen *et al.*, 1985). MP-12 code pour un total de 23 mutations (9 substitutions d'acides aminés) (Lokugamage et *al.*, 2012) et est fortement atténuée chez les animaux. Lorsque des virus, créés par réassortiment entre une souche de VFVR virulent et MP-12, ont été analysés, il a été constaté que des mutations dans les segments M et L ont principalement contribué à l'atténuation de MP-12 (Billecocq et *al.*, 2008; Saluzzo et Smith, 1990). La vaccination de MP-12 chez les souris et les ruminants a démontré que le MP-12 est sécuritaire et induit des titres élevés d'anticorps neutralisant le virus (Bird et *al.*, 2009). Due à la faible virulence de MP-12, il est actuellement la seule souche VFVR qui peut être utilisée dans un laboratoire BSL-2, tandis que VFVR et d'autres

mutants de RVFV doivent être manipulés au niveau des laboratoires améliorés BSL-4 ou BSL-3.

Les stocks de virus ont été produits par inoculation intra cérébrale de souriceaux nouveaux nés âgés d'un à deux jours de 20µl de la suspension virale. Les souriceaux sont ensuite mis en observation. Les cerveaux de ceux présentant des signes de maladies ou de paralysies sont récupérés et broyés dans du milieu L-15 (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) contenant de la pénicilline, streptomycine (Sigma, GmBh, Germany) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) puis centrifugés à 10000 tr/mn à 4°C pendant 5mn. Après centrifugation, la suspension est récupérée puis constituée en aliquot de 5ml concervés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Le titrage consiste à quantifier les particules virales infectieuses contenues dans les surnageants. Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-11} de la suspension virale sont réalisées dans du milieu de survie L15 à 5% de SVF. Une plaque de 24 cupules (Nunc™) est utilisée pour la manipulation (**Figure 4**). Dans chaque cupule, il est déposé 200 µl de L15 à 5% de SVF, 200 µl de la dilution de virus et 200 µl d'une suspension de cellules PS à 1,2 10^6 cellules /ml**.** La plaque est ensuite scellée avec du scotch et incubée à +37°C pendant 4 heures pour permettre une pénétration des virus dans les cellules PS (cellules de rein de Porc). Après cette incubation, 400 µl de de milieu CMC (Carboxymethyl cellulose) mélangé avec le milieu de culture dans chaque puits l'ensemble est ensuite incubé à 37°C pendant 3-4 jours. On procède en suite à la lecture.

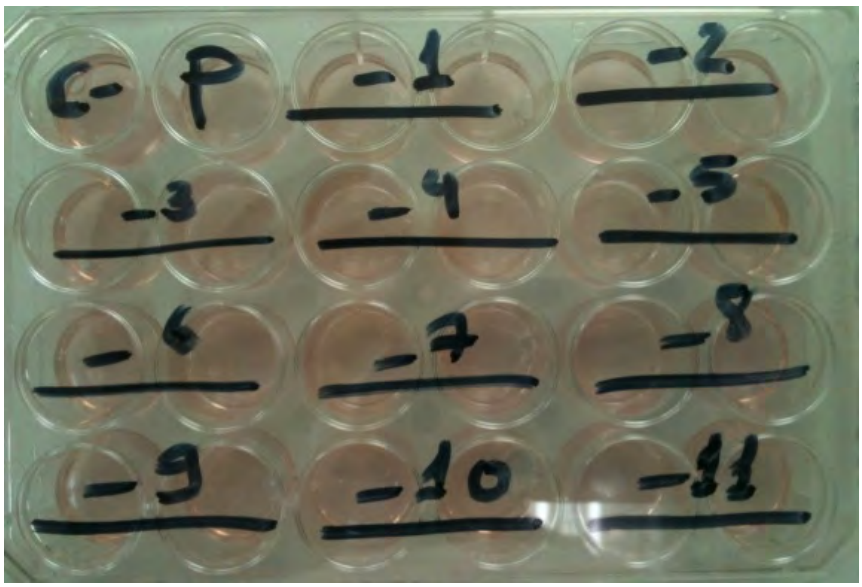

Figure 4 : Schéma d'une Plaque de 24 puits pour le titrage. Le C- représente le contrôle négatif, le P représente le contrôle positif et les chiffres de -1 à -11 représentent les dilutions des stocks viraux de 10^{-1} à 10^{-11}.

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes souches de virus utilisées

Souches de virus	Hôtes d'origine	Origine	Date isolement	Nombre Passage	Lignées
SHM172805	Human	Mauritania	2003	3	Est/Centre Africaine
ArD 141967	*Cx. poicilipes*	Mauritania	2000	4	Ouest Africaine
AnD133719	Goat	Mauritania	1998	7	Ouest Africaine

II.2.2 Choix des espèces et élevage

Ae. vexans et *Cx. quinquefasciatus* ont été sélectionnés en raison de leur répartition géographique étendue et implication potentielle dans le cycle de transmission de la FVR au Sénégal et les pays voisins (Zeller et *al.* 1997 ; Diallo et *al.* 2000). *Ae. vexans* est parmi les moustiques régulièrement trouvés infectés par le virus FVR en Afrique de l'Ouest (Fontenille et *al.* 1998 ; Diallo et *al.*, 1995 ; Ba et *al.*, 2012). Elle est cosmopolite et est considérée parmi les espèces nuisibles dans certains pays européens et en Amérique. Cette large diffusion est une préoccupation majeure, en raison du potentiel pour VFVR d'envahir de nouvelles zones géographiques, comme on le voit lors de l'épidémie / épizootie en Arabie Saoudite (Jupp et *al.*, 2002, Miller et *al.*, 2002). En Afrique de l'Ouest, l'abondance et la biologie d'*Ae. vexans* y compris son interaction étroite avec les principaux hôtes vertébrés soulignent le rôle important que cette espèce pourrait jouer dans la transmission de la FVR.

Cx. quinquefasciatus a été sélectionné parce qu'elle est l'équivalent de *Cx. pipiens pipiens* impliqués dans la transmission de la FVR pendant l'épidémie de 1977 en Egypte et dans la péninsule arabique (Meegan *et al.*, 1980 ; Miller *et al.*, 2002) et avec lequel il partage le complexe pipiens. *Cx. quinquefasciatus* est présent dans toutes les régions tropicales. Il est très inféodé à l'environnement domestique où il est présent tout au long de l'année en raison de son association avec des sites de reproduction artificiels (eaux polluées ou usées, fosses septiques…). Elle est abondante, anthropophage et a été prouvée compétente dans certains contextes géographiques (McIntosh et *al.* 1980, Turell et Kay 1998, et Turell et *al.*, 2007 ; Turell et *al.*, 2008 ; Turell et *al.*, 2010). Ces caractéristiques en font un bon candidat pour la transmission de la FVR en milieu urbain.

Cx. poicilipes a été choisi parce qu'il est considéré avec *Ae. vexans* comme l'un des principaux vecteurs de la FVR au regard des isolements répétés du virus, de sa bio-écologie et son abondance. L'espèce a été trouvée infectée au Sénégal et en Mauritanie (Diallo et *al.*, 2000 ; Diallo et *al.*, 2005). Des études antérieures ont révélé sur une base régulière (Diallo et *al.*, 2011 ; Traore-Lamizana et *al.*, 2001), que *Cx. poicilipes* domine en alternance avec *Ae. vexans* la faune culicidienne de Barkedji suivant les années. Son affinité trophique avec l'homme et les ruminants domestiques est également un argument en faveur de sa capacité vectorielle pour la FVR (Ba et *al.*, 2006).

Toutes les colonies utilisées dans cette étude ont été établies à partir d'échantillons d'adultes (d'*Aedes vexans* et de *Culex poicilipes*) capturés et de larves (de *Culex quinquefasciatus*) récoltées à Barkedji (15 ° 17 'N et 14 ° 53'O).

II.2.3 Capture et Elevage des moustiques

Pour la mise en place d'une colonie de vecteurs, nous avons utilisé le piège avec appât animal et nous avons utilisé le mouton et la chèvre comme appât (**Figure 5**). Ce type de piège est bien connu pour ses bonnes performances dans la collecte de ces vecteurs. L'animal appât (mouton, chèvre et poule) est placé dans une cage en grille métallique recouverte d'un tulle moustiquaire qui s'arrête à 10-20 centimètres au-dessus du sol. Au-dessus de la cage grillagée se trouve une cage en forme de nasse en tulle moustiquaire sur laquelle est placée une lampe allumée.

Figure 5 : Photo d'un piège avec appât animal (mouton)

Les moustiques pénètrent par le bas du piège et leur tendance à remonter les pousse dans la nasse, ce qui les empêche de sortir. Ces pièges ont été placés au niveau de la mare de Niakha et ont fonctionné de 19h à 07h.

Les moustiques adultes ont été mis en cages sur le terrain et admis à se nourrir de jus sucré jusqu'à leur acheminement à l'insectarium. Quant aux stades immatures, ils ont été mis dans des pots à selle sur le terrain et ensuite emmenés à l'insectarium jusqu'à l'émergence de stade adulte. L'élevage a été fait dans des conditions proches du microenvironnement naturel plus précisément d'origine des moustiques c'est à dire une température de 27±1°C, une humidité de 80% et une photo- périodicité de 12 heures de nuit et 12 heures de jours. Les moustiques ont été constamment nourris avec du jus sucré et pour l'obtention des pontes, ils ont été gorgés sur des cobayes. Après chaque repas, des pondoirs- pièges constitués de boites de Pétri contenant du coton imbibé d'eau, sont placées à l'intérieur des cages pour la collecte des œufs. Les œufs obtenus sont ensuite mis en eau. Leur éclosion est observée au bout de 24 à 48h. Les nymphes, obtenues au bout 36h à partir des larves (**Figure 6**) qui ont été nourri uniquement avec du Tetra Baby Fish Food L®, sont récupérées à l'aide d'une pipette et mise

dans un bocal à l'intérieur d'une cage en tulle moustiquaire d'où émergeront les moustiques adultes de la génération F1. Ces adultes émergeants sont nourris avec une solution de sucre à 10% jusqu'à utilisation.

Figure 6 : photo d'un bac d'élevage de moustiques contenant différents stades larvaires

II.2.4 Procédures d'infection des moustiques.

Toutes les expériences d'infection ont été réalisées dans un insectarium de niveau de sécurité type 3 (P3) de l'unité d'entomologie médicale de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). Les moustiques femelles ont été infectées artificiellement (pour mieux maîtriser les conditions de l'infection et la composition du repas de sang en terme de titre viral) par voie orale avec un repas de sang contenant du virus.

Le manque d'animal vertébré de laboratoire sensible aux infections (développant une virémie suffisante…), les dispositions éthiques et sécuritaires très contraignantes réglementent l'expérimentation animale et humaine, ajoutées aux vastes mouvements écologistes militant pour la protection des animaux de laboratoire, ont poussé au développement de techniques alternatives de repas artificiels. Parmi les nombreuses technologies existantes, nous avons utilisé le système de repas artificiels sur membrane décrit par Rutledge et *al.,* (1964). Ce

système est constitué d'un gorgeur en verre à double paroi à travers lequel circule un courant d'eau régulé à 37°C (température normale du sang dans l'organisme) à partir d'un bain- marie (**Figure 7a** et **Figure 7b**). Le gorgeur est recouvert dans sa partie inférieure d'une membrane à travers laquelle le moustique peut piquer et aspirer le sang mis à son contact. Le parafilm, la membrane de baudruche ou différents types de peau (poussin, souris…) peuvent servir de membrane.

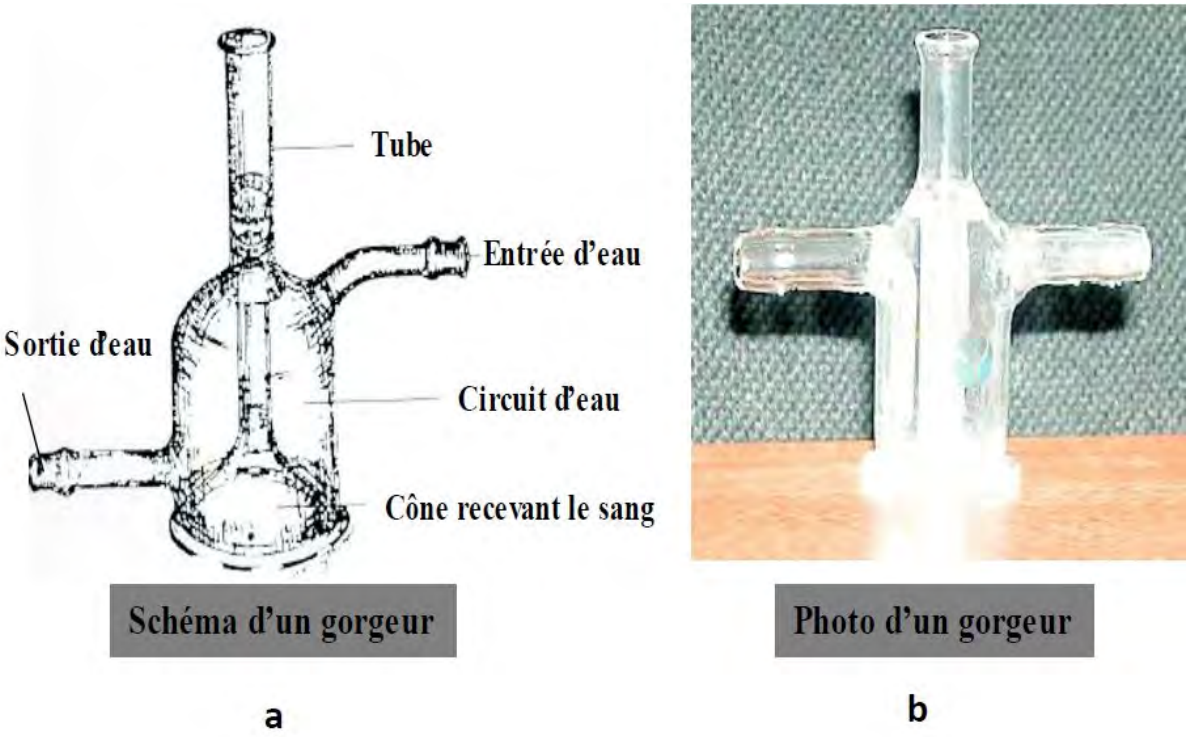

Figure 7 : Schéma (a) et photo (b) d'un gorgeur

Figure 8 : photo de la préparation des gorgeurs

Seules les femelles âgées de 3 à 4 jours et nourrie uniquement de jus sucré, ont été utilisées pour les infections orales. Elles ont été récupérées individuellement à l'aide d'un aspirateur de leur cage d'élevage et transférées dans des pots d'élevage cylindrique en carton de dimension (22,5 cm de long et un diamètre de 10,5 cm). Au total 30 à 35 femelles ont été mises dans chaque pot. Ces derniers sont au préalable couverts à leur extrémité supérieure par un morceau de tulle moustiquaire. Une fois transférées, les femelles sont affamées par privation de jus sucré pendant 48 heures avant d'être infectées. Seul un coton imbibé d'eau leur a été présenté pour maintenir l'humidité afin d'éviter les conditions d'extrême soif ou de déshydrations qui peuvent les affaiblir et impacter négativement sur leur taux de gorgement

II.2.4.1. Prélèvement et lavage du sang pour l'infection

Pour éviter de possibles interactions entre d'éventuels anticorps pouvant se retrouver dans le sérum et le virus à utiliser, seules les hématies des animaux prélevés sont utilisées.

Le prélèvement de sang est fait au plus 24h avant le repas infectant dans un tube à hémolyse contenant de l'héparine à 2%. Nous avons dans notre étude utilisé dans un premier temps du sang de lapin (**Figure 9**). Devant des taux de gorgement faibles, nous l'avons substitué par du sang de mouton. Le prélèvement du lapin a été effectué au niveau d'une veine

de l'oreille après injection d'un mélange de 0,4 ml de Kétamine appelé par ailleurs Imalgen (anesthésiant permettant d'endormir l'animal) et de 0,6 ml de Calmivet (vasodilatateur). Concernant le mouton le prélèvement a été réalisé directement au niveau la veine jugulaire sans anesthésie ni vasodilatation. Le sang est ensuite centrifugé à 1200 tours/mn pendant 5mn à 4°C. Après centrifugation, le sérum est ensuite prélevé puis jeté. Les hématies restant sont alors lavées après avoir été mélangées avec du PBS 1X puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Cette opération de lavage est répétée 3fois. Après lavage les hématies sont conservées à +4°C.

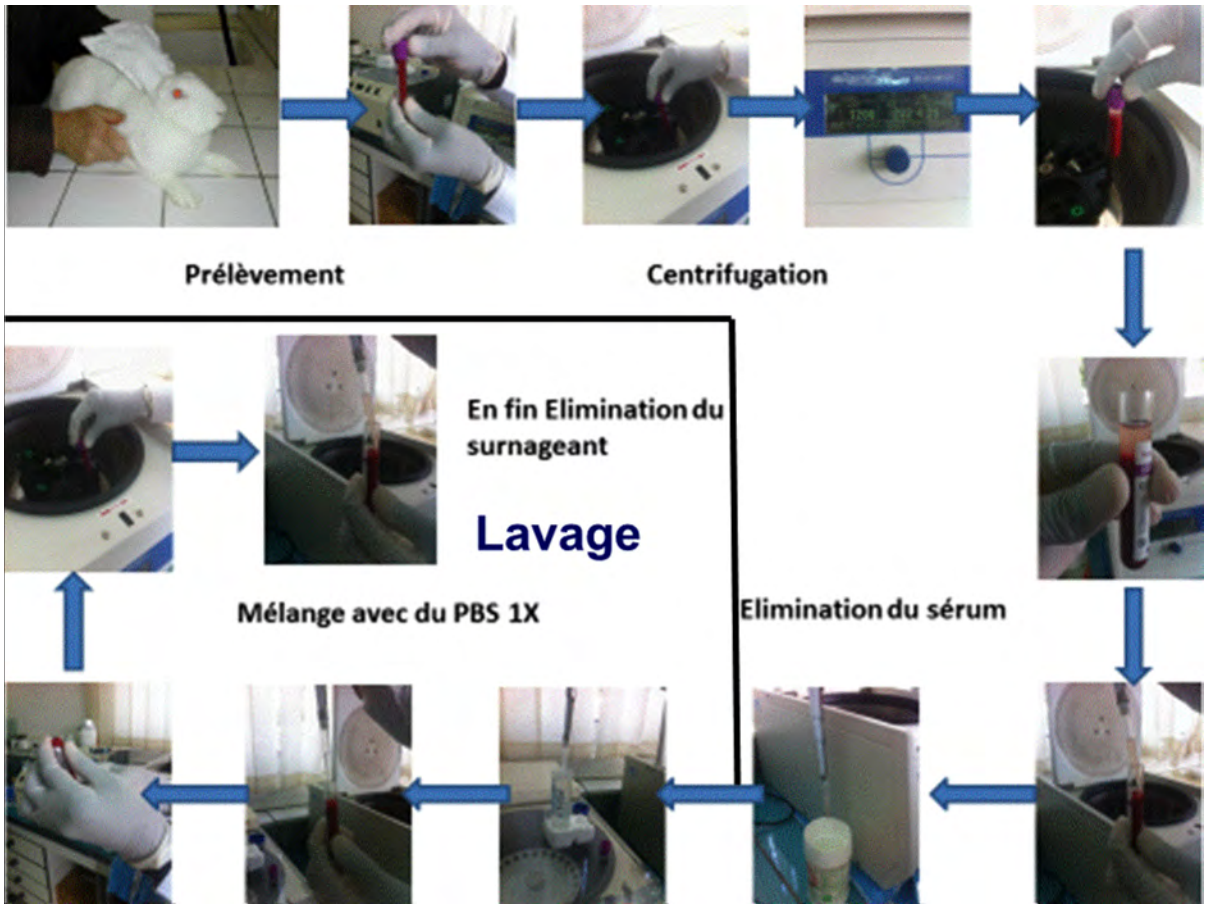

Figure 9 : Prélèvement et lavage de sang (Cette étape est répétée 3 fois)

II.2.4.2. Préparation du repas mixte (sang virémique)

Elle s'effectue à l'intérieur d'une salle de sécurité de niveau 3 et sous un poste de sécurité microbiologique de niveau 2 à flux laminaire vertical.

Le repas artificiel ou mixte est constitué d'un 1/3 d'hématies lavées au PBS 1X, 1/3 de la suspension virale et 1/3 de d'un mélange de sérum de veau fœtal, d'ATP à 0.005M et d'une solution de sucre à 10% (**Figure 10**).

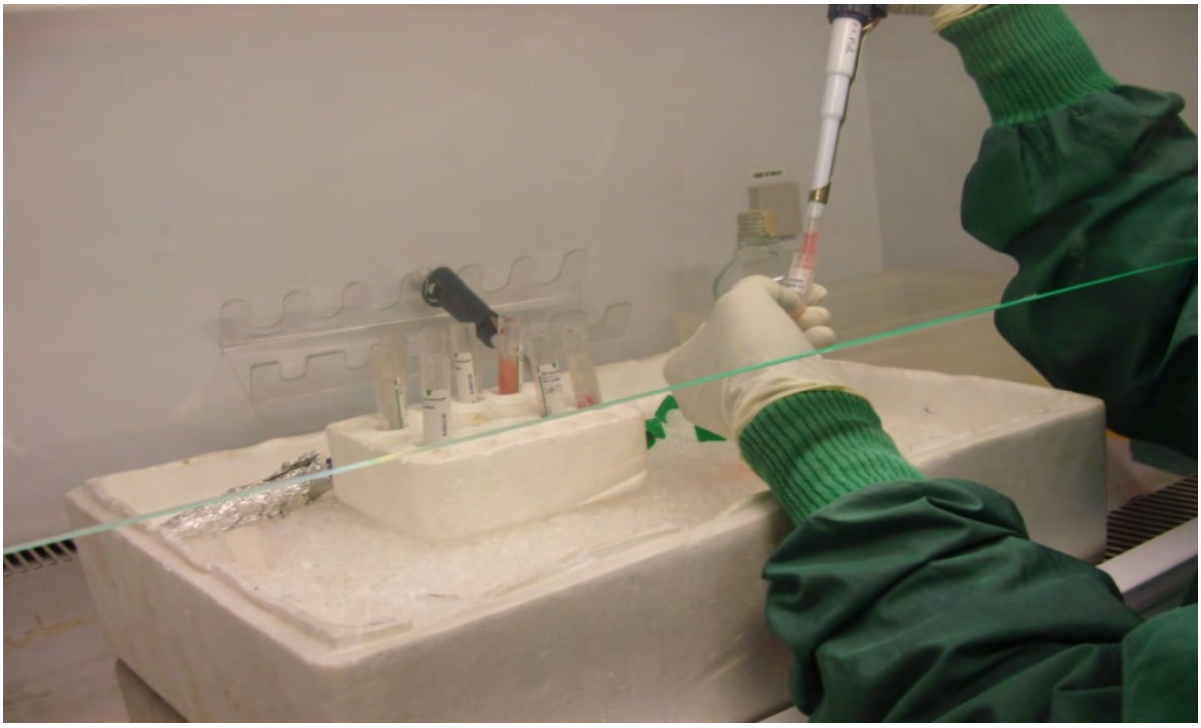

Figure 10 : Photo d'une préparation du repas mixte (sang virémique) sous une hotte.

II.2.4.3. Exposition des moustiques au repas et leur traitement à la fin du repas

Une fois constitué, le repas de sang est transféré dans les gorgeurs (**Figure 11**) et les moustiques affamés depuis 48 heures admis à se gorger (**Figure 12**).

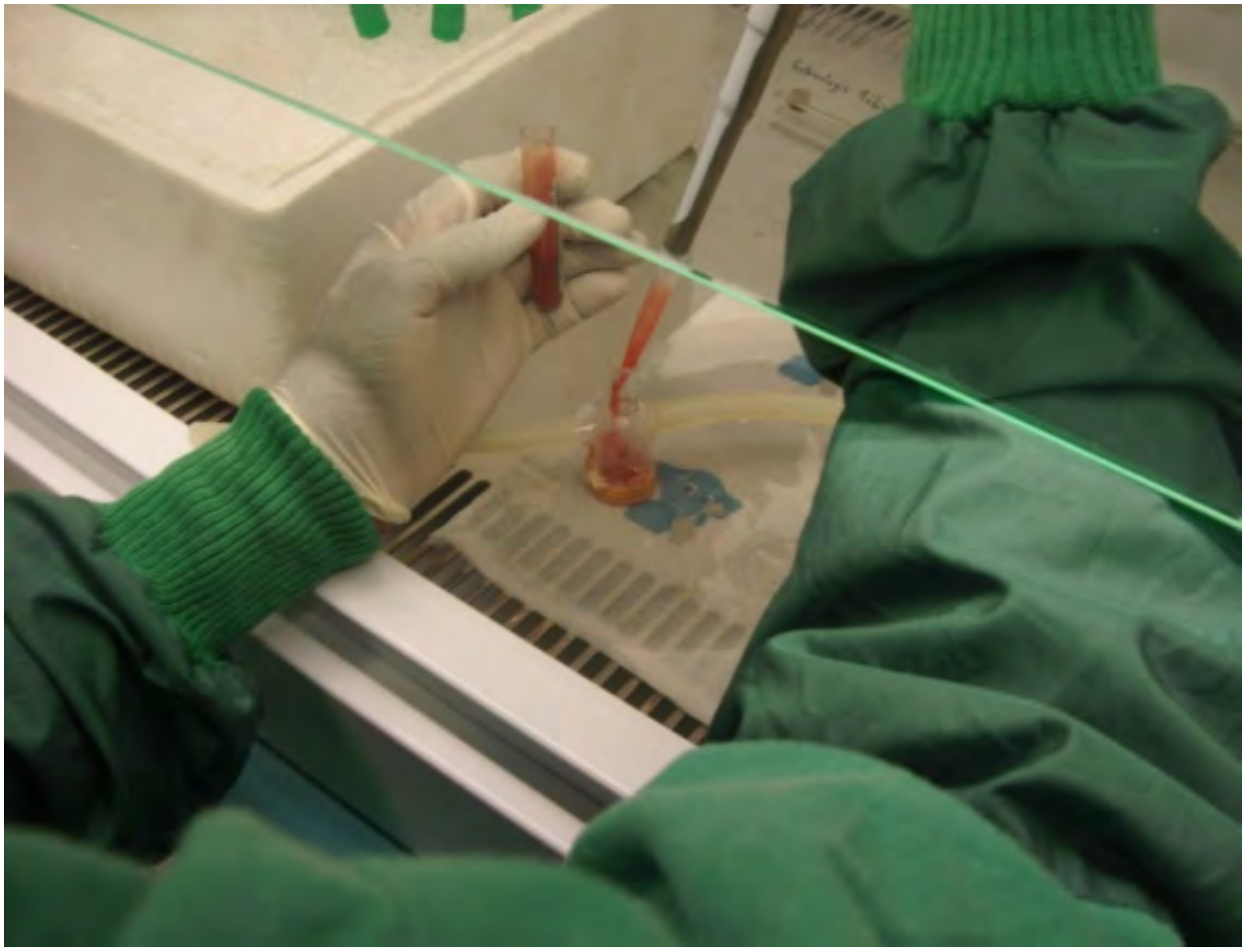

Figure 11: Photo montrant la distribution du sang virémique dans les gorgeurs

Figure 12 : Photo du dispositif d'infection orale artificielle

Au bout de 60 minutes d'exposition au repas artificiel, les moustiques sont anesthésiés au froid (**Figure 13**) et ceux qui sont bien gorgés sont récupérés et remis dans des pots d'élevage pour y être incubés à la température, l'humidité et photo périodicité optimale (27± 1°C, 75-80% d'humidité relative, une photo-périodicité de 12 heures). Pendant toute la durée de l'incubation extrinsèque, ces moustiques sont nourris uniquement de jus sucré. Pendant toute cette période, les repas de sang sont exclus pour éviter tout contact avec des anticorps pouvant gêner le processus de réplication du virus dans l'organisme du moustique. A la fin de l'expérience, le sang restant dans les gorgeurs est récupéré dans un tube puis conservé à -80°C pour une détermination du titre du virus contenu dans le repas virémique après exposition. Des prélèvements de moustiques sont effectués aux différentes jours (5^{e}, 10^{e}, 15^{e}, 20^{e}) après le repas de sang, pour cerner avec précision le processus de réplication, de dissémination et de transmission du virus. Les moustiques prélevés sont utilisés pour évaluer la compétence vectorielle et l'évolution des souches virales les ayant infectés.

Figure 13 : Photo montrant des moustiques endormis avec le froid après exposition avec le virus.

II.2.5 Traitement des moustiques après incubation

A différents jours d'incubation (J_5, J_{10}, J_{15} et à J_{20}) un nombre déterminé de moustiques a été récupéré du pot d'incubation puis anesthésié au froid avant d'être disséqués afin de séparer les corps des pattes/ailes. Les proboscis ou trompe de chaque spécimen a été introduit dans un tube capillaire contenant (environ une goutte) de sérum de veau fœtal pour leur admettre à saliver (**Figure 14**). Au bout de 30 minutes d'exposition à ces tubes capillaires pour la collecte de salive, les moustiques sont retirés puis placés dans des tubes individuels numérotés avant d'être conservé à -80°C. Les pattes/ailes de chaque spécimen ainsi que la salive correspondante sont conservées séparément dans des tubes avec un numéro permettant de faire la correspondance entre les corps, pattes/ailes et salive de chaque spécimen. Le contenu du tube capillaire est déversé dans un tube contenant 50 µl de milieu L15. La salive des moustiques a été testée directement par RT-PCR pour tenter de détecter la présence du virus dans la salive. Les pattes/ailes et corps des moustiques sont broyés séparément dans du milieu de culture (L15 à 20% de sérum de veau fœtal) pour tester l'infection du moustique et la dissémination du virus dans son corps. Les broyats sont testés directement par RT-PCR à temps réel.

Figure 14 : Photo sur la salivation des moustiques.

II.2.6 Détection du virus de la FVR par RT-PCR temps réel

La PCR à Temps Réel est une version avancée de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Elle est basée sur la liaison d'un signal fluorescent à l'accumulation de produits d'amplification dans la réaction. L'accumulation du signal est mesurée et représentée sous forme d'un graphe se constituant au fil du temps et directement visible sur un écran d'ordinateur. Nous avons utilisé la PCR temps réel avec la chimie TaqMan.

Pour ce faire, on doit d'abord procéder par broyage et extraction d'ARN viral

II.2.6.1 Broyage

Nous avons testé les corps puis les pattes et ailes lorsque le corps leur correspondant est positif. Au total, 500 _l de L15 (milieu de culture Leitbovitz 15 contenant 10% de sérum de veau fœtal permettant la conservation du virus, des nutriments et des antibiotiques) ont été

ajouté dans le tube contenant le corps du moustique. Les moustiques ont été broyés à l'aide de pistons. Pour des raisons de biosécurité tout le processus de broyage a été fait sous une Hotte à flux laminaire et dans de la glace puisque les virus à ARN sont thermolabiles (**Figure 15**).

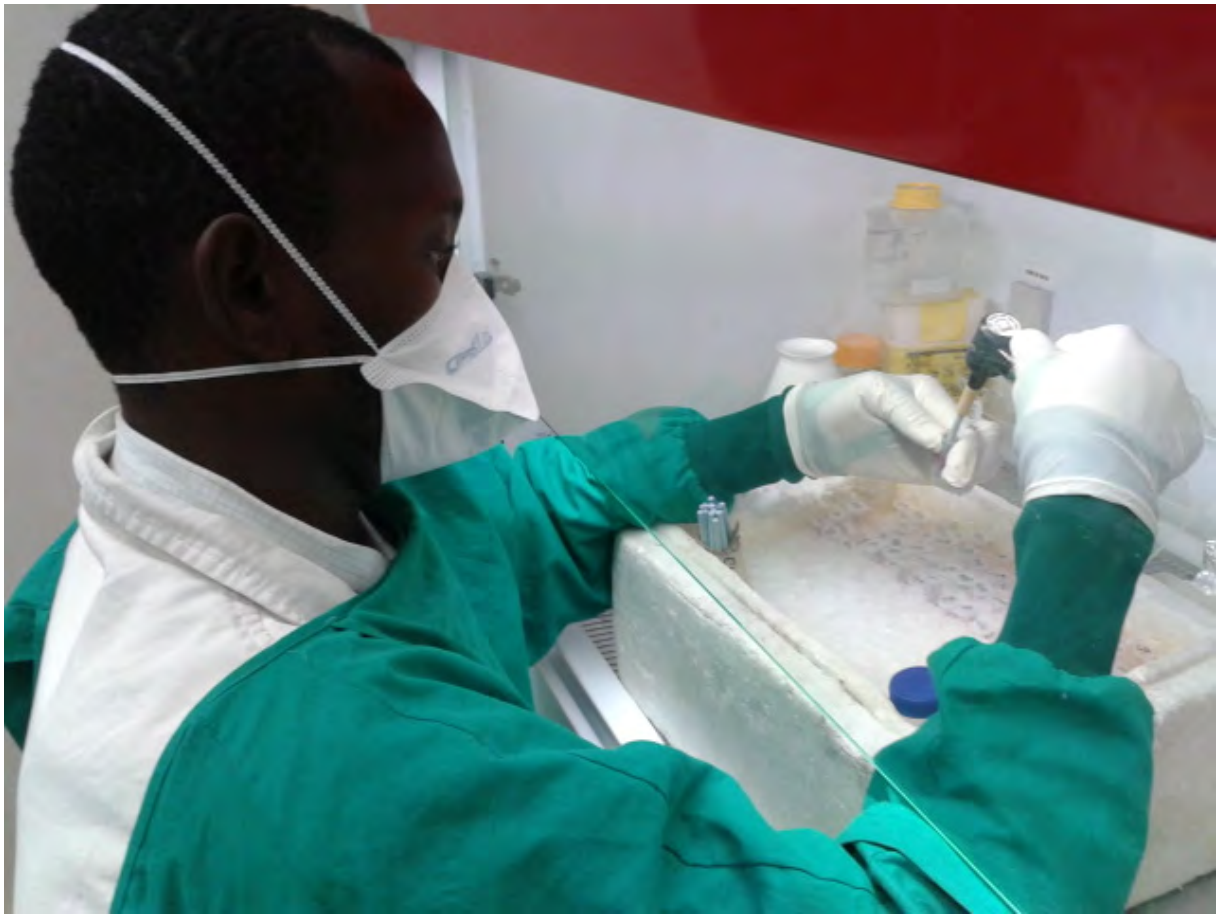

Figure 15 : Photo du le broyage des moustiques

II.2.6.2 Extraction de l'ARN viral

Le kit QIAGEN a été utilisé pour l'extraction de l'ARN viral. Le principe de base repose sur la séparation des protéines et des acides nucléiques en utilisant un agent dénaturant des protéines et des lavages successifs permettent d'éliminer les protéines et de purifier l'ARN. Ainsi, les acides nucléiques extraits et purifiés peuvent être finalement récupérés sous forme liquide.

Cette étape permet d'extraire l'ARN du virus de la fièvre de la vallée du rift contenu dans le broyat de moustique. Le principe des colonnes QIAamp est d'utiliser une membrane qui retient les acides nucléiques. Le surnageant infecté est lysé (par le tampon AVL + Carrier RNA) pour libérer l'ARN viral. Ce surnageant lysé contenant de l'ARN est déposé sur la colonne. L'ARN sera retenu (par la silice) sur la membrane, le reste passe à travers sans être

retenu. Des lavages (tampons AW1 et AW2) de cette membrane vont permettre d'avoir de l'ARN pur. L'ARN purifié retenu sur la colonne va être élué (récupéré) avec du tampon AVE. Les centrifugations permettent un passage plus rapide des tampons à travers la membrane. Le changement de tubes à chaque étape évite qu'il y ait risque de saturation et/ou contamination de la membrane.

II.2.6.3 La RT-PCR temps réel

Elle comprend l'utilisation, dans la réaction de PCR, d'amorces et d'un troisième oligonucléotide (sonde) portant un marqueur fluorescent.

La sonde est constituée d'un marqueur reporter (émetteur de fluorescence) à son extrémité 5' et d'un quencher (capteur de la FRET, fluorescent resonnance energy transfert, émis par le reporter) en 3'. Durant l'amplification, l'activité 5'-3' exonucléasique de la taq polymérase dégrade la sonde fixée sur la séquence cible, séparant les deux marqueurs et permettant à la fluorescence émise par le reporter d'être libérée et mesurée (**Figure 16)**. A chaque cycle, une molécule est ainsi libérée et la quantité de fluorescence de la molécule, proportionnelle au nombre de copies de l'amplification, est mesurée en temps réel (**Figure 17 et 18**). Un cycle seuil (Ct) est alors défini, valeur prédictive de la quantité d'amplifications. Il correspond au point d'intersection du seuil de détection fixé au milieu de la phase linéaire de la courbe d'amplification.

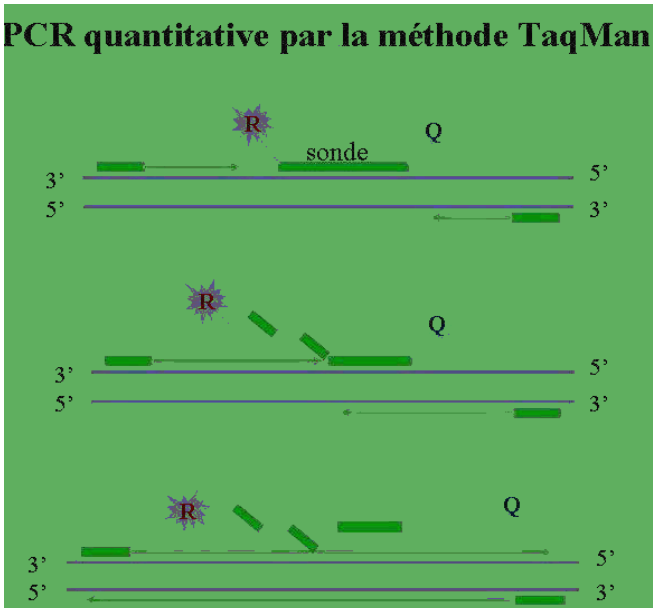

Figure 16 : Représentation schématique du déroulement de la RT-PCR avec la sonde TaqMan (http://www.sesep.uvsq.fr/, 2012)

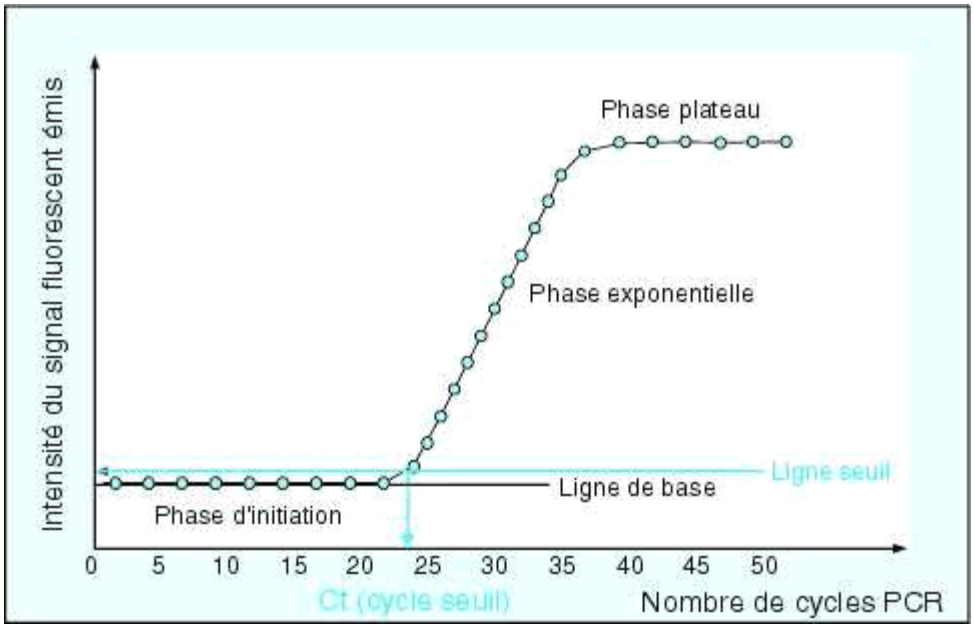

Figure 17 : Représentation graphique de la quantité de fluorescence proportionnelle au nombre de copies en fonction des cycles (Tse et Capeau, 2003)

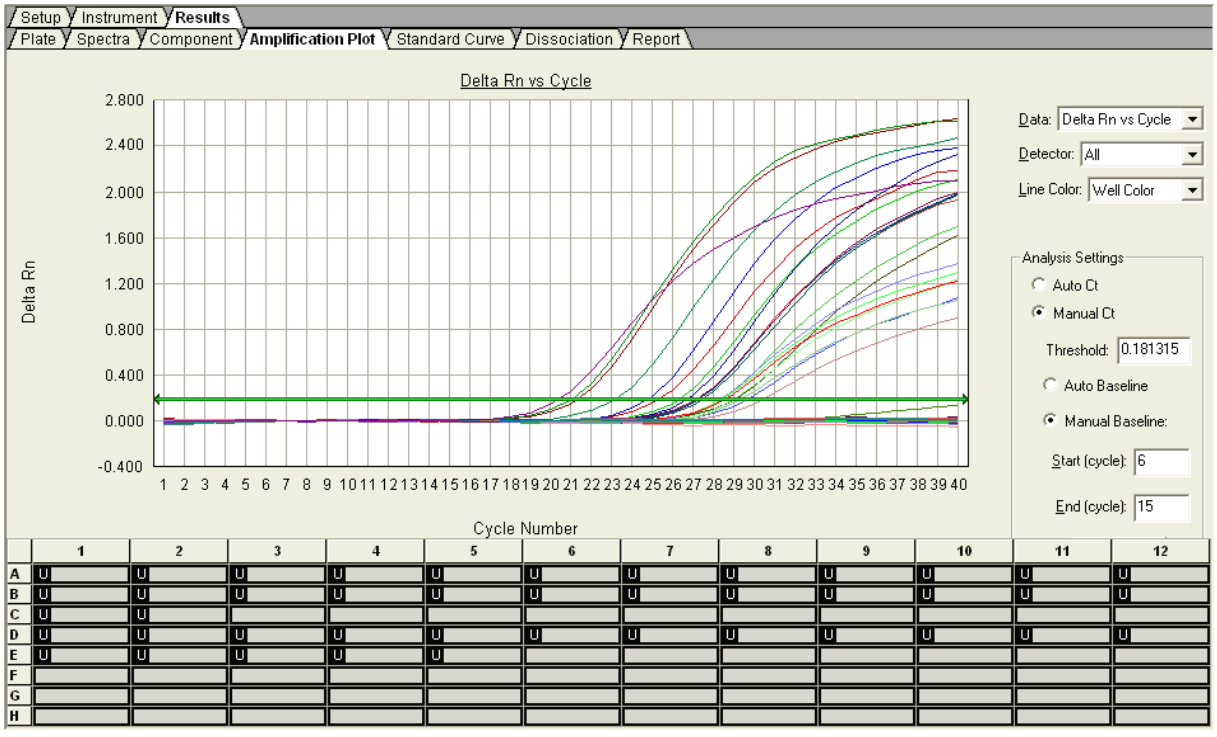

Figure 18 : photo du résultat d'une PCR temps réel

Les conditions de la RT-PCR ont été optimisées avec le Kit Quantitect (Qiagen, Hilden Germany). La réaction RT-PCR a été réalisée avec un volume de 25 _l, comprenant 2x

Qantittect Probe, RT-Master Mix, 10 _M de chaque amorce, 200 nM de la sonde et 5 _l d'ARN à tester (triplicate). Les conditions de la PCR sont : 10 mn à 50°C, 15 mn à 95°C (activation de la Taq Polymerase), suivi de 40 cycles (dénaturation, 15 sec à 95°C et hybridation/élongation, 1 mn à 60°C). L'amplification et la détection ont été réalisées avec l'appareil ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystem).

II.2.7 Analyse des données

Pour chaque souche virale, les taux d'infection, de dissémination et de transmission ont été calculés. Le taux d'infection a été défini comme le rapport en pourcentage du nombre de moustiques positifs sur le nombre total de moustiques testés. Quant au taux de dissémination, il correspond au rapport en pourcentage des pattes/ailes (de moustiques dont le corps est positif) positives sur le nombre de corps correspondant testé positif. Pour la transmission, il correspond au rapport en pourcentage des salives (des moustiques dont les pattes/ailes sont positives) sur les pattes/ailes correspondant testées positives. Des tests exacts de Fisher ont été réalisés pour la comparaison des taux d'infection, de dissémination et de transmission en utilisant un logiciel statistique R (R Fondation pour le calcul statistique, Vienne, Autriche). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $P < 0,05$.

II.3. Résultats

Les titres de stock ainsi que ceux exposés aux moustiques sont représentés dans le **Tableau 3**. Nous constatons ici que le titre de stock ($\approx 10^{8,5}$ PFU/ml) est supérieur au titre après repas de sang ($\approx 10^{6}$ PFU/ml) sauf pour la souche d'origine arthropode où nous avons environ le même titre que celui du stock. Mais ces titres sont dans l'intervalle des titres trouvés dans la nature lors des épidémies (Turell et *al.*, 2007 ; McIntosh et *al.* 1973a).

Tableau 3 : Titres de stock et titres exposés.

Souches	Titre viral stock et repas après exposition aux moustiques (PFU/ml)					
	Ae. vexans		*Cx. quinquefasciatus*		*Cx. poicilipes*	
	Stock	Repas	Stock	repas	stock	repas
SH172805	$5.10^{7,68}$	$4,5.10^{6}$	$2,25.10^{8}$	$1,5.10^{6}$	$2,25.10^{8}$	$9,75.10^{8}$
ArD141967	$5.10^{8,55}$	$5,5.10^{6}$	$2,25.10^{8}$	$5,5.10^{8}$	$2,25.10^{8}$P	$1,15.10^{7}$
AnD133719	$5.10^{8,42}$	$9,5.10^{6}$	$2,5.10^{8}$	$1,7.10^{6}$	$2,5.10^{8}$	3.10^{6}
MP-12		$1,125.10^{8}$				

II.3.1. Caractérisation moléculaire des souches virales utilisées

Les séquences des segments S, M, et L des régions codantes obtenues pour les 3 souches alignées, ont montré que la souche humaine appartient à la lignée Afrique de l'Est, tandis que les souches animales et moustiques appartiennent à la lignée Afrique de l'Ouest. Les résultats ont révélé également que les protéines NP et L ont été les plus conservées sur les régions amplifiées. Cependant, les acides aminés variables ont été observés au niveau des protéines NSs, NSM, Gn et Gc pour la souche humaine (SH172805) détectée dans la salive moustique par rapport aux 2 autres souches (**figures 19 et 20**).

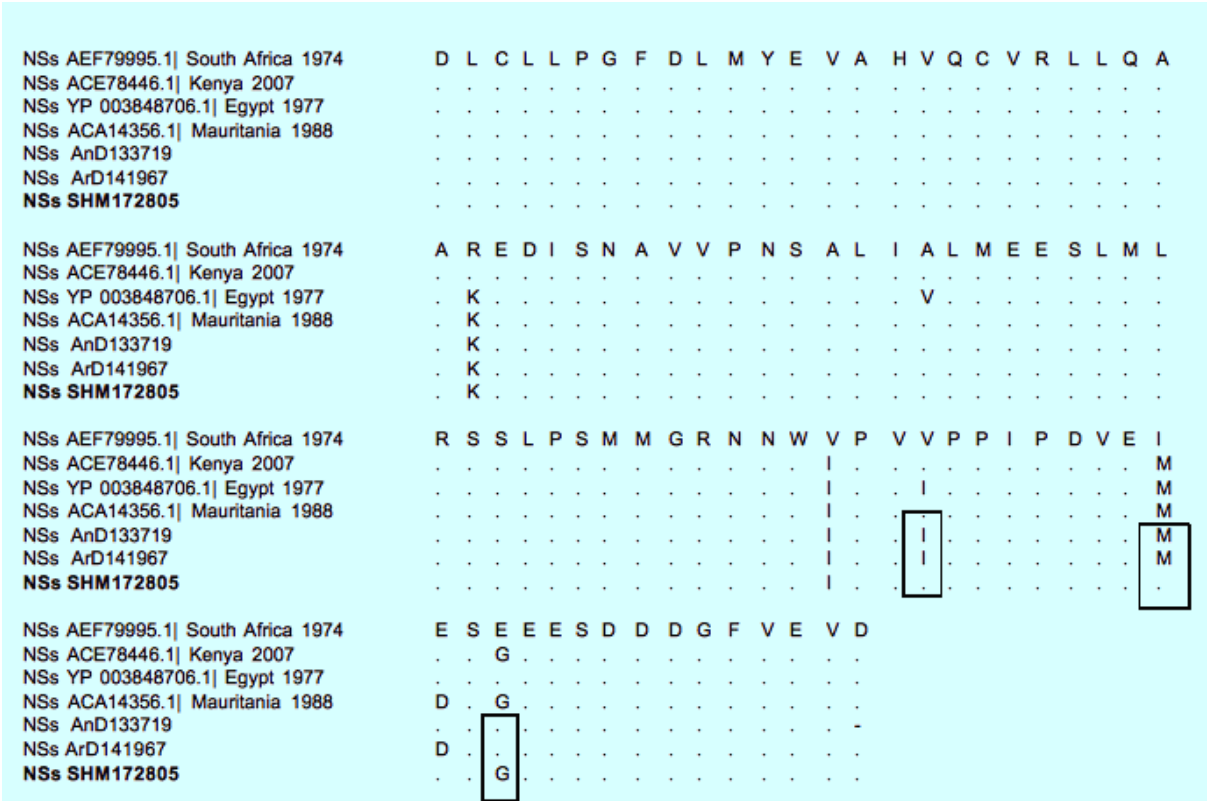

Figure 19 : Alignement d'une portion de la protein NSs

La protéine NS de l'acide aminé 176 à 265 se réfèrent à la séquence du génome d'Afrique du Sud 1974 (Numéro d'accès : AEF79995.1). Les Dots sont des acides aminés conservés. La souche humaine SHM172805 est en gras. Les Rectangles représentent des variables acides aminés dans la séquence de la souche humaine par rapport à ArD141967 et AnD133719.

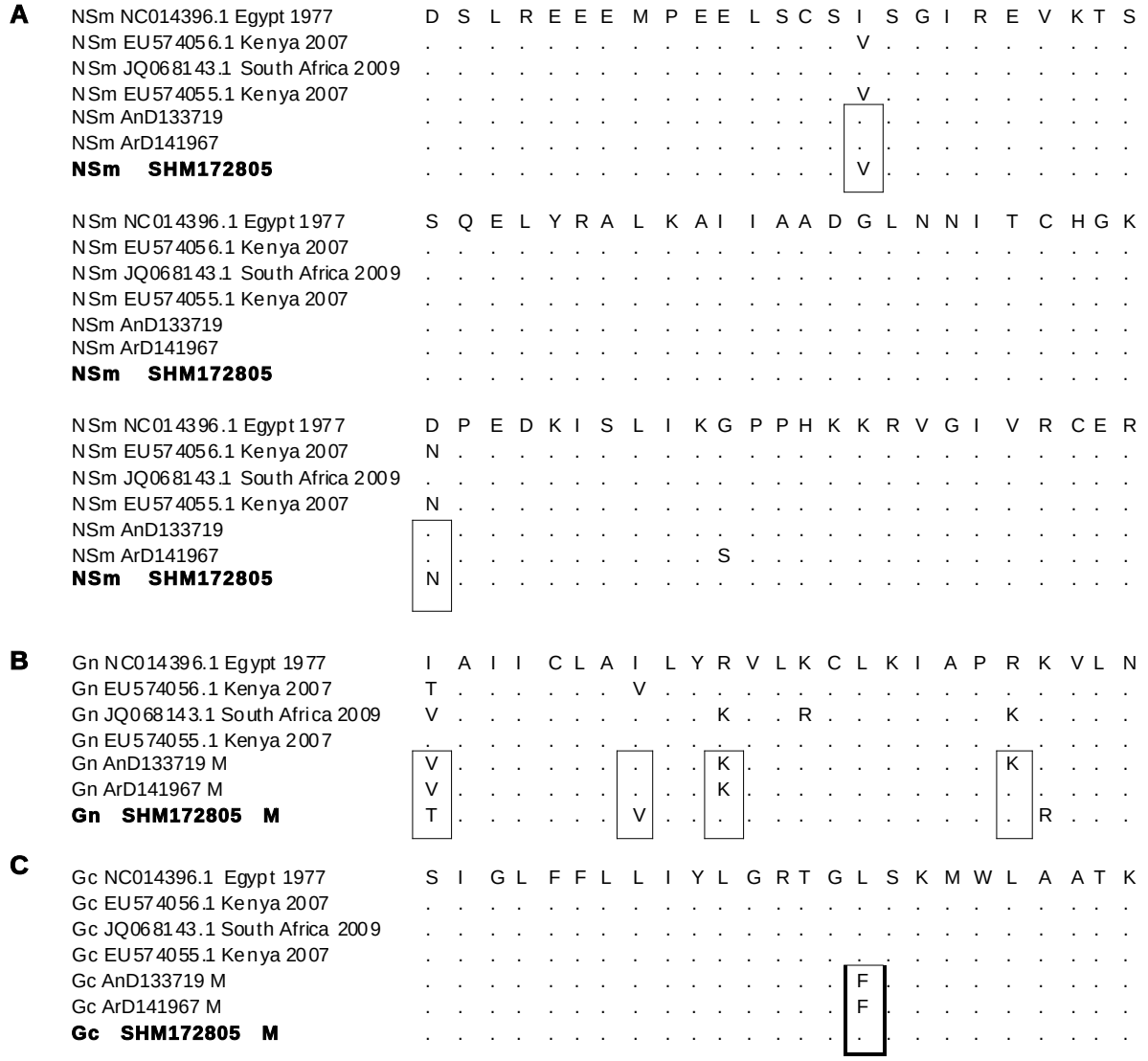

Figure 20 : Alignement d'une portion du segment M

Les protéines, Nm de l'acide aminé 7-81, Gn de 441 à 446 et Gc de 479 à 504 se réfère à la séquence du génome de l'Afrique du Sud 2009 (numéro d'accès : JQ068143.1). Les points sont des acides aminés conservés. La souche humaine SHM172805 est en gras. Les Rectangles représentent des acides aminés variables dans la séquence de la souche humaine par rapport à ArD141967 et AnD133719.

Ces variations se sont produites principalement entre les acides aminés de même nature (I / V / M, R / K), cependant des variations entre l'acide et polaire (D/N), l'acide et apolaire (E /G), apolaire et polaire (V/T), ou aliphatiques et des acides aminés aromatiques (L/F) sont produites également dans les différentes protéines. Tous les sites de glycosylation liés à N des protéines d'enveloppe ont été conservés (non représenté).

Tableau 4 : Liste des Primers

Nom	Segment	Position	Sequence	Tm
NSng	S	31-48	TATCATGGATTACTTTCC	48
NSca	S	841-824	CCTTAACCTCTAATCAAC	50
NPF	S	582-601	AGTTCCAAACTCAGCCCTCA	53
NPR	S	1646-1665	ATCAAGAGCTTGCGATCCAG	52.7
M1F	M	3-22	ACAAAGACCGGTGCAACTTC	53.9
M1R	M	1120-1140	CCAYGCAAAGGGTATGCAAT	53.2
M2F	M	1035-1054	TGAGGACTCTGAATTRCACCT	48.7
M2R	M	2395-2415	TCCAGAGAGTTGAGCCTTGC	53.3
MRV1a	M	3050-3068	CAAATGACTACCAGTCAGC	44.6
MRV2g	M	2262-2292	GGTGGAAGGACTCTGCGA	52.5
M3F	M	2979-2998	CAGTCCTCAGTGAGCYCATA	46.1
M3R	M	3763-3782	TCTCGGTTCTGGRGTGTGAA	52.5
L1F	L	9-28	ACCGCCCAATATTGTAGCAC	53
L1R	L	1288-1308	AGATGGTGATCACGTTGTRCC	52
L1A	L	1121-1140	CTCTCCAGATCCCAACTCCA	52
L1B	L	2663-2683	GGGGTGGGTCATTCTCCTTA	53.4
L2F	L	2641-2660	CCAGGGTCATTCCACTTCAG	53.1
L2R	L	3933-3953	GAAGGAGGCRTGCAATCAT	50.2
L3F	L	3799-3819	TCTCRTTRAAGTTGCTYGTG	44.3
L3R	L	5107-5127	TGGAAAGAAGCARAAAGCAG	48.6
L4F	L	4988-5009	TCATCTGTTGCCCACAAGTC	51.9
L4R	L	6376-6395	CGCCCAATCATGGATTCTA	50.5

II.3.2. Compétence vectorielle des populations de moustiques de Barkédji vis- a-vis des souches naturelles de VFVR

II.3.2.1. Infection

Nos résultats ont révélé que toutes les espèces sont sensibles à l'infection au virus de la FVR et sont en mesure de transmettre. Pour chacune des espèces de moustiques, les taux

d'infection étaient comparables entre les périodes d'incubation pour chaque souche de virus. Cependant, une variation significative n'a été détectée que lorsque nous avons comparé les taux d'infection par les différentes souches de virus à différentes périodes d'incubation.

Ae. vexans présentaient des taux d'infection par la souche ArD141967 significativement plus faibles que la souche SH172805 ($P \leq 0,04$). La même tendance a été observée entre la souche ArD141967 et les souches AnD133719 ($P \leq 0,03$), sauf à 20 jpi ($P = 0,3$). Toutefois, aucune différence significative n'a été enregistrée entre le taux d'infection des souches de virus AnD133719 et SH172805 ($P \geq 0,25$) (**Figure 21**).

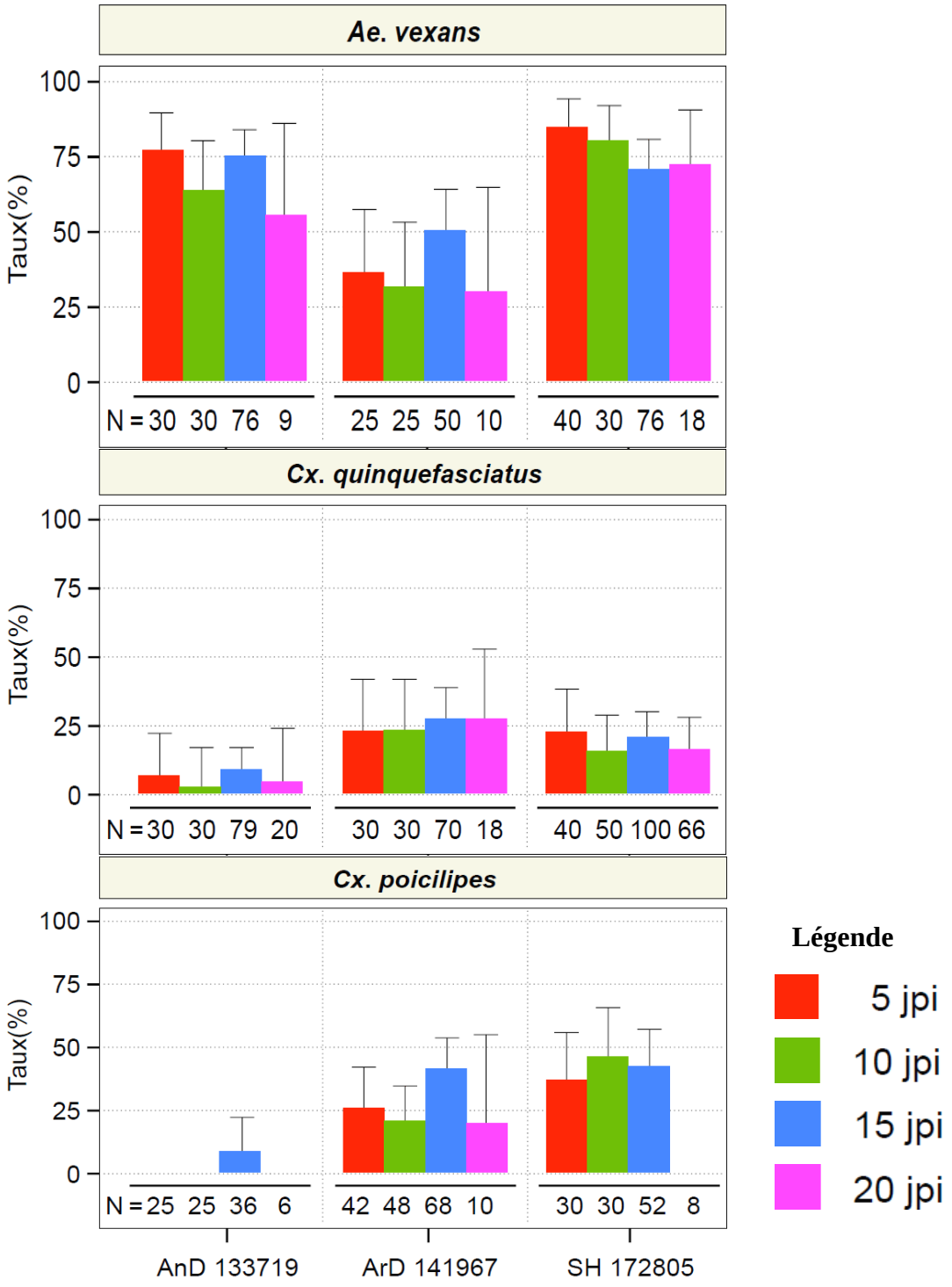

Figure 21 : Taux d'infection d'*Ae. Vexans*, de *Cx. quinquefasciatus* et de *Cx. poicilipes* à différentes jours d'incubation et à différentes souches de virus.

Avec *Cx. quinquefasciatus* les taux d'infection étaient similaires entre les souches SH172805 et ArD141967. AnD133719 était la seule souche, présentant des taux

significativement plus faibles que la souche SH172805 (P = 0,03) et la souche ArD141967 (P = 0,004) infection.

Concernant *Cx. poicilipes*, aucune différence significative n'a été observée entre les différents jours d'incubation (P> 0,05) sauf en 10 et 15 dpi avec la souche d'origine arthropodes (P = 0,021). La comparaison entre les souches virales a révélé qu'à 10 jpi la souche humaine était plus infectieuse que la souche de moustiques (P = 0,016), à 15 jpi la souche animale présentait le taux d'infection significativement inférieur que la souche de moustiques (P = 0,00049) et humaine (P = 0,00025).

Une analyse par paires des taux d'infection entre les espèces a révélé qu'*Ae. vexans* est généralement plus sensibles que *Cx. quinquefasciatus*. La différence significative, unique exception obtenu avec la souche ArD141967 et SH172805 à 15 jpi lorsque *Ae. vexans* a montré un taux d'infection significativement plus élevé que *Cx. quinquefasciatus* (P = 0,001). En effet, avec la même souche, une infection comparable a été observée entre *Ae. vexans* et *Cx. quinquefasciatus* à 5, 10, 20 dpi (P ≥ 0,3).

II.3.2.2. Dissémination

Les taux de dissémination ont été relativement faibles pour les trois espèces quelles que soient les souches de virus considérées. Ils variaient entre 10,5 à 37% chez *Ae. vexans*, 9,5 et 28,6% chez *Cx. quinquefasciatus* et entre 3 à 40,9% chez *Cx. poicilipes*. La dissémination a été enregistrée chez *Ae. vexans* avec toute souche de virus. Il a cependant été observé précocement à partir de 5 jpi avec la souche SH172805, mais retardé à partir de 10 et 15 jpi respectivement avec les souches ArD141967 et AnD133719 (**Figure 22**).

A l'exception de la différence significative observée à 15 jpi entre le AnD133719 et SH172805 (p = 0,001), les taux de dissémination étaient comparables pour toutes les souches de virus et toutes les périodes d'incubation (P ≥0.07). Avec *Cx. quinquefasciatus*, les taux de dissémination étaient comparables entre les différentes périodes d'incubation (P ≥0.1). L'espèce n'a pas été en mesure de disséminer la souche ArD141967 en dépit d'un titre élevé de virus de $5{,}510^{8}$ PFU / ml utilisé. La même observation a été faite avec *Cx. poicilipes* qui n'a pas disséminé la souche animale (AnD133719).

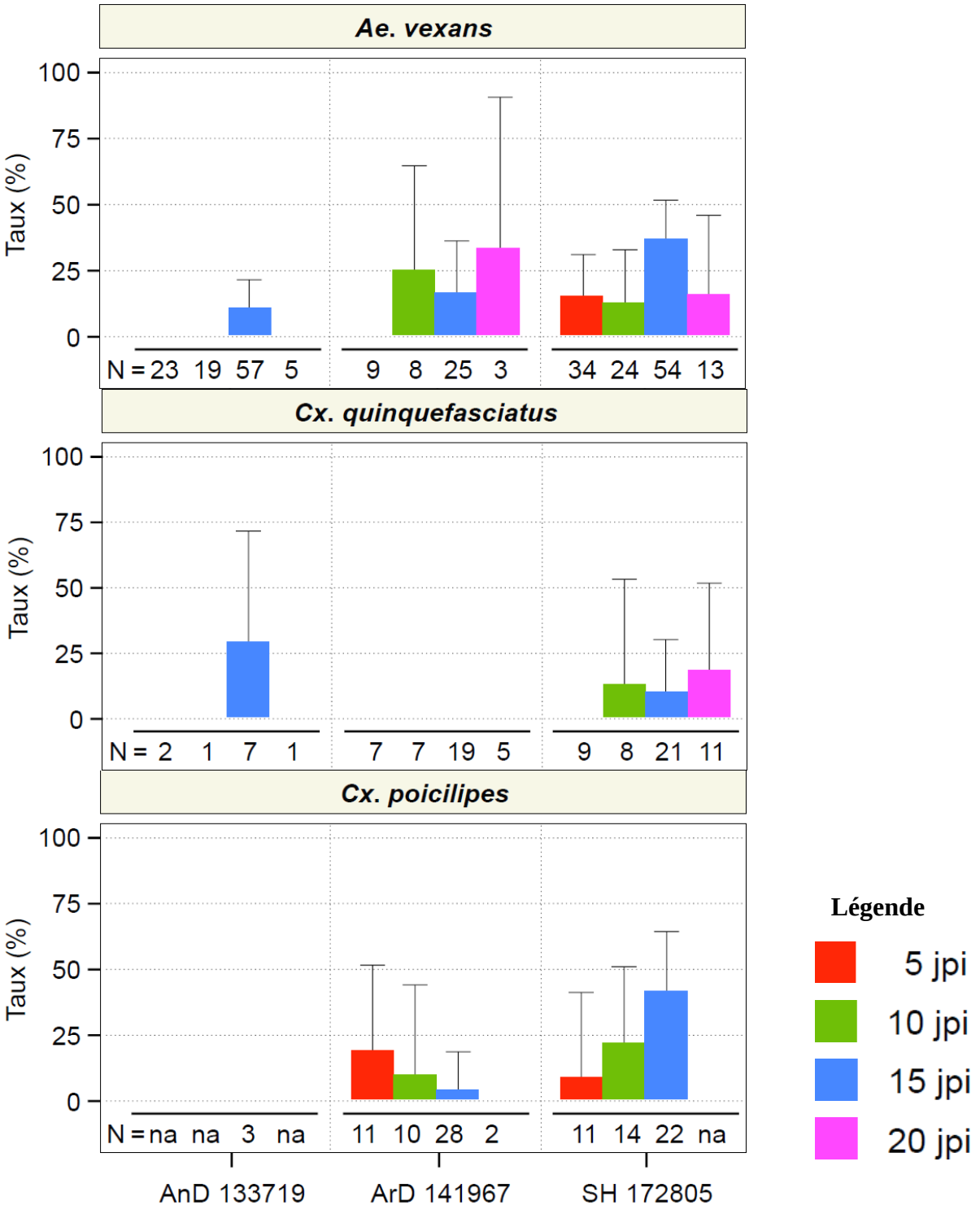

Figure 22 : Taux dissémination d'*Ae. vexans*, de *Cx. quinquefasciatus* et de *Cx. poicilipes* à différents jours d'incubation et à différentes souches de virus.

II.3.2.3. Transmission

Seulement la souche SH172805 a été transmise à 10 jpi par *Ae. vexans* et ensuite à 15 jpi par *Cx. poicilipes* et plus tard à 20 jpi par *Cx. quinquefasciatus.* Les taux de transmission se situaient entre 13,3 et 33,3% chez *Ae. vexans* et était de 50% chez *Cx. quinquefasciatus.* Aucune différence significative n'a été observée dans les taux de transmission entre les deux espèces et les périodes d'incubation (P≥0.05) (**Figure 23**).

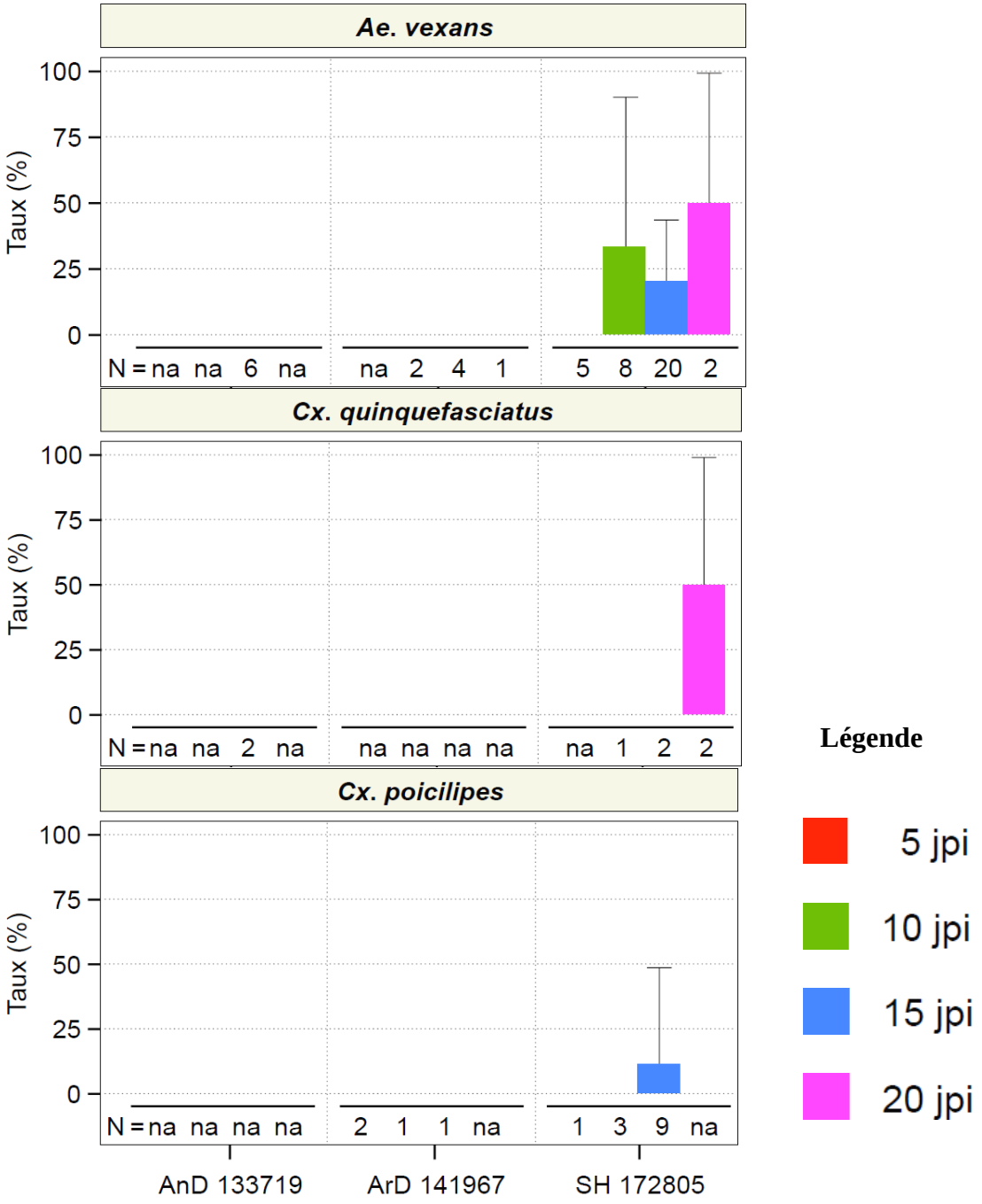

Figure 23 : Taux de transmission d'*Ae. vexans*, de *Cx. quinquefasciatus* et de *Cx. poicilipes* à différents jours d'incubation et à différentes souches de virus.

II.3.3. Susceptibilité et capacité d'*Aedes vexans* à transmettre la souche vaccinale MP_12.

Le titre du repas de sang après infection ont été de $1{,}125.10^8$ PFU/ml. Les taux d'infection ont été compris entre 77,77% et 97,36%. Ces taux d'infection ont accusé une baisse progressive suivant les jours d'incubation de J_3 à J_{21}. Ils ont cependant été partout comparables à l'exception des valeurs d'infection obtenues entre J3 et J21 (p=0,017). (**Figure 24**).

Contrairement à l'infection, la dissémination a en revanche régulièrement augmenté de J_3 à J_{21} avec des taux significativement différents entre J3 et J15 ($p<0{,}0001$) et entre J21 comparé à J3 et J15 ($p\leq0{,}001$). Quant à la transmission, elle a été observée à partir de J_7 avec un taux de 8,33% sans variation significative suivant les périodes d'incubation ($p\geq0{,}189$). Sa dynamique répond à une courbe en cloche avec un maximum à J15 (25%) et un minimum à J_{21} de 5,88%.

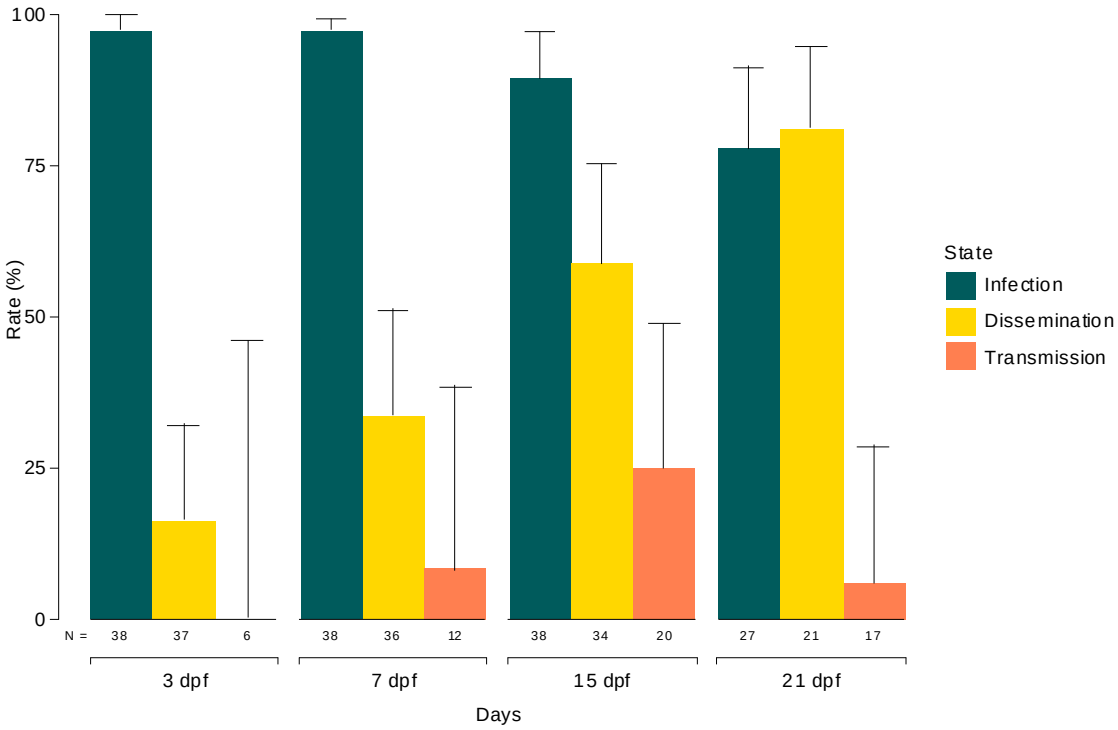

Figure 24 : Taux d'infection, de dissémination et de transmission d'*Aedes vexans* à différents jours d'incubation de la souche vaccinale MP-12 du virus de la FVR.

II.4. Discussion

Malgré, le risque à la fois sanitaire et économique, causé par le VFVR lors des épidémies, aucune étude n'a encore été faite sur la capacité des vecteurs soupçonnés au Sénégal alors qu'il est important d'identifier les espèces qui devraient être ciblés pour contrôler le VFVR en cas d'une éventuelle épidémie. La diminution du titre viral qui est passée de $10^{8,5}$ UFP/ml (Unité Formatrice de Plages) avant infection à environ 10^{6} UFP/ml après infection peut s'expliquer par la dilution du virus réalisée lors de la préparation du mixte mais surtout par la perte de particules virales du fait que le virus est thermolabile et se dégrade ainsi lors de son contact avec la température du bain-marie (37°C) qui était connecté aux gorgeurs. Malgré tout, ce titre obtenu est comparable aux titres trouvés dans la nature lors des épidémies (Turell et *al.*, 2007 ; McIntosh et *al.* 1973a).

Nos résultats ont montré que toutes les espèces de moustiques testées étaient sensibles à l'infection par les différentes souches de VFVR. Cependant, ils ont constaté que les genres *Culex* sont moins sensibles à l'infection que les moustiques du genre *Aedes*. Les taux d'infection les plus élevés ont été obtenus avec *Ae. vexans* qui était aussi la seule espèce qui a disséminée toutes les souches de virus et transmis à différentes périodes d'incubation. Malgré un titre viral environ ($\approx 10^{6}$ PFU/ml), les taux d'infection, de dissémination et de transmission que nous avons obtenues étaient aussi élevés que ceux obtenus avec les populations de la même espèce des Etats-Unis exposées à un animal avec une virémie supérieure ou égale à $10^{8,5}$ UFP/ml (Turrell et *al.*, 2008) et étaient respectivement entre 47,9 à 95,4%, de 10,3 à 60,8% et 25 à 100%. Cependant, nos résultats diffèrent de ceux d'autres études (Iranpour et *al.*, 2011) qui ont démontré l'incompétence de l'espèce dont l'exposition à des titres viraux compris entre $10^{7,9}$ et 10^{9} UFP/ml a conduit à un taux d'infection de seulement 15%, sans dissémination ni transmission. De même, il a été démontré que, dans les mêmes conditions expérimentales, les populations d'*Ae. vexans* capturés à partir de différentes localités ont présenté des taux différents de transmission. Ce fut le cas d'une population de Louisiane et de la Floride présentant des taux de transmission estimés au plus à 27%, tandis que ceux des colonies de Colorado et de la Californie était de 1% (Turrell et *al.*, 2010). Ces résultats montrent une diversité géographique des populations de moustiques qui peuvent affecter de manière significative la compétence vectorielle. En effet, *Ae. vexans* est un complexe comprenant 3 sous-espèces : *Ae. vexans nipponii* (Theobald, 1907), présent en Asie orientale, *Ae. vexans vexans* (Meigen, 1830) présents en Europe et *Ae. vexans arabiensis* (Patton 1905), le seul représentant en Afrique.

Les faibles taux d'infection chez les populations de *Culex* ont déjà été prouvés par des études antérieures menées avec *Cx. quinquefasciatus* d'Afrique du Sud, l'Australie et le sud-est des États-Unis d'Amérique (McIntosh et *al.*, 1980, Turrell et Kay 1998, Turrell et *al.*, 2007 ; Turrell et *al.*, 2008 ; Turrell et *al.*, 2010). Dans ces études, le taux d'infection maximale était de 26%, alors que les taux de dissémination et de transmission étaient nuls.

En ce qui concerne *Cx. poicilipes*, nous avons démontré sa compétence vectorielle pour le VFVR. Ce constat confirme un précédent travail effectué par Jupp et *al.*, 1988 qui avait déjà prouvé expérimentalement sa compétence vectorielle. Le taux de transmission faible (11,11%) constaté dans notre étude pourrait être expliqué par la durée de la période d'incubation extrinsèque peut-être pas suffisante (15 jours d'incubation extrinsèque). En effet, dans les études antérieures menées avec une population de *Cx. poicilipes* d'Afrique du Sud (Jupp *et al.*, 1988) un taux de transmission similaire (15%) a été enregistré 15 jours après l'exposition par rapport à nos résultats. Cependant, ce taux de transmission avait augmenté de façon significative pour atteindre 80% après 30 jours d'incubation extrinsèque.

Nos résultats ont révélé une influence de la souche virale utilisée sur la compétence vectorielle. En effet, il a été noté que la souche "animale" était moins virulente que les souches virales isolées chez l'homme ou des arthropodes. Aussi seule la souche humaine appartenant à la lignée Afrique de l'Est (SH 172805) a été transmise. Nous ne croyons pas que ces variations observées sont dues à des titres viraux différents puisque aucune corrélation significative n'a été observée entre les titres viraux et les taux d'infection obtenus. Par conséquent, la variabilité génétique des souches de virus utilisés dans notre expérience pourrait expliquer ces différences de l'infection et le mode de transmission.

Les résultats préliminaires de l'analyse de séquence d'une partie du génome des segments L, M et S soutiennent cette hypothèse. En effet, au-delà de son appartenance à la lignée Afrique de l'Est, l'alignement d'une partie des protéines d'enveloppe a montré des variations importantes dans les segments M et S de la souche SH 172805 par rapport à d'autres souches. Les deux segments S et M codent pour des protéines non structurales NSs et NSm dont le rôle en tant que facteur de virulence a été démontré.

Nos résultats ont montré plusieurs acides aminés variables dans les protéines NSs, NSm, Gc et Gn de la souche humaine par rapport aux autres, il faut noter que toutes ces protéines sont essentielles pour les fonctions virales et semblent être nécessaires pour une réplication efficace du virus. Le Gn et Gc sont impliqués dans la pénétration du VFVR lors de l'infection, bien que le récepteur cellulaire est encore inconnu (Filone *et al.*, 2006 ; Garry et Garry 2004).

Les protéines d'enveloppe jouent également un rôle important dans l'assemblage au niveau de l'appareil de Golgi et le bourgeonnement de particules virales (Carnec et *al.*, 2014).

Alors que la protéine NSs agit sur la réponse antivirale de la cellule de mammifère par inhibition directe ou indirecte de la transcription (Kalveram et *al.*, 2011 ; Billecocq et *al.*, 2004), les protéines NSm ont une fonction anti-apoptotique et ont un impact négatif sur le développement du virus dans la cellule (Won et *al.*, 2007 ; Gerard et *al.*, 2007, Ikegami, 2012). Le NSm semble également avoir un rôle fonctionnel dans la compétence vectorielle des moustiques pour le VFVR au niveau de la barrière de l'intestin moyen (Kading et *al.*, 2014). En outre, seules ou combinées, ces deux protéines impactent sur la compétence vectorielle de certaines espèces en réduisant leur infection ou potentiel de transmettre (Crabtree et *al.*, 2012).

Nos analyses ont également révélé que tous les sites de glycosylation ont été conservés, et que la souche SH172805, présente des variations d'acides aminés par rapport à d'autres souches. Les mutations d'un seul acide aminé parmi tous ceux observés sur ces protéines peuvent avoir un impact conséquent, la réplication virale peut conduire à un comportement différent d'une souche à l'autre dans le moustique vecteur. Il a été démontré avec d'autres arbovirus qu'une mutation d'un seul acide aminé peut augmenter ou améliorer la virulence et la transmission dans le moustique vecteur. En effet, en utilisant des virus Chikungunya, il a été montré qu'une seule mutation entre les acides aminés de même nature (A226V) dans la glycoprotéine E1 améliore la transmission virale chez *Aedes albopictus* (Vazeille et *al.*, 2007; Arias-Goeta et *al.*, 2013).

D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'impact de chaque protéine identifiée en utilisant une approche de génétique reverse. En outre, le rôle des autres facteurs tels que l'ARNi nécessite des investigations complémentaires afin de déterminer leur rôle dans les différences de réponse des espèces de moustiques aux différentes souches de virus.

Concernant l'influence de l'augmentation des jours d'incubation sur la compétence vectorielle, nous pouvons dire ici que cette augmentation favorise positivement la compétence vectorielle en parfait accord avec les résultats d'autres études (Moutailler et *al.*, 2007 ; Jupp et *al.*, 1988).

L'analyse des données obtenues avec l'espérance de vie des populations des espèces testées nous a permis de cerner avec plus de précision de l'implication épidémiologique de chacune d'elle.

Concernant *Ae. vexans* alors, tenant compte de la période d'incubation de 10 jours que nous avons obtenus dans notre expérimentation mais également des taux de survie quotidien

obtenus lors d'une étude antérieure (Ba et *al.*, 2005), nous avons estimé l'espérance infectante, entre $(0,91)^{10}$ et $(0,96)^{10}$. Cela signifie que 38,94 à 66,48% de la population d'*Ae. vexans* survivent au 10ième jour ce qui est nécessaire pour passer de l'infection à la transmission. Cette espérance de vie infectante associée à son abondance, sa longévité observée dans la nature pour *Ae. vexans* (Ba et *al.*, 2005) et sa compétence vectorielle prouvée après 10 jours d'incubation au laboratoire confirme le rôle important que *Ae. vexans* pourrait avoir dans la transmission du virus de la FVR. .

Pour *Cx. poicilipes*, le taux de survie après 15 jours variait à partir de $(0,70)^{15}$ et $(0,79)^{15}$, ce qui signifie que 0,5 à 2,91% de la population a survécu à 15 jours qui correspond au temps nécessaire pour que la transmission puisse avoir lieu. L'expérience de la compétence vectorielle a montré que 15% des individus infectés par le VFVR ont transmis après une incubation de 15 jours et que 80% transmis après 30 jours (Jupp et Cornel 1988). Parce que la longévité des femelles de *Cx. poicilipes* après leur libération était seulement 12 jours et la période d'incubation de la FVR était de 15 jours, nous nous attendons à ce que *Cx. poicilipes* à jouer un rôle plus limité que *Ae. vexans* dans la transmission du virus.

Quant à *Cx. quinquefasciatus*, sur la base de nos données et des taux quotidiens de survie obtenus dans des études antérieures (Elizondo-Quiroga et *al.*, 2006), l'espérance de vie infectante est estimée à $(0,871)^{20}$ et $(0,883)^{20}$. En d'autres termes, seulement 6,31% à 8,3 % de la population de *Cx. quinquefasciatus* seront encore vivant 15 jours après l'infection, ce qui est le temps nécessaire pour que la transmission ait lieu. Ce faible taux de survie minimiserait sa capacité vectorielle contrairement à ses homologues *Cx. pipiens* de l'Afrique de l'Est qui a été le principal vecteur de l'épidémie d'Egypte en 1977. La longue période d'incubation extrinsèque obtenue dans notre étude (20ième Jour après exposition) serait un des principaux facteurs limitants.

En somme, à la lumière de ces données nous pouvons affirmer que les populations de *Culex* même si elles sont compétentes expérimentalement ont des espérances de vie infectant faible ne leur permettant pas d'assurer et de maintenir une transmission suffisamment efficace du virus FVR sur le terrain. Ces données peuvent expliquer le faible impact du virus WN sur l'homme en Afrique.

Cependant, nos valeurs de survie sont probablement sous-estimées, parce que nous avons utilisé des femelles sauvages qui étaient manifestement plus vieilles que l'âge calculé par récupération. En outre, les estimations du taux de survie de *Cx. poicilipes* basé sur les données de parité ont donné un taux élevé (42%) l'espérance de vie à 14 jours. Nous devons

également garder à l'esprit que *Cx. poicilipes*, comme *Culex pipiens L*., peuvent transmettre le VFVR, après des périodes d'incubation très courtes, mais pas à un pourcentage élevé (Meegan et *al.,* 1980). *Cx. pipiens* est l'espèce qui a le plus contribué à l'éclosion de la FVR en Egypte dans les années 1970. L'évaluation de la période d'incubation extrinsèque minimum avant la première transmission à infecter *Cx. poicilipes* et *Ae. vexans* devraient permettre de mieux juger du rôle de ces deux espèces dans la transmission de la FVR.

Nous avons aussi démontré la capacité d'*Ae. vexans* à s'infecter, disséminer et transmettre la souche vaccinale MP-12 utilisée contre le VFVR. Cette capacité des moustiques à s'infecter, disséminer et transmettre la souche MP-12 a déjà été démontrée (Turell et *al.,* 1991) mais sans retour à la virulence. En effet des moustiques *Cx. pipiens* originaires d'Egypte ont transmis à des hamsters la souche vaccinale MP-12 qui leur était inoculé ou qu'ils avaient ingérée à travers un coton imbibé. Dans cette expérimentation alors que les taux de transmission était de 100% lors de l'infection par voie intrathoracique, les taux de transmission tout comme de dissémination ont été faibles (seulement 6% et 3% respectivement). Les taux d'infection, de dissémination et de transmission les plus élevés dans notre étude pourraient s'expliquer par le titre élevé de virus que nous avons utilisé lors de l'infection des moustiques. Alors que dans leur étude, Turelle et *al.,* 1991 avaient utilisé un titre de virus faible de $10^{4,1}$ pfu/ml, nous avons après exposition des moustiques un repas de sang d'un titre $>10^{8}$pfu/ml. Cette hypothèse est surtout renforcée par le fait que dans l'étude conduit par Turelle et *al.,* 1991, la souche naturelle n'a pas été transmise après ingestion et elle a présenté des taux d'infection (40%) et de dissémination (2%) comparable à ceux de la MP-12 (41% d'infection et 2% de dissémination). Une autre explication pourrait être la meilleure compétence d'espèces de moustiques que nous avons utilisées.

Ces résultats sont cependant en contradiction avec ceux d'une étude récente qui ont démontré l'incapacité de 4 espèces de moustiques à transmettre la souche MP-12 après leur gorgement sur des moutons vaccinés avec la souche de même qu'après gorgement artificiel sur un repas de sang contenant 10^5 pfu/ml de la souche vaccinale. Si l'absence de virémie chez les moutons vaccinés, pourrait expliquer ces différences, seules la différence des espèces de moustiques utilisées expliquerait les contradictions observées avec le gorgement artificiel. *Ae. aegypti* tout comme *Ae. triseriatus* ne sont pas connus comme de bons vecteurs de FVR. Il en est de même pour *Cx. quinquefasciatus* qui n'a pas été très compétent dans nos études tout comme dans les études menées sur des populations des USA ayant montré un taux de

dissémination et de transmission inférieur respectivement de 20 et 1 % (Turrell *et al.*, 2007 ; Turrell *et al.*, 2008 ; Turrell *et al.*, 2010). Quant à *Cx. tritaeniorhynchus*, ce n'est que récemment qu'on l'a trouvé infesté au virus FVR pour la première fois dans la nature. Sa compétence reste à confirmer.

Il a été noté une baisse progressive du taux d'infection de J_3 à $J_{21.}$ Les taux élevés de 100% à J3 et J7 pourrait être expliqué par une longue conservation du virus à l'état libre dans l'intestin moyen du moustique. Durant cette période, les taux d'infection en cumulent dans les moustiques réellement infectés c'est à dire chez qui la réplication du virus vaccinal a commencé dans leurs cellules et des moustiques non infectés mais chez qui le virus vaccinal ingéré lors du repas de sang est resté stable . La souche vaccinale est connue pour sa stabilité à plusieurs jours à 4 °C.

Concernant la transmission, la baisse des taux de transmission peut être liés à un défaut de salivation des moustiques suite à une destruction massive des cellules des glandes salivaires après une surinfection.

II.5. Conclusion

Pour conclure, cette étude est importante dans la mesure où elle apporte des éléments nouveaux sur la capacité des vecteurs soupçonnés à transmettre le virus de la fièvre de la vallée du Rift ainsi que la souche vaccinale (MP-12) non seulement au Sénégal où la compétence vectorielle des espèces des vecteurs soupçonnés n'a jamais été prouvée mais aussi en Afrique de l'Ouest. En plus, *Aedes vexans* est compétent vis- à-vis de la MP-12.

Dans notre étude, nous pouvons dire que toutes les trois espèces sont des vecteurs compétents du VFVR et que la souche humaine (SH172805) est plus virulente que celle d'origine animale (AnD133719) ou d'arthropode (ArD141967).

Cette étude devrait ainsi être élargie à toutes les espèces trouvés associées au virus de la FVR au Sénégal notamment *Ae. ochraceus, Aedes dalzieli, Ae. fowleri, Ma. uniformis* et *Ma. africana.*

Pour l'ensemble des populations de moustiques susmentionnées, l'étude de leur implication dans le maintien du virus de la FVR dans la nature serait également d'un très grand intérêt dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie.

PARTIE 3

Etude du rôle des moustiques dans les cycles de maintien du virus de la Fièvre de la Vallée Rift.

III.1 Introduction

Dans le processus de maintien des arbovirus, le rôle des vecteurs par la transmission verticale est souvent évoqué. Cette transmission verticale des arbovirus chez les moustiques a été prouvée expérimentalement pour la première fois par Marchoux et Simond, 1905 avec le virus de la Fièvre jaune. Elle est aujourd'hui reconnue chez de nombreux groupes d'arbovirus notamment chez les *Alphavirus,* les *Flavivirus,* les *Bunyavirus* et les *Phlebovirus*. Il existe de façon habituelle pour tout un ensemble d'arbovirus du groupe California, chez leurs vecteurs naturels, constitués par des espèces culicidiennes proches (Rhodain et Hannoun, 1979). Chez les Phlébotomes infectés par des *Bunyaviridae* du genre *Phlebovirus,* la transmission verticale est habituelle avec un taux très élevé, souvent supérieur à 25% de la descendance (Rhodain, 1998). Les femelles d'*Aedes aegypti* sont capables de transmettre le virus de la fièvre jaune (Fontenille et *al,* 1997) et de la dengue à leur descendance. La transmission verticale permettrait le maintien naturel des arbovirus pendant les périodes défavorables (mauvaises conditions climatiques, faible densité vectorielle...). Les moustiques seraient ainsi vecteurs et réservoirs. Cette importance épidémiologique explique les nombreuses études consacrées à la transmission verticale des arbovirus chez les moustiques.

Pour le virus FVR, la transmission verticale, a été démontrée expérimentalement (Turell *et al.,* 1990). Elle a également été mise en évidence dans la nature en Afrique de l'Est par

l'isolement du VFVR chez des mâles et des femelles *Aedes mcintoshi*, n'ayant jamais pris de repas sanguin puisque obtenus à partir de larves colectées dans des dépressions artificiellement inondées au Kenya (Linthicum et *al.,* 1985 ; Romoser et *al.,* 2011).

Ces études, si elles ont permis la mise en évidence de ce phénomène chez de nombreux arbovirus, n'ont toutefois pas permis d'élucider le mécanisme d'une telle transmission et les facteurs qui le contrôlent. Également, la rareté de ce phénomène dans la nature rend problématique la compréhension et la prise en compte. Ce mode de transmission mérite aujourd'hui des études approfondies en ce sens que les mécanismes par lesquels il a lieu sont mal connus. Au Sénégal non seulement ce phénomène n'a pas été mis en évidence dans la nature, mais aussi aucune étude expérimentales n'a été conduite pour appréhender le role des vecteurs dans ce processus.

Notre objectif a été donc, dans de cette présente étude, de mettre en évidence la transmission verticale afin de combler ce gap.

III.2 Matériels et Méthodes

III.2.1. Moustique et souche virale utilisés

À la lumière des résulats obtenus sur les tests de compétence vectorielle, c'est la souches **SH172805** d'origine humaine et Est africaine, la seule transmise par toutes les espèces de moustiques testés qui a été utilisée. Sachant que ce processus est plus communs aux espèces de moustiques du genre *Aedes* qui ont des œufs résistants à la déssication, *Ae. vexans* a été sélectionné.

III.2.2. Procédure expérimentale

Des femelles à jeûn de la génération F0 âgées de 3 à 5 jours ont été infectées expérimentalement par la souche SH172805 à raison de 30-40 spécimens par pot, sur membrane (Peau de souris) suivant la méthode de Rutledge et *al.,* (1964). Après exposition du repas artificiel ou mixte constitué d'un tiers (1/3) d'hématies lavés au PBS 1X, 1/3 de la suspension virale et 1/3 d'un mélange de sérum de veau fœtal, d'ATP à 0.005M et d'une solution de sucre à 10%), les moustiques sont anesthésiés au froid et triés en fonction de leur état de réplétion. Seulement, les moustiques gorgés à réplétion ont été conservés et nourris uniquement avec une solution de jus sucré à 10%, ont été incubés à 27±1°C avec une humidité relative de 75-80% et une photo-périodicité de 12:12. A la fin de l'expérience, le

sang restant dans les gorgeurs est récupéré dans un tube puis conservé à -80°C pour une détermination du titre du virus contenu dans le repas virémique après exposition.

Pour l'étude de la transmission verticale, la souche SH72805 qui a été la seule à être transmise dans les tests de compétence vectorielle a été utilisée pour infecter les moustiques. Les procédures d'infection ont été les mêmes que celles décrites dans le chapitre précédent et a utilisé le système de gorgement artificiel. Après exposition au repas infectieux, les moustiques gorgés ont été anesthésiés, mis dans des pots d'élevage et incubés à 27±1°C et 75-80% d'humidité relative et une photo-périodicité de 12:12. Ils ont été admis à prendre des repas de sang non infectieux après chaque ponte. Après 20 jours d'incubation extrinsèque et au moins deux cycles de ponte, les moustiques survivants durant la période d'incubation et qui ont été récupérés puis conservés à -80°C sont testés pour leur infection. Les œufs recueillis à chaque cycle de ponte ont été mis en eau séparément pour permettre leur éclosion.

Après émergence, les adultes sont élevés dans les mêmes conditions environnementales que leurs parents et testés à variables périodes d'incubation (de J_0 à J_{15}) afin de déterminer leur taux d'infection. Les tests de détection du VFVR ont été réalisés chez les parents femelles tout comme chez leur progéniture par RT-PCR suivant la méthode décrite dans le **chapitre 2**. Nous avons répété l'expérience deux fois pour confirmer les résultats.

III.3. Résultats

Pour la première expérience, nous avons 34 *Aedes vexans* positives sur les 44 exposés soit 77,28% des parents femelles infectés. En revanche tous les moustiques adultes néonates de la génération F1 (530 spécimens dont 330 mâles et 200 femelles) issus des 3 cycles gonotrophiques (30, 260, 240 individus respectivement au premier, deuxième et troisième cycle), de ponte des femelles infectées au virus FVR ont été négatifs quelque soit leur temps de survie après émergence (**Tableau 5**). Cette transmission verticale n'a pas également été mise en évidence chez les 120 individus F1 (60 mâles et 60 femelles) testés de la deuxième expérience alors que 100% des parents étaient infectés au virus. FVR (**Tableau 6**).

Tableau 5 : Taux d'infection de la génération F0 et F1 d'Ae. vexans infection par la souche SH172805

Cycle Gonotrophique	Nombre de spécimens positif /Nombre de spécimens testés							
	JPE_0		JPE_5		JPE_{10}		JPE_{15}	
	M	F	M	F	M	F	M	F
1				0/10			0/10	0/10
2	0/20	0/20	0/30	0/30	0/20	0/50	0/10	0/80
3	0/10	0/10	0/20	0/20	0/40	0/20	0/10	0/110

M : Mâles ; F : Femelles ; JPE : Jour après émergence.
34 *Ae. vexans* F0 positives/44 (77,28%) à la souche SH172805

Tableau 6 : Taux d'infection de la génération F0 et F1 d'Ae. vexans infection par la souche SH172805

Cycle Gonotrophique	Nombre de spécimens positifs /Nombre de spécimens testés											
	JPE_5		JPE_6		JPE_7		JPE_8		JPE_9		JPE_{10}	
1	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

M : Mâles ; F : Femelles ; JPE : Jour après émergence.
25 *Ae. vexans* F0 positives/25 (100%) à la souche SH172805

III.4 Discussion

Sur les 10 mâles et les 20 femelles du premier cycle gonotrophique, les 80 mâles et 180 femelles du second cycle et les 80 mâles et 180 femelles du troisième cycle gonotrophique de J_0 à J_{15} de la première génération (F1) de la première expérience ainsi que les 30 mâles et 30 femelles du premier cycle gonotrophique et les 30 mâles et 30 femelles du second cycle gonotrophique de J_5 à J_{10} de la première génération (F1) de la deuxième expérience, nous n'avons trouvé aucun VFVR de toute cette descendance le taux d'infection élevé (77,28% et 100% respectivement) des parents (génération F0). Ceci est cohérent avec les résultats de plusieurs études antérieures qui n'ont également pas réussi à prouver expérimentalement la transmission verticale du VFVR en laboratoire (McIntosh *et al.*, 1980 ; Jupp et Cornel, 1988 ; Turell et *al.*, 1988b). Cependant, l'isolement du VFVR à la fois au niveau des mâles et des femelles d'*Ae. mcintoshi* [rapporté comme *Aedes lineatopennis* (Ludlow)] après élevage de

larves collectées sur le terrain (Linthicum et *al.*, 1985) a clairement démontré que la transmission verticale du virus peut se produire dans des conditions naturelles.

PARTIE 4

Etude de l’impact de l’infection sur la longévité des vecteurs

IV.1. Introduction

Bien que traditionnellement, les arbovirus ne soient pas jugés nocifs pour leur vecteur, l’infection de ces derniers n’est pas sans conséquence sur la physiologie, la morphologie et comportement biologique du vecteur. Sous ce registre, il a été constaté que l'infection par le virus Semliki-forest pouvait aboutir à la dégénérescence des glandes salivaires chez *Aedes aegypti* (Mims et *al.* 1966). En outre, des changements morphologiques dans les glandes salivaires, tels que la prolifération et l'agglutination du réticulum endoplasmique lisse, une vaste formation de vésicules, et une distension du réticulum endoplasmique rugueux, ont été rapportés pour les moustiques infectés par différents arbovirus (Copeland, 1981 ; Whitfield et *al.*, 1973).

Il a également été démontré que les arbovirus ont des effets physiologiques néfastes sur les moustiques. Une diminution de la capacité de gorgement a été décrite chez *Ae. triseriatus* infectés oralement par le virus de La Crosse (Grimstad et *al.*, 1980) et *Culex pipiens* infectés par le virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR) (Turell et *al.*, 1985). Une diminution de la fécondité a été rapportée chez *Cx. pipiens* infectés par le virus de la FVR (Turell et *al.*, 1985) et, éventuellement, chez *Ae. albopictus* infectées soit avec San Angelo ou Kunjin (Tesh, 1980). Plusieurs enquêtes ont montré que les larves provenant de l’infection transovarienne nécessitent plus de temps pour se développer au stade de nymphe que les autres non infectées (Tesh, 1980 ; Turell et *al.*, 1982).

Un travail considérable sur les effets de l’infection des arbovirus sur des moustiques adultes, a montré un effet délétère sur la longévité ou la fécondité des femelles [par exemple,

le virus FVR sur *Culex pipiens* L. (Faran et *al.*, 1987), le virus de l'encéphalomyélite équine de l'Est sur *Culiseta melanura* (Coquillet) (Scott et Lorenz, 1998), le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest ou le virus du Nil occidental sur le *Culex tarsalis* (Coquillet) (Weaver *et al.*, 1992 ; Lee et *al.*, 2000 ; Mahmood et *al.*, 2004 ; Styer et *al.*, 2007), et le virus Sindbis sur *Ae. albopictus* (Bowers et *al.*, 2003).

Comme d'autres arbovirus, le virus FVR est capable d'envahir le cerveau du moustique, ce qui peut modifier la physiologie du moustique, le métabolisme et le comportement, et par conséquent changer la capacité vectorielle et le profil de la transmission de la maladie (Luz et *al.*, 2011 ; Platt et *al.*, 1997).

Dans cette présente étude, nous avons examiné l'effet de l'infection au VFVR sur la survie des femelles adultes de *Cx. poicilipes*, de *Cx. quinquefasciatus* et d'*Ae. vexans* du Sénégal.

IV.2. Matériels et Méthodes

IV.2.1. Moustiques

Les espèces des mêmes populations de moustiques qui ont servi dans les études précédentes et collectées dans la localité de Barkedji (15° 17' N et 14° 53'W) ont été utilisées.

IV.2.2. Les souches virales

Pour les mêmes raisons évoquées dans l'expérience de transmission verticale nous avons utilisés la souche humaine **SH172805** provenant du sérum d'un homme malade de la Mauritanie en 2003 et a subi 3 passages sur cellules Vero pour les infections expérimentales. Nous rappelons que cette souche a été la seule à être transmise par les différentes espèces de moustiques. Notre stock viral a été produit par inoculation intra cérébrale de souriceaux nouveaux- nés âgés d'un à deux jours de 20µl de la suspension virale puis on les observe pour récupérer les malades au bout d'un ou deux jours. Leurs cerveau est ensuite récupéré, puis broyé dans du L-15 (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) contenant de la pénicilline, streptomycine (Sigma, GmBh, Germany) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) afin d'avoir une suspension prête qu'on garde à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.2.3. Infection Orale des Moustiques

Les infections ont été réalisées ici aussi en suivant les mêmes procédures décrites ci-dessus. Seulement dans le cas précis de cette expérimentation, les moustiques sont divisés en 2 groupes. Un des groupes a été exposé au repas infectieux et le second groupe exposé à un repas constitué suivant la même composition que le repas infectieux mais sans le virus. Ici le virus remplacé par le milieu L-15. Ce dernier groupe a servi de contrôle.

Après 1 heure d'exposition, les moustiques ont été anesthésiés au froid et triés en fonction de leur état de réplétion. Seulement les moustiques entièrement gorgés ont été conservés et nourris uniquement avec une solution de jus sucré à 10%. Ils ont été incubés à 27±1°C avec une humidité relative de 75-80% et une photo-périodicité de 12:12.

IV.2.4. Traitement des moustiques après exposition

Les moustiques exposés au virus et les contrôles sont suivis quotidiennement matin et soir. Les moustiques morts (exposés) sont récupérés puis mis individuellement dans des tubes eppendorf avec toutes les informations nécessaires (numéro, jours d'incubation, la date de mort, espèce…) conservé ensuite en -80°C jusqu'au test. Concernant les contrôles, ils sont jetés après récupération et prise de note des informations sur numéro, jours d'incubation, la date, espèce…

Les tests de détection du virus FVR ont été réalisés sur chaque spécimen par RT-PCR à temps réel suivant le protocole décrit ci-dessus.

IV.2.5. Analyse des résultats

Nous avons utilisé le modèle de cox (*Cox proportional hazard regression models*) pour mesurer l'effet de l'exposition et de l'infection sur la survie.

Le modèle de Wilcoxon a également été utilisé pour tester la différence entre les courbes de survie des différents groupes. Ce test compare la moyenne des durées de vie entre groupe. Les courbes de survie ont été tracées singulièrement pour les 3 différentes catégories de moustiques obtenus. i) Les moustiques Exposés Infectés (EI) qui correspondent au groupe de moustiques qui ont pris un repas infectieux et qui se sont révélés positifs au test RT-PCR, ii) Les moustiques Exposés Non Infectés (ENI) qui correspondent au groupe de moustiques qui ont pris un repas infectieux mais qui se sont révélés négatifs au test RT-PCR. iii) Les

moustiques Non Exposés (NE) qui correspondent au groupe de moustiques qui ont pris un repas de sang dépourvu de virus (repas controle).

IV.3. Résultats

Aucune différence significative n'est observée entre (EI, ENI, et NE) pour *Aedes vexans* (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Comparaison statistiques des taux de survie des moustiques infectés et non infectés au virus FVR.

Espèces		**coef**	**OR**	**se(coef)**	**z**	**Pr(>|z|)**
Aedes vexans	**EI**	-0.2375	0.7886	0.1664	-1.427	0.153
	ENI	-0.1352	0.8735	0.5895	-0.229	0.819
Cx. quinquefasciatus	**EI**	-0,32	0,72	0,42	-0,77	0,44
	ENI	-0,36	0,70	0,22	-1,68	0,09
Cx. poicilipes	**EI**	0,12	1,13	0,25	0,48	0,63
	ENI	0,05	1,05	0,40	0,12	0,90

OR : Odds ratio ; EI : Exposé Infectés, ENI : Exposé Non Infecté

Si on compare les exposés infectés (EI) et les exposés non infectés (ENI), nous pouvons dire que la mortalité est précoce pour les EI dès le 3^{ième} jour et se poursuit jusqu'au 29^{ième} où on n'a enregistré le dernier survivant alors que pour les ENI la mortalité n'est survenue qu'au 12^{ième} jour jusque seulement au 23$^{ième.}$. Donc nous pouvons dire ici que, malgré une différence non significative les EI survivent plus longtemps que les ENI. Concernant les NE (non exposés), ils ont une durée de vie plus longue que les exposés (**Figure 25**).

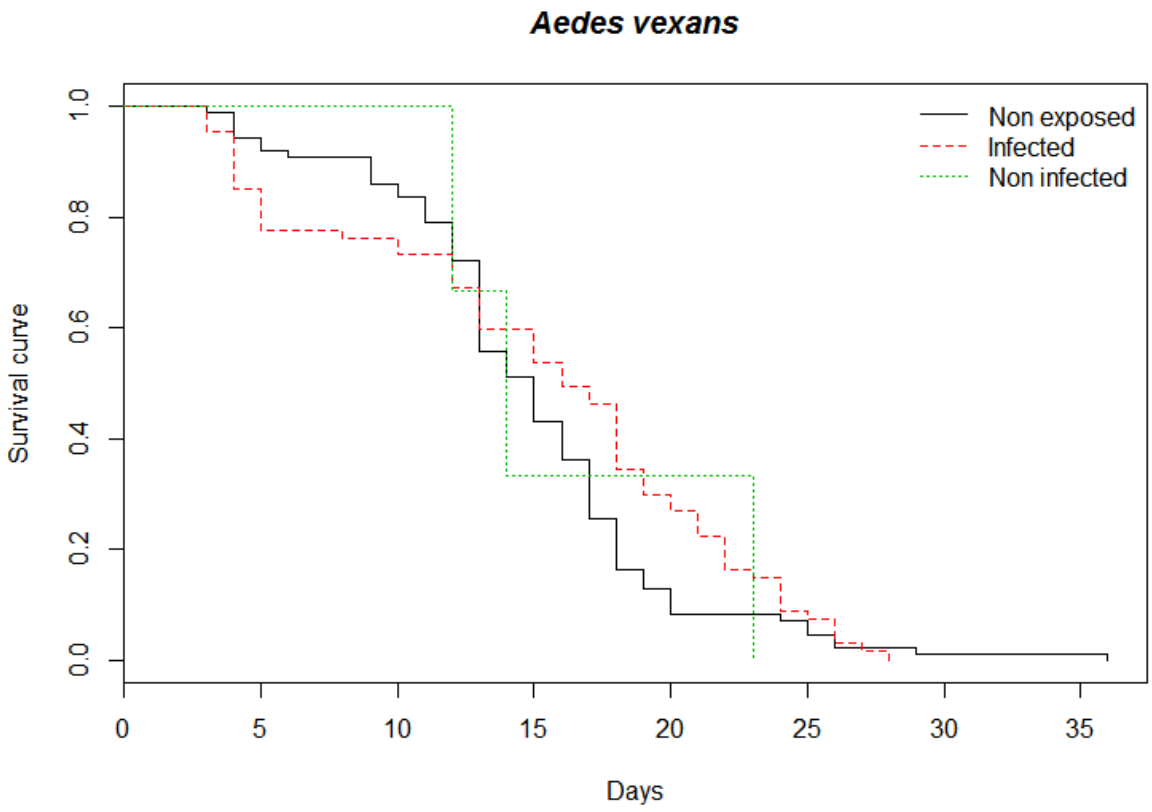

Figure 25 : évolution journalière du taux de survie après exposition d'*Aedes vexans* (avec du sang infection et non infecté) entre Infectés et Non Infectés.

Chez *Cx. quinquefasciatus*, la tendance a été à peu près la même pour ENI, EI et NE (**Tableau 7**).

Pour EI au jour 1 il y a eu 8% de mort alors qu'on était à 2%, 0 mort respectivement pour ENI et NE au même jour. Par la suite, aucun mort n'a été enregistré jusqu'au 20^{ième}, 29^{ième} et 30^{ième} jour respectivement pour ENI, EI et NE. En terme de longévité les ENI ont survécu plus longtemps (71 jours) que NE (56 jours) et ENI (62 jours) (**Figure 26**).

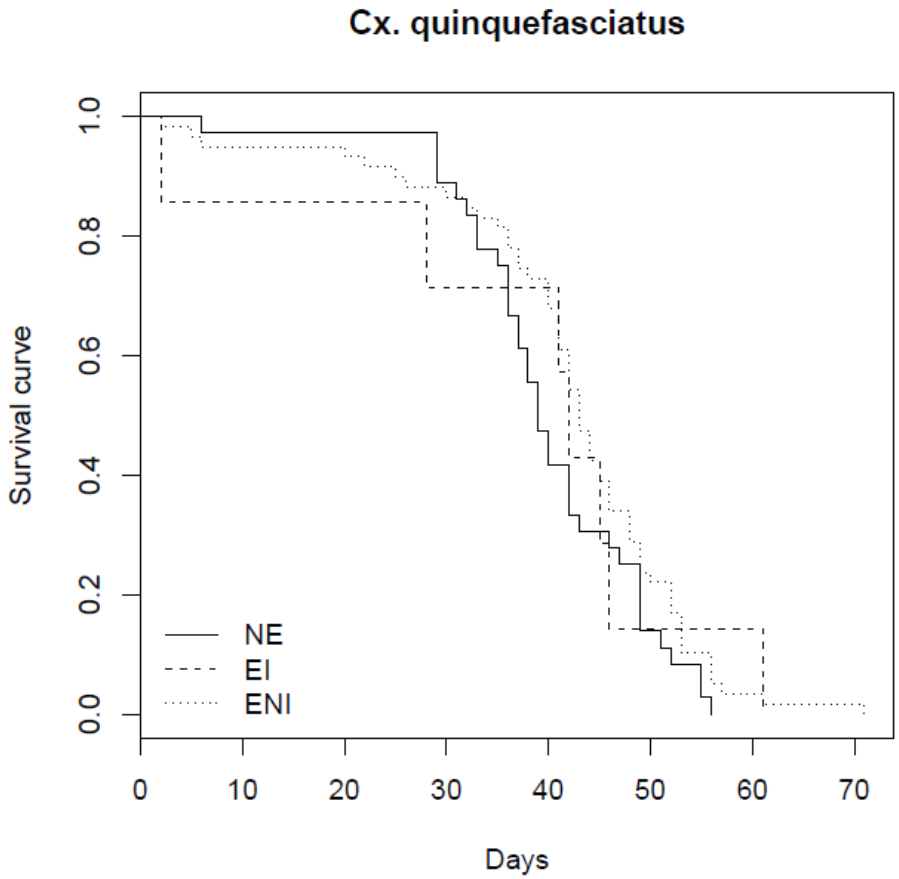

Figure 26 : évolution journalière du taux de survie après exposition de *Culex quinquefasciatus* (avec du sang infection et non infecté) entre Non exposés, Exposés Infectés et Exposés Non Infectés

Concernant *Cx. poicilipes*, la tendance a été la même pour EI et NE. (**Tableau 7**).

En revanche les ENI n'ont enregistré aucune mortalité jusqu'au 15^{ième} jour. Leur mortalité a été moins accentuée que celle des EI et NE jusqu'au 22^{ième} jour (**Figure 27**). Ici les EI ont une durée de vie plus longue (37 jours) que les NE (34 jours) et ENI (27 jours).

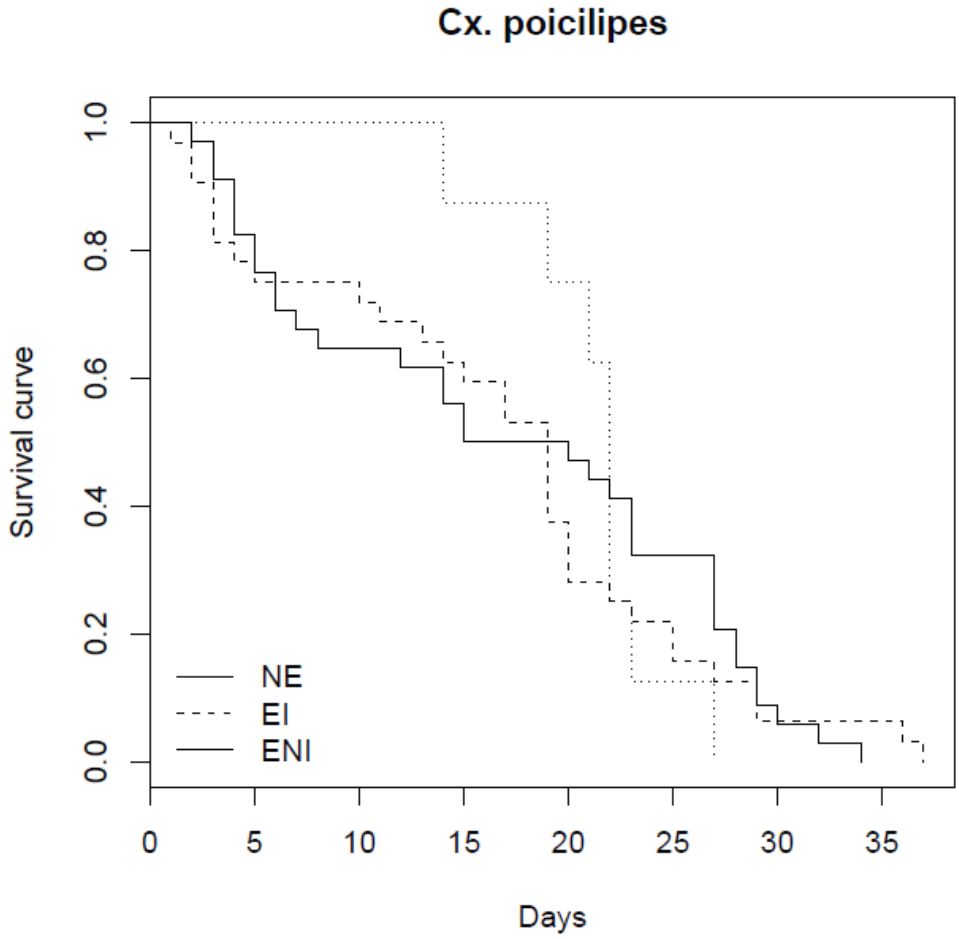

Figure 27 : évolution journalière du taux de survie après exposition de *Culex poicilipes* (avec du sang infection et non infecté) entre Non exposés, Exposés Infectés et Exposés Non Infectés

Globalement nous pouvons dire que les *Cx. quinquefasciatus* ont une durée de vie plus importante (environ 55 à 75 jours pour les EI, ENI et NE) que *Ae. vexans* (environ 23 à 40 jours pour les EI, ENI et NE) et *Cx. poicilipes* (environ 25 à 40 jours pour les EI, ENI et NE)

IV.4. Discussion

Le taux de mortalité quotidien de moustiques est une composante importante de la capacité vectorielle (Garrett-Jones 1964 ; Dye 1992 ; Luz et *al.*, 2003). Les vecteurs qui deviennent infectés après un repas de sang, mais qui ne parviennent pas à survivre pour piquer un autre hôte réduisent le potentiel de transmission de la population. Si la capacité vectorielle est évaluée sur la base des taux d'infection des moustiques, des changements dans le taux de

mortalité des moustiques influencent directement la transmission de l'agent pathogène. Dans notre étude, d'après l'analyse des résultats il n'y a pas de différences significative entre (EI, ENI et NE) pour les trois vecteurs ce qui est cohérant avec certaines études qui ont montré qu'il y a peu d'effet de l'infection des arbovirus sur la performance de moustiques (Patrican et DeFoliart, 1985 ; Putman et Scott, 1995), tandis que d'autres études ont conclu que les arbovirus ont diminué la durée de vie des adultes (Scott et Lorenz, 1998 ; Moncayo et *al.,* 2000 ; Mahmood et *al.,* 2004 ; Reiskind et *al.,* 2009), la fécondité (Scott et Lorenz, 1998 ; Moncayo et *al.,* 2000 ; Styer et *al.,* 2007a ; Styer et *al.,* 2007c), et l'activité de vol (Lee et *al.,* 2000) et peuvent modifier le comportement d'alimentation (Grimstad et *al.,* 1980 ; Platt et *al.,* 1997).

La sensibilité des arbovirus à de petits changements dans la longévité des adultes suggère que même un petit impact négatif de l'infection virale sur les moustiques peut être important en augmentant la mortalité des adultes chez les moustiques infectés (Dye, 1986). En effet, Anderson et May (1991) notent qu'une importante hypothèse de modèles mathématiques de parasites à transmission vectorielle est une absence d'effet sur le vecteur, et que cette hypothèse, si défendue, peut avoir des implications importantes dans la propagation de la maladie. Malgré la différence qui n'est pas significative entre les EI, ENI et les NE on a constaté que pour les *Ae. vexans,* le virus VFR diminue le taux de survie des moustiques ce qui est confirmé par d'autres études avec *Cx. pipiens* dont le VFVR diminuerait le temps moyen de mortalité de 25% (Faran et *al.*, 1987). Il en est de même pour *Cx. quinquefasciatus* qui a un taux de survie diminué par l'infection au virus. Ces résultats corroborent avec ceux de Faran et *al.*, 1987 d'autant plus que *Cx. quinquefasciatus* (Afrique de l'Ouest) est équivalent de *Cx. pipiens* (Afrique de l'Est). En ce qui concerne *Cx. poicilipes* on peut dire ici que le virus a peu d'effet sur cette espèce puisqu'il n'y a que 3 jours d'écarts entre les EI et les NE. Mais ce décalage n'est pas suffisant pour conclure à une augmentation induite par l'infection au VFVR sur le taux de survie des moustiques.

Le rôle des moustiques dans les cycles de maintien du virus de la fièvre de la vallée du Rift demeure un mystère puisque jusqu'ici l'espèce qu'on a testé (*Aedes vexans*) n'a pas pu transmettre verticalement le virus. Ce qui fait que le maintien du virus de la FVR demeure un mystère aussi bien au niveau des animaux que chez les arthropodes. Ce virus influence la longévité des vecteurs de façon négative chez les *Aedes vexans* et les *Cx. quinquefasciatus* mais positivement chez les *Cx. poicilipes*.

Il serait intéressant de continuer l'étude aussi bien du rôle des autres vecteurs supposés tels que *Aedes fowleri, Aedes ochraceus, Aedes dalzieli* et *Mansonia uniformis* dans le maintien du virus de la FVR que celui de l'impact de ce virus sur leur longévité.

PARTIE 5

Biodiversité des arbovirus et leurs vecteurs à Barkedji

V.1 Introduction

Au Sénégal, un programme d'étude de la fièvre de la vallée du rift (FVR) avait été mis en place depuis 1990 suite à l'épidémie de 1987 dans la région du Ferlo. Des enquêtes entomologiques régulières ont été réalisées dans cette zone sylvo-pastorale à Barkédji.

Entre 1990 et 1998, les études conduites étaient essentiellement axées sur la bio-écologie des moustiques vecteurs mais étaient limitées aux mares temporaires et dans une moindre mesure dans l'habitat domestique ignorant complètement les autres espaces fréquentés par les vertébrés hôtes du virus. Ces études ont également été menées sur une base mensuelle, ce qui peut avoir sous-estimé les fluctuations temporelles des populations de moustiques et ont été principalement limitées à *Cx. poicilipes* et *Ae. vexans* (Fontenille et *al.*, 1998 ; Traore-Lamizana et *al.*, 2001).

En 2002 - 2003, une étude de l'activité dispersive des deux principaux vecteurs de la FVR (*Ae. vexans* et *Cx. poicilipes*) au Sénégal a été menée. Ces études ont permis outre les aspects relatifs à la dynamique physique et physiologique des vecteurs d'appréhender les mouvements des moustiques qui ont eu lieu dans des distances limitées (Ba et *al.*, 2005 ; Ba et *al.*, 2012).

Ce programme a abouti à l'identification de toutes ces espèces d'arbovirus énumérées ci-dessous, les vecteurs de virus de la FVR (FVR) et la description du cycle enzootique de celui-ci. Plusieurs virus ont été isolés dont les virus de la fièvre de la vallée du Rift, de la Forêt de

Semliki, Babanki, Bagaza, Usutu, Yaounde, West Nile, Koutango, Bunyamwera et Ngari, Sanar. Concernant la FVR, deux amplifications du cycle enzootique ont été observées en 1993 et 2002-2003.

Cependant l'identification et la description des arbovirus circulant dans la région sont probablement encore incomplètes. Par ailleurs, aussi bien pour le VFVR que pour tous les autres virus les derniers isolements dans cette zone remontent à cette période malgré un effort soutenu de surveillance. En effet, entre 2005 et 2008 un important programme d'étude a été conduit dans la zone dans l'optique d'examiner la répartition spatio-temporelle des vecteurs de RVFV dans différents micro et macrohabitats, et l'identification des habitats à risque les plus élevés de la transmission. Cette étude n'a pas cependant permis de détecter une circulation de virus.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette situation dont des conditions environnementales très peu favorables, une approche d'étude plus ou moins adaptée. Jusque-là, l'apport de nouvelles méthodes d'échantillonnage et de diagnostique viral dans la surveillance de l'activité des virus chez les moustiques n'a pas été testée. En outre, il manque encore des données sur les activités spatiales des arbovirus (Canopée par rapport au sol et mares par rapport villages).

Quoi qu'il en soit cette situation est très évocatrice de notre ignorance des mécanismes d'émergence et témoigne de la nécessité de disposer d'un programme de surveillance continue de ces arbovirus. Ainsi, en dehors de ces études expérimentales, nous sommes également investi à la recherche du virus de la fièvre de la vallée du Rift et des autres arbovirus, dans la nature. Nous présentons dans ce document les résultats obtenus suite à deux années de prospections réalisés en 2012 et 2013 à l'aide de plusieurs types de pièges et d'appâts toutes les deux semaines dans 23 mares et 22 villages.

V.2 Matériels et méthodes

V.2.1 Zone d'étude

L'étude a été menée dans la région du Ferlo du Sénégal dans une zone située autour du village Barkedji (14 °53 '0 "N, 15°55' 0" W) à partir de fin Juillet à fin Décembre 2012 et 2013. Cette zone (**Figure 28**) est caractérisée principalement par une savane arbustive, un climat chaud et sec avec une saison sèche longue et sévère et courte saison des pluies (Juin /

Juillet à Septembre / Octobre). La pluviométrie annuelle est varriable et comprise entre 256,5 et 739,2 mm. Les températures élevées ont généralement été enregistrées au cours du mois d'Octobre (45°C) et les basses températures au cours du mois de Décembre (13°C). Un réseau de mares temporaires de différentes tailles est inondé par les premières pluies. Les petites dépressions sont inondées et vidées après chaque pluie alors que les grandes sont inondées au début de la saison des pluies et persistent pendant une longue période.

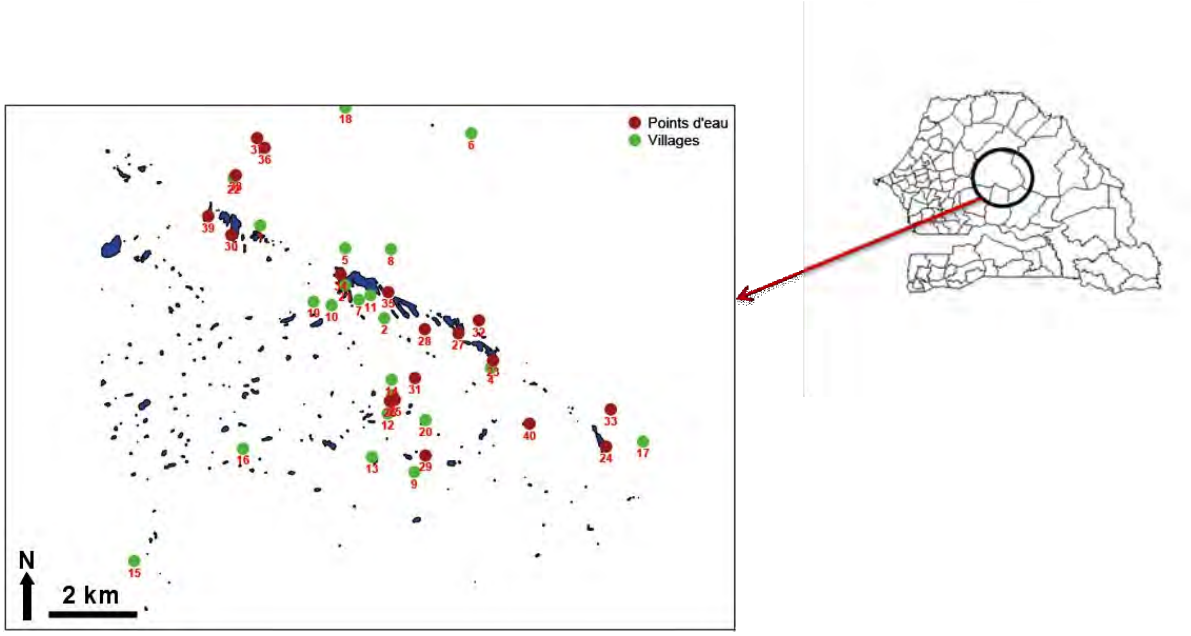

Figure 28 : Les différents sites d'échantillonnage dans les localités de Barkedji

Nos collectes de vecteurs concernant les mares ont été réalisées sur un réseau de 22 mares mais trois d'entre elles ont été régulièrement échantillonnées toutes les quinzaines durant ces 2 ans. Il s'agit de la mare de Niakha située à (14° 53' 56''.17 W et 15° 17' 50''.02 N), la mare de Kangaledji située à (14° 50' 38''.46 W et 15° 16' 23''.42 N) et la mare de Fourdou (14° 51' 59''.2 W et 15° 15' 31''.7 N) (**Figures 29, 30 et 31**) qui entourent le village de Barkedji. Ces mares sont colonisées par une importante végétation hydrophyte constituée d'arbres uniformément repartis sur toute la surface de la mare. En plus de ces arbres, nous avons les typhas, les Pistias et les algues qui se mettent en place progressivement pour occuper toute la surface de la mare la rendant verdâtre vers la fin de la saison pluvieuse. Elle est une zone d'émergence du VFVR où se développent plusieurs espèces de moustiques qui ont été trouvées infectées par ce virus. Ces mares sont les principales sources d'eau pour les éleveurs et leur bétail dans cette période. Ces mares sont aussi les habitats naturels de nombreuses espèces de vertébrés (oiseaux, reptiles et rongeurs) et les moustiques vecteurs

d’arbovirus. Chevaux et ânes sert pour le transport et la traction animale. Ils divaguent autour des mares dans l'après-midi et le soir une fois relâchés après les travaux quotidiennes. La Zone est recouverte d'un riche tapis herbacé utilisé par les populations locales et nomades pendant la saison des pluies pour le pâturage. Les principales activités de la population sont la culture du mil et l’élèvage du bétail. Les groupes familiaux et leurs troupeaux peuvent devenir nomades saisonniers, déménager temporairement pendant quelques mois au cours de laquelle ils utilisent des paillotes pour s’abriter. Barkédji est le seul village peuplé dans la zone tandis que les autres sont situés près des mares et composées chacune de quelques huttes.

Figure 29 : Mare de Niakha au début et vers la fin de l’hivernage (Juillet et octobre 2012)

Figure 30 : Mare de Kanguelédji au début et vers la fin de l’hivernage (Juillet et octobre 2012)

Figure 31 : Mare de Fourdou au début et vers la fin de l'hivernage (Juillet et octobre 2012)

V.2.2 Collecte de Moustiques

Les moustiques ont été capturés chaque mois pendant la saison des pluies (de Juillet à Décembre) dans 23 villages et toutes les deux semaines dans 22 mares sélectionnés sur un rayon de 15 km autour de Barkedji en 2012 et 2013

Plusieurs méthodes ont été utilisées en suivant les contextes et les objectifs et selon les années les moustiques ont été capturés à l'aide de plusieurs types de pièges : des moustiquaires pièges à appât animaux (Ba et *al.*, 2006). Elles ont été utilisées pour étudier sur l'attractivité des vecteurs par les vertébrés domestiques. Elles sont conçues à l'aide de tulles moustiquaire de 2 m X 2m X 2m de dimensions. Elles sont tendues et fixées à des piquets en fer de 2 m et légèrement relevées au sol pour permettre aux moustiques femelles à la recherche d'un repas de sang d'y entrer **(Figure 32)**. Elles ont été positionnées à proximité des mares temporaires à partir de 18h avec comme appât à l'intérieur l'homme, le mouton et une chèvre. Les moustiques collectés par le piège sont récupérés le soir à 22h à l'aide d'un aspirateur.

Figure 32 : Photo de pièges moustiquaires à appât (Homme, Mouton, Chèvre).

Des pièges lumineux de type CDC avec comme attractif du CO_2 diffusé par des morceaux de glaces carboniques, ont été utilisés pour la récolte des moustiques dans l'étude de la dynamique spatio-temporelle des moustiques **(Figure 33)**. Ils ont été placés à proximité des points d'eau mais également dans des concessions au niveau des villages et mis en marche à partir de 18h puis récupérés le lendemain à 7 h.

Figure 33 : photo d'un piège CDC + CO2

En 2013, des pièges à oiseaux appâtés (Diallo *et al.*, 2010) ont été utilisés en plus des pièges à appât animaux et de pièges lumineux CDC+CO2 décrits ci-dessus.

Le piège à appât oiseau, dont un schéma et la photo sont montrés sur les **figures 34** et **35** respectivement, est une version modifiée du "*lard can trap*" (Lepore et *al.*, 2004). Il est constitué d'un cylindre central en plastique PVC de 60 cm de long sur 41 cm de diamètre. A l'intérieur du cylindre, se trouve une cage en bois de 30,5 X 30,5 X 35,6 cm fermée à ses extrémités par un grillage en fer. Le cylindre est fermé à ses 2 extrémités par des tubes cylindriques détachables de 20 cm de long sur 41 cm de diamètre chacun. Ces tubes sont fermés du côté interne par un écran en tulle moustiquaire métallique empêchant le contact entre l'appât et les moustiques capturés. Le coté externe est fermé par une moustiquaire métallique sous forme d'un cône concave percé d'un trou au fond permettant les moustiques d'entrer dans le piège. Ces derniers peuvent être récupérés à l'aide d'un aspirateur. Ils ont été disposés au niveau des mares temporaires chaque quinzaine. Chaque nuit d'échantillonnage,

les pièges sont placés de manière à avoir sur 2 points d'échantillonnage au niveau d'un même point d'eau, deux pièges à appât poulet dont un en hauteur et un au sol mais aussi 2 pièges à appât pigeon dont également un en hauteur et un au sol.

Dans le plan d'échantillonnage de 2013, les pièges lumineux CDC ont été utilisés aussi bien en canopée qu'au sol.

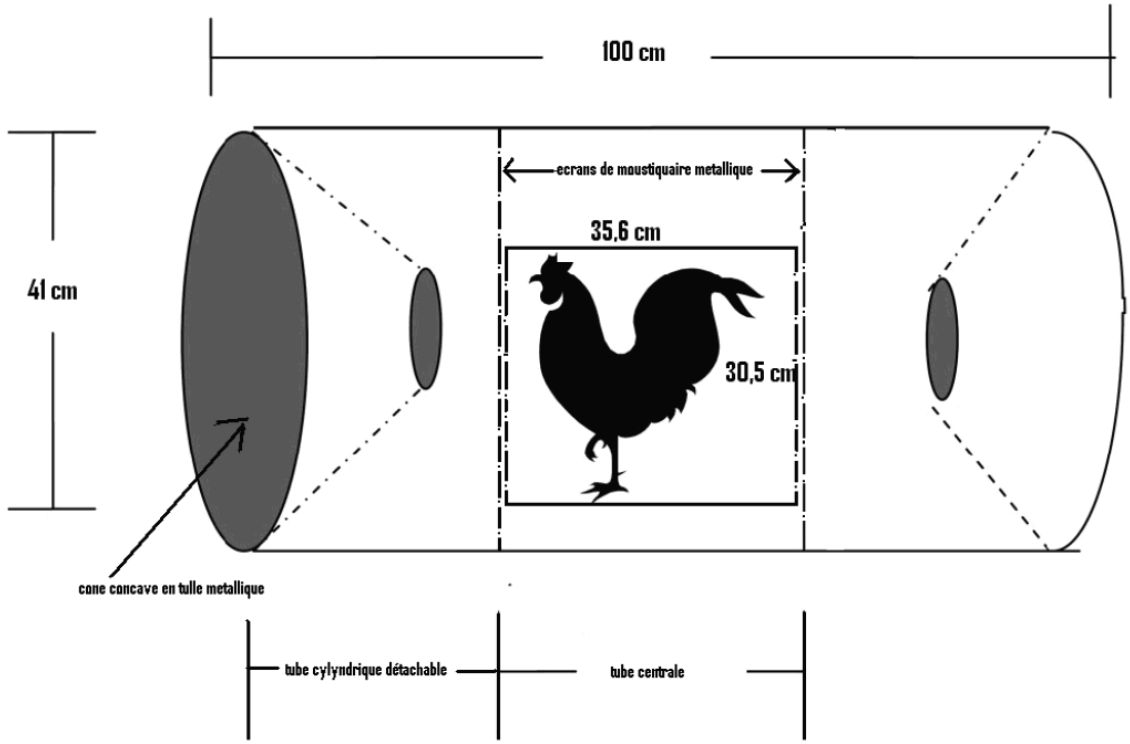

Figure 34 : schéma d'un piège à appât oiseau

Figure 35 : Photo d'un piège à appât oiseau en hautaur (en canopée)

Seules les mares ont en plus été échantillonnées chaque quinzaine. La nomenclature qui suit a été adoptée pour les différentes méthodes d'échantillonnage utilisées : les pièges lumineux CDC + de CO2 fixés au sol (CDC-S) et au niveau de la canopée (CDC-C) ; les Moustiquaires appâtées avec la chèvre (MC), Mouton (MM), et l'homme (MH) ; piège à appât animaux appâtés avec la chèvre (PAA-C), Mouton (PAA -M) et le poulet (PAA -P) ; piège à appât oiseau appâté avec des pigeons au sol (PAO-PgS) et au niveau de la canopée (PAO-PgC) et avec le poulet au sol (PAO -PS) et le niveau de la canopée (PAO -PC).

V.2.3 Traitement des moustiques collectés

V.2.3.1 Identification morphologique

Sur le terrain, les moustiques ont été tués au froid puis triés, identifiés et regroupés par espèce, sexe et date de collecte sur une table froide avec une loupe binoculaire en utilisant les clés d'identification disponibles (Diagne et *al.*, 1994 ; Edwards, 1941) **(Figure 36)**

Figure 36 : photo d'identification des moustiques par loupe binoculaire sur Table froide.

Les pools de moustiques ont été ensuite stockés dans de l'azote liquide, puis conservés au laboratoire à –80°C pour les tests de virologiques.

V.2.3.2. Détection virale sur les échantillons collectés

Plusieurs techniques ont été utilisées pour le diagniostic viral chez les moustiques.

1. La PCR Temps Réel dont la méthodologie a été d'écrite dans le chapitre 3 concernant les tests de compétence vectorielle. Le principe et la démarche sont restés les mêmes avec la précaution d'utiliser des sondes et amoreces spécifiques des virus recherchés.

2. L'isolement viral sur lignées cellulaires *Aedes pseudocutellaris* (AP61) et Vero suivant les méthdodes déjà décrites (Digoutte et *al.*, 1990). Les échantillons de moustiques ont été broyés dans 2,5 ml de milieu L15 puis centrifugés à 10.000 tours/mn pendant 20 mn et le surnageant recupéré. Le surnageant est ensuite inoculé à un tapis confluent de cellules AP61 ou Vero puis incubé à 28°C. Après 8 à 10 jours d'incubation, le culot cellulaire est récupéré et étalé sur une lame à 12 puits et séchés (la lame) à l'étuve à 37°C pour des tests d'

Immunofluorescence Indirecte. Pour les échantillons de moustiques, 7 pools d'ascites immunes de plus de 200 virus circulant dans la sous régions ont été testés les échantillons positifs sont ensuite testés contre des ascites monovalentes contenues dans chacun des pools positifs.

V.2.4 L'analyse des données

Le modèle de la distribution saisonnière des moustiques a été évalué en mesurant l'abondance absolue de moustiques considérés comme étant le nombre moyen de femelles par piège (pièges lumineux CDC) (puisque ces CDC au sol ont été les seuls à être utilisés dans tous les milieux durant les années 2012-13) par nuit. La proportion (%) de chaque vecteur de moustique par la méthode d'échantillonnage a également été calculée. Le Taux minimum d'infection (TMI ‰) correspondant au nombre de moustiques positifs pour mille moustiques testés a été calculé. Les valeurs obtenues pour les densités et taux d'infection ont été comparés par le test chi-2 ou test exact de Fisher. Le profile entre le nombre de moustiques capturés et nombre de souches virales isolées ont été comparés par le coefficient de corrélation de Pearson. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant R (Team RC, 2013).

V.3. Résultats

V.3.1 Collectes de moustiques

Un total de 42 969 moustiques (41 898 femelles) représentant 7 genres (1 *Aedomyia,* 15 *Aedes*, 7 *Anopheles*, 14 *Culex*, 2 *Mansonia*, 3 *Mimomyia* et 1 *Uranotaenia*) et 43 espèces ont été collectées **(Tableau 8)**. Les espèces prédominantes, ont été *Ae. vexans* (26,9%), *Cx. poicilipes* (18,5), *Cx. neavei* (9,8%) et *Ma. uniformis* (9,6%). L'analyse de la faune des moustiques collectés montre globalement une prédominance des principaux vecteurs au niveau des mares par rapport aux villages (**Figure 37**). Une analyse plus fine montre une importante variation spatiale des vecterus suivant les différent sites prospectés (**Figure 38**). C'est le cas d'*Aedes vexans* qui est plus abondant par rapport aux autres espèces au niveau de la mare de Niakha et le cumul des autres mares (les mares où nous n'avons pas isolé de virus qui ont été regroupées en terme d'autres mares) avec des densités respectives de 57,13 et de 68,83 specimens par piège par nuit suivi de *Culex poicilipes* avec une densité de 23,92 specimens par piège par nuit. Alors que pour la Mare de Kangaledji c'est plutôt *Culex poicilipes* qui a domine suivi de *Mansonia uniformis* avec une densité de 56,67 et de 25,9

respectivement. Concernant la mare Kangaledji 2 c'est *Culex neavei* qui domine suivi d'*Aedes vexans* dont les densités respectives sont 39,29 et 36. Quant à la mare de Fourdou, c'est *Culex poicilipes* qui domine avec une densité de 22,46.

Seules les espèces de moustiques trouvés infectés ont été prises en compte dans les analyses suivantes. Aucune espèce n'a étè prédominante dans la faune recueillie dans toutes les méthodes d'échantillonnage. Huit méthodes d'échantillonnage ont été les plus efficaces pour au moins une espèce **(Tableau 8)**. Les proportions de chaque espèce varient considérablement entre les pièges ($p < 0,0001$).

Les tendances saisonnières des femelles de moustiques collectées par piège CDC sont présentées dans le **Tableau 9.** Le plus grand nombre de femelles par piège CDC par nuit a été capturé en Novembre 2012 et Octobre 2013 pour *Cx. neavei*, Septembre 2012 et Octobre 2013 pour *Cx. poicilipes*, Juillet 2012 et Septembre 2013 pour *Cx. perfuscus*, Novembre 2012 et Septembre 2013 pour *Ma. africana*, Juillet 2012 et août 2013 pour *Cx. tritaeniorhynchus*, Juillet 2012 et Août 2013 pour *Ae. vexans* et *Ae. dalzieli*. A côté de ces espèces présentant une variation saisonnière annuelle avec globalement un pic d'activité précoce en 2012 et tardif en 2013, d'autres espèces ont gardé leur profil sur les deux années. Cela a été le cas de *Cx. antennatus* en Octobre des deux années d'*Ae. ochraceus, Ae. sudanensis, An. ziemanni* et *Ma. uniformis* en Septembre 2012 et 2013 et de *An. rufipes*, en Octobre 2012 et 2013.

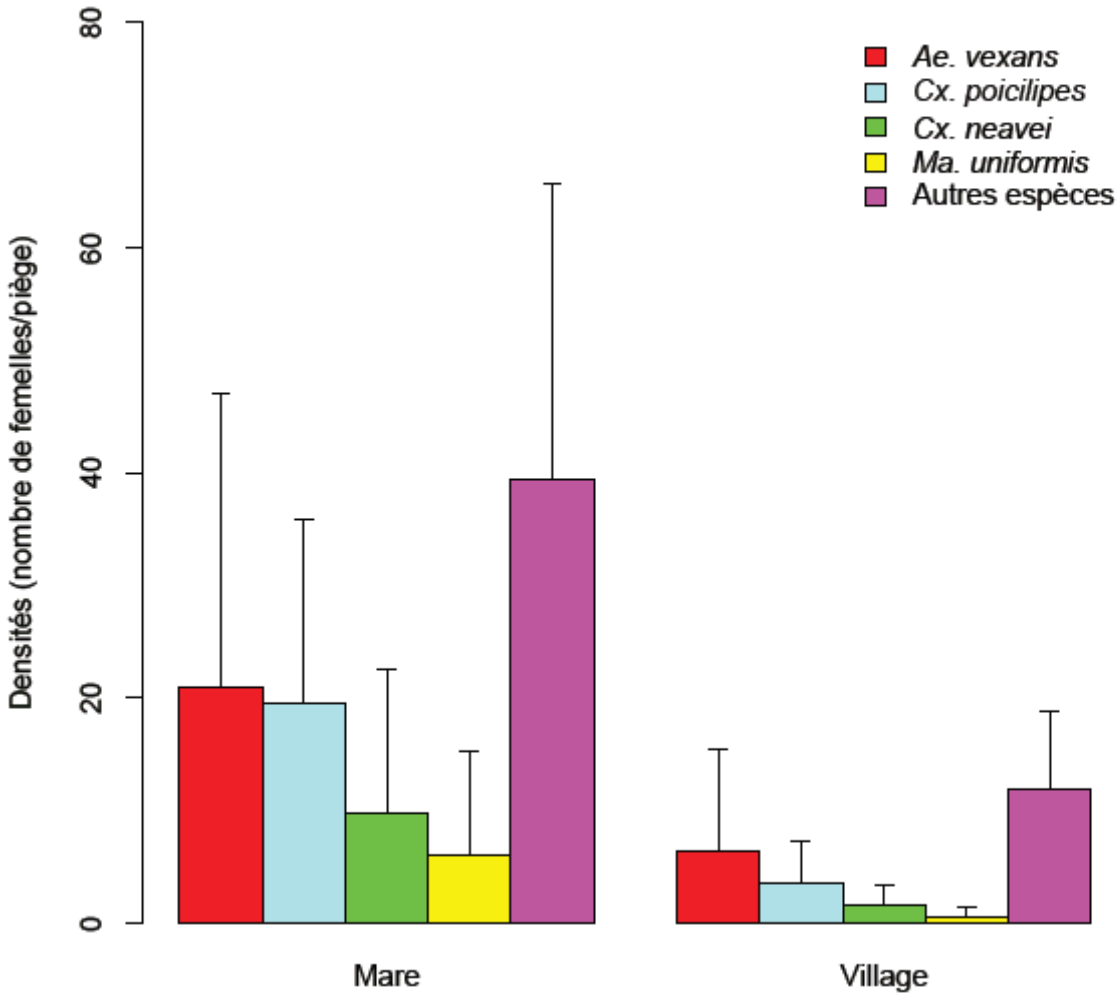

Figure 37 : Dynamique spatiale des vecteurs d'arbovirus

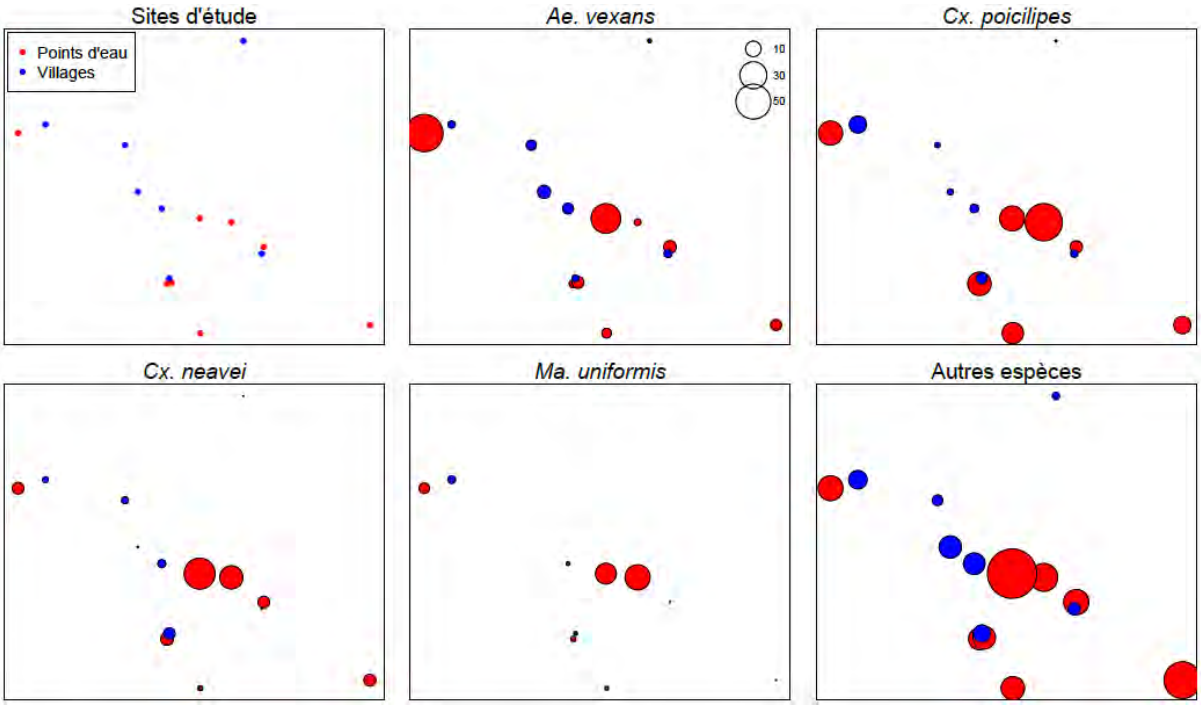

Figure 38 : Dynamique spatiale des moustiques dominants au niveau des différents sites d'échantillonnages où des isolements de virus ont été obtenus.

Tableau 8 : moustiques vecteurs collectés par les méthodes d'échantillonnage dans la zone Barkedji, 2012-2013

	CDC-G		CDC-C		M-G		M-H		M-S		ABT-G		ABT-S		ABT-C		BBT-PG		BBT-PC		BBT-CG		BBT-CC		Total	
Espèce	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Aedes dalzieli	1047	3.6	4	0.2	183	6.7	8	0.8	111	3.2	5	0.3	29	1.9									0.0		1387	3.3
Aedes ochraceus	1533	5.3	11	0.5	155	5.6	17	1.6	160	4.7	96	6.5	28	1.9	2	0.5	1	5					0.0		2003	4.8
Aedes sudanensis	560	1.9	63	3.1	39	1.4	19	1.8	15	0.4	26	1.8	40	2.7	2	0.5			1	0.4			0.0		765	1.8
Aedes vexans	10273	35.7	18	0.9	317	11.5	46	4.4	353	10.3	106	7.1	143	9.5	29	6.8							0.0		11285	26.9
Anopheles rufipes	104	0.4							2	0.1	1	0.1	4	0.3									0.0		111	0.3
Anopheles ziemanni	1038	3.6	12	0.6	420	15.3	48	4.6	830	24.2	190	12.8	95	6.3	8	1.9					1	6.3	0.0		2642	6.3
Culex antennatus	928	3.2	26	1.3	114	4.1	11	1.1	96	2.8	77	5.2	96	6.4	14	3.3			5	1.8			1	1.1	1368	3.3
Culex neavei	1626	5.6	472	22.9	343	12.5	229	22.0	233	6.8	163	11.0	272	18.1	207	48.7	5	25	165	59.1	3	18.8	44	50.0	3762	9.0
Culex perfuscus	342	1.2	56	2.7	13	0.5	4	0.4	19	0.6	21	1.4	13	0.9	6	1.4			57	20.4	1	6.3	15	17.0	547	1.3
Culex poicilipes	5041	17.5	1169	56.8	351	12.8	285	27.3	482	14.0	192	12.9	140	9.3	55	12.9	9	45	17	6.1	5	31.3	17	19.3	7763	18.5
Culex quinquefasciatus	76	0.3		0.0	2	0.1	1	0.1			2	0.1	1	0.1									1	1.1	83	0.2
Culex tritaeniorhynchus	1491	5.2	30	1.5	36	1.3	9	0.9	33	1.0	20	1.3	11	0.7	5	1.2			2	0.7			0.0		1637	3.9
Mansonia africana	330	1.1	2	0.1	64	2.3	60	5.8	59	1.7	10	0.7	146	9.7	4	0.9			1	0.4	2	12.5	2	2.3	687	1.6
Mansonia uniformis	1901	6.6	116	5.6	446	16.2	229	22.0	711	20.7	412	27.8	171	11.4	24	5.6	4	20	9	3.2	2	12.5	1	1.1	4026	9.6
Total vectors	26290	91.3	1979	96.1	2483	90.4	966	92.6	3104	90.4	1321	89.0	1189	79.2	356	83.8	19	95	257	92.1	14	87.5	81	92.0	38066	90.9
Others	2511	8.7	80	3.9	264	9.6	77	7.4	331	9.6	163	11.0	312	20.8	69	16.2	1	5	22	7.9	2	12.5	7	8.0	3832	9.1
Total	28801	100	2059	100	2747	100	1043	100	3435	100	1484	100	1501	100	425	100	20	100	279	100	16	100	88	100	41898	100

Autres: *Aedes aegypti*, *Mansonia africana*, *Culex annulioris*, *Culex antennatus*, *Aedes argenteopunctatus*, *Culex bitaeniorhynchus*, *Anopheles coustani*, *Aedes dalzieli*, *Culex decens*, *Culex ethiopicus*, *Aedes fowleri*, *Anopheles funestus*, *Aedes furcifer*, *Anopheles gambiae*, *Aedes hirsutus*, *Aedes luteocephalus*, *Uranotaenia mayeri*, *Aedes mcintoshi*, *Aedes metallicus*, *Mimomyia mimomyiaformis*, *Aedes minutus*, *Culex neavei*, *Culex nebulosus*, *Aedes ochraceus*, *Culex perfuscus*, *Anopheles pharoensis*, *Mimomyia plumosa*, *Culex poicilipes*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles rufipes*, *Culex sp*, *Mimomyia splendens*, *Anopheles squamosus*, *Aedes sudanensis*, *Culex tigripes*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Mansonia uniformis*, *Aedes unilineatus*, *Aedes vexans*, *Aedes vittatus*, *Anopheles ziemanni*

Pièges au sol (CDC-G) et le niveau de la canopée (CDC-C) CDC + lumière de CO2; Moustiquaire appâté avec la chèvre (MG), Mouton (MS), humain (MH) et le poulet (MC); piège à lumière animaux + appâtés avec la chèvre (ABT-G), Mouton (ABT-S) et le poulet (ABT-C); oiseau appâté piège avec des pigeons au sol (BBT-PG) et la verrière (BBT-PC) et le poulet au sol (BBT-CG) et le niveau de la canopée (BBT-CC)

V.3.2 Virus détectés

Les 42 969 moustiques répartis dans les 4429 lots ont été testés pour l'isolement du virus. Onze espèces virales ont été identifiées parmi les 100 isolats **(Tableau 9).** Le virus West Nile (WN; 31%), le virus Barkedji (BKJV; 17%), le virus Sindbis (de SINV; 13%), et le virus Usutu (USUV; 12%) étaient les plus répandus. Sept virus ont été identifiés en 2012 et 9 en 2013. Le virus Yaoundé (YAOV) et le virus Ndumu (NDUV) ont été détectés en 2012 et le virus Acado (ACAV), le virus de la fièvre de la vallée du Rift (FVR), le virus Sanar (SANV) et le virus non classés (UNCV) en 2013. Bagaza (BAGV), BKJV, SINV, USUV et WN ont été identifiés au cours des deux années consécutives. Le plus grand nombre de virus a été isolé en Octobre en 2012 (59,5% des isolats totaux de l'année) et Novembre en 2013 (74,1% des isolats totaux de l'année).

Toutes les souches virales ont été isolées à partir de 8 mares (71, 4% du virus) et sept villages en 2012 et 4 mares en 2013 (**Figure 38**). La plupart des souches virales étaient isolées à partir de la mare de Kangaledji (36,7%) et celle de Niakha (26,7%) en 2012 et de Kangaledji (72,4%) en 2013. Trois espèces virales (WN, NDUV et SINV) ont été isolées à partir de villages en 2012 et dans 7 et 9 des mares en 2012 et 2013, respectivement.

Neuf des 11 espèces virales ont été isolées à partir du CDC-S, 7 avec CDC-C et MC, 6 MH et MM, 3 en PAA-M, ABT-C et PAO-PgC, 2 en PAA-C et enfin 1 PAO-PC. Les virus ont été isolés à partir de moustiques collectés par 10 des 12 méthodes d'échantillonnage différentes. Seule les méthodes piège à appât oiseau avec des pigeons au sol (PAO-PGS) et le piège à appât oiseau avec le poulet au sol (PAO-PS) n'ont pas collecté des moustiques infectés. Le plus important nombre d'isolement a été obtenu avec le CDC-C (38% des souches isolées), et CDC-S (15%), MH (12%), MC (11%) et MM (9%).

Les souches de virus ont été isolées à partir de plusieurs espèces de moustiques pour la CDC-C, CDC-S et MC et seulement de *Cx. neavei* pour les autres méthodes d'échantillonnage.

Les virus ont été isolés à partir de 13 espèces de moustiques. Les plus grands nombres d'isolements viraux ont été obtenus de *Cx. neavei* (72% des souches), *Cx. antennatus* (9%), et *Ma. uniformis* (5%). Huit espèces virales différentes ont été isolées de *Cx. neavei* (ACAV, BAGV, BKJV, SANV, SINV, USUV, le WN et YAOV), 7 de *Cx. antennatus* (ACAV,

BAGV, SANV, SINV, USUV, le WN et YAOV) et 3 de *Ma. uniformis* (ACAV, SANV et UNDV). Les virus ont été détectés à partir des vecteurs, avant, pendant et après leurs pics d'abondance (moutiques).

Tableau 9 : Les virus isolés à partir de moustiques capturés dans la zone Barkedji, 2012-2013

Site	Habitat	Méthodes d'échantillonnage	Mois	Années	Espèces	Sexe	Virus
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Acado
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex antennatus*	Femelle	Acado
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Acado
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Acado
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Acado
Kangaledji	Mare	PAO-PC	Octobre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Acado
Beli boda	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	Bagaza
Niakha	Mare	M-C	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Bagaza
Kangaledji	Mare	PAA-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Bagaza
Niakha	Mare	M-M	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Niakha	Mare	M-H	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Niakha	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Saakat	Mare	CDC-S	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Niakha	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	PAA-P	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Fourdou	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Fourdou	Mare	PAO-PgC	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Fourdou	Mare	CDC-C	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	PAO-PgC	Octobre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Barkedji
Kangaledji	Mare	CDC-S	Septembre	2012	*Anopheles ziemanni*	Femelle	Ndumu
Kangaledji	Mare	CDC-S	Septembre	2012	*Mansonia uniformis*	Femelle	Ndumu
Kangaledji	Mare	CDC-S	Septembre	2012	*Mansonia uniformis*	Femelle	Ndumu
Kangaledji	Mare	CDC-S	Septembre	2012	*Mansonia uniformis*	Femelle	Ndumu
keur Lora	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Anopheles rufipes*	Femelle	Ndumu

keur Lora	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Culex poicilipes*	Femelle	Ndumu
keur Daha	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Aedes dalzieli*	Femelle	Ndumu
Beli boda	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Aedes vexans*	Femelle	Ndumu
Fourdou	Mare	CDC-C	Septembre	2013	*Aedes sudanensis*	Femelle	Unclassified
Fourdou	Mare	M-C	Septembre	2013	*Aedes ochraceus*	Femelle	Rift valley fever
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sanar
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex antennatus*	Femelle	Sanar
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sanar
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sanar
Kangaledji	Mare	CDC-S	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sanar
Kangaledji	Mare	CDC-S	Septembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Niakha	Mare	M-M	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Niakha	Mare	M-H	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Niakha	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji2	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
keur Aliou Diallo	Village	CDC-S	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Keur Dadal	Village	CDC-S	Novembre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	PAA-P	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Fourdou	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Sindbis
Kangaledji	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Beli boda	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	Usutu
Aliou	Mare	CDC-S	Novembre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	Usutu
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Kangaledji	Mare	PAA-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Kangaledji	Mare	PAA-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Fourdou	Mare	PAO-PgC	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Fourdou	Mare	CDC-C	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Fourdou	Mare	CDC-C	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Kangaledji	Mare	PAO-PgC	Octobre	2013	*Culex neavei*	Femelle	Usutu
Ngao	Mare	CDC-S	Juillet	2012	*Culex quinquefasciatus*	Femelle	West Nile
Beli boda	Mare	CDC-S	juillet	2012	*Culex perfuscus*	Femelle	West Nile
keur Lora	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Anopheles rufipes*	Femelle	West Nile
keur Lora	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Culex poicilipes*	Femelle	West Nile

keur Daha	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Aedes dalzieli*	Femelle	West Nile
Niakha	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Keur Diallo	Village	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-C	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-H	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji2	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	CDC-S	Octobre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Keur adama Sow	Village	CDC-S	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Keur aliou Ba	Village	CDC-S	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Aliou	Mare	CDC-S	Novembre	2012	*Culex antennatus*	Femelle	West Nile
Fourdou	Mare	M-M	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
keur Daha	Village	CDC-S	Novembre	2012	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Saakat	Mare	PAA-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Niakha	Mare	CDC-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	PAA-C	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	M-H	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Fourdou	Mare	CDC-S	Novembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Fourdou	Mare	PAA-P	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Fourdou	Mare	CDC-C	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	PAA-C	Septembre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	PAO-PgC	Octobre	2013	*Culex neavei*	Femelle	West Nile
Kangaledji	Mare	CDC-C	Octobre	2013	*Culex tritaeniorhynchus*	Femelle	West Nile
Demba Malal Sow	Mare	CDC-S	juillet	2012	*Culex tritaeniorhynchus*	Femelle	Yaoundé
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Mansonia uniformis*	Mâle	Acado
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Mâle	Barkedji
Kangaledji	Mare	M-C	Novembre	2013	*Mansonia uniformis*	Mâle	Sanar
Kangaledji	Mare	M-M	Novembre	2013	*Culex neavei*	Mâle	Usutu

Pièges au sol (CDC-S) et au niveau de la canopée (CDC-C) CDC lumineux + CO2; Moustiquaire appâté avec la chèvre (MC), Mouton (MM), humain (MH) et le poulet (MP); piège à appât animaux + lumière avec la chèvre (AAP-C), Mouton (AAP-M) et le poulet (AAP-P); piège à appât oiseau avec des pigeons au sol (PAO-PG) et au niveau de la canopée (PAO-PgC) et le poulet au sol (PAO-PS) et au niveau de la canopée (PAO-PC).

V.3.2.1. Le virus West Nile

Dans l'ensemble, le VWN a été isolé à partir de 31 lots de moustiques appartenant à trois genres et huit espèces capturées dans huit mares (24/77,4% de toutes les souches) et cinq villages (**Tableau 9**). Le plus grand nombre de souches virales a été obtenu à Kangaledji pour les mares avec 13 (54,2%) souches. Les souches de VWN ont été isolés à partir de moustiques capturés par 9 méthodes d'échantillonnage, mais principalement par CDC-S avec 15 souches (48,4%). Le virus a été identifié à partir de 22 lots de *Cx. neavei* (71%), 3 lots de *Cx. antennatus* (9,7%) et un lot de chacun des six autres vecteurs (*Cx. poicilipes, Cx. perfuscus, Cx. tritaeniorhynchus, Cx. quinquefasciatus, Ae. dalzieli et An. rufipes.* Les lots infectés ont été collectés en juillet (2 lots / 6,4% du total), septembre (3 lots / 9,7% du total), octobre (12 lots / 38,7% du total), et novembre (14 lots / 45,2% du total.

Les TMI du VWN pour toutes les espèces sont présentés dans les **Tableaux 10 et 11**. Les taux minimums d'infection ont été très variables entre les espèces **(Tableau 10)**. Ils ont varié significativement de 12 ‰ chez *Cx. quinquefasciatus* à 0,1 ‰ chez *Cx. poicilipes* (chi-2 = 54,8, degrés de liberté (d f) = 7, P <0,0001). *Culex neavei* est la seule espèce trouvée infectée dans plus d'une méthode d'échantillonnage et que le TMI parmi les types de pièges est de 17,5 ‰ (MH) à 4,24 ‰ (CDC-C) et sont statistiquement comparables (chi-2 = 8,5, degrés de liberté [df] = 9, p = 0,5). Le taux d'infection le plus élevé a été observé en Novembre pour *Cx. neavei, Cx. antennatus* et tous les vecteurs (**Tableau 11**). Les TMI de la variation saisonnière ne sont pas statistiquement significatifs pour *Cx. neavei* et *Cx. antennatus* (p> 0,2).

Une corrélation positive et statistiquement significative n'a été observée qu'entre le nombre de moustiques vecteurs capturés et le nombre de souches isolées par différents pièges (r = 0,8; P = 0,001). La même tendance a été observée entre le nombre de *Cx. neavei* recueillies et le nombre de souches isolées par différents pièges (r = 0,7; p = 0,01).

V.3.2.2. Le Virus Usutu

Ce virus a été isolé à partir de 10 lots (9 femelles et 1 mâle) de *Cx. neavei* (83,3% des souches) et deux lots de *Cx. antennatus* capturés dans quatre mares par six méthodes d'échantillonnage (**Tableau10**). Le plus grand nombre de souches virales vient de la mare de Kangaledji avec 7 lots (58,3% des souches). Les lots infectés ont été obtenus en Septembre (3 lots) Octobre (3lots) et Novembre (5 lots) (**Tableau 11**). Les taux moyens d'infection minimales de *Cx. antennatus* (1,5 ‰) et *Cx. neavei* (2,4 ‰) (**Tableau 10**) ont été comparables (P = 0,7). *Culex neavei* est la seule espèce trouvée infectée dans plus d'une

méthode d'échantillonnage et que le TMIM parmi les types de pièges varient de 12,1 ‰ avec PAO-PgC à 0,62 ‰ avec CDC-S avec une différence significative (P = 0,01). Le taux d'infection le plus élevé a été observé en novembre pour *Cx. antennatus* et septembre chez *Cx. neavei*. Les différences de la variation saisonnière du TMIM n'ont pas été statistiquement significative pour *Cx. neavei* et *Cx. antennatus* (P> 0,2).

V.3.2.3. Le Virus Acado

Ce virus a été isolé à partir de cinq lots de *Cx. neavei* (71,4% des souches), un lot de *Cx. antennatus* et un lot de *Ma. uniformis* mâle capturés au niveau de la mare de Kangaledji par six méthodes d'échantillonnage (**Tableaus 9 et 10**). Les lots infectés ont été obtenus en octobre (un lot) et en novembre (6 lots). Les taux moyens d'infection minimales de *Cx. antennatus* (0,7 ‰) et *Cx. neavei* (1,3 ‰) présentés dans le **Tableau 10** sont comparables (P = 1). Chez *Culex neavei* le TMIM entre les types de pièges varient de 6,06 ‰ en PAO-PgC à 0,62 ‰ avec CDC-S avec une différence significative (P = 0,01). Le taux d'infection le plus élevé a été observé à la fin du mois de Novembre pour *Cx. neavei* et l'ensemble des vecteurs. Les différences ne sont pas statistiquement significatives (p = 1). Les différences de la variation saisonnière du TMIM ne sont pas statistiquement significative pour *Cx. neavei* et l'ensemble des vecteurs (P> 0,09).

V.3.2.4. Le virus Bagaza

Ce virus a été isolé à partir de deux lots de *Cx. neavei* et un lot de *Cx. antennatus* capturés au niveau de trois mares par trois différentes méthodes (**Tableaux 9 et 10**). Les lots infectés ont été capturés en octobre (un lot) et novembre (2 lots). Le TMIM de *Cx. antennatus* (0,7 ‰) et *Cx. neavei* (0,5 ‰) (**Tableau 10**) ont été comparables (P = 1). Le TMIM de *Culex neavei* avec le PAO-PgC (6,1 ‰) et le PAA-M (3,7 ‰) ne sont pas statistiquement différents (P = 1).

V.3.2.5. Le virus Barkedji

Toutes les souches de ce virus ont été isolées à partir de *Cx. neavei* (17 lots / 16 femelles et 1 mâle) capturés au niveau de quatre mares et par sept méthodes (**Tableaux 9 et 10**). Le plus grand nombre de souches virales a été obtenu au niveau de la mare de Kangaledji avec 9 lots (52,9% des souches). Les lots positifs ont été trouvés en Septembre (2 lots), Octobre (4

lots) et en Novembre (11 lots). Le TMIM entre les types de pièges varie de 13,1 ‰ avec MH à 1,2 ‰ avec CDC-S avec une différence significative (P = 0,005). Le taux d'infection le plus élevé de la saison (**Tableau 11**) a été observé en novembre mais la différence avec les autres mois n'est pas statistiquement significative (P = 0,6).

V.3.2.6. Le Virus Ndumu

Un total de huit souches du NDUV a été isolés à partir de lots de moustiques appartenant à quatre genres et six espèces capturés au niveau de deux mares (5 / 62,5% de toutes les souches) et deux villages par le CDC-S (**Tableaux 9 et 10**). Le plus grand nombre de souches virales a été obtenu au niveau de la mare de Kangaledji (50% des souches). Le virus a été isolé à partir de *Ma. uniformis* (3 lots / 37,5% du total), *Ae. dalzieli, Ae. vexans, An. rufipes, An. ziemanni* et *Cx. poicilipes* (1 lot chacun). Les lots infectés ont été obtenus en septembre (4 lots) et octobre (4 lots). Le TMIM parmi les espèces collectées par CDC-S, varie de 9,6 ‰ pour *An. rufipes* à 0,1 ‰ pour *Ae. vexans* (**Tableau 10**), avec une différence significative (P = 0,001). Aucune espèce n'a montré de variations saisonnières pour le TMIM (**Tableau 11**).

V.3.2.7. Le Virus Sanar

Ce virus a été isolé à partir de quatre lots de *Cx. neavei* (66,7% des souches), un lot de *Cx. antennatus* et un lot de *Ma. uniformis* mâle capturés au niveau de la mare de Kangaledji par cinq méthodes d'échantillonnage (**Tableaux 9 et 10**). Les lots infectés ont été uniquement capturés en novembre (**Tableau 11**). Les taux moyens d'infection minimales de *Cx. antennatus* (0,7 ‰) et de *Cx. neavei* (1,1 ‰) (**Tableau 10**) sont comparables (P = 1). Le TMIM de *Culex neavei* parmi les types de pièges est de 4,4 ‰ avec MH à 0,6 ‰ avec CDC-S et n'ont pas une différence significative (P = 0,1).

V.3.2.8. Le Virus Sindbis

SINV a été isolé à partir de 12 lots de *Cx. neavei* et un lot de *Cx. antennatus* capturés au niveau de quatre différentes mares et deux villages par six méthodes (**Tableaux 9 et 10**). Les lots infectés ont été capturés en septembre (1 lot), en octobre (5 lots) et en novembre (7 lots). Le TMIM de *Cx. antennatus* (0,7 ‰) et *Cx. neavei* (3,2 ‰) (**Tableau 10**) ont été comparables (P = 0,2). Le TMIM avec CDC-C (6,4 ‰) et MC (2,9 ‰) de *Culex neavei* n'ont pas été

statistiquement différents (P = 0,8). Le nombre de *Cx. neavei* capturés et le nombre de souches isolées par différents pièges sont positivement et significativement corrélées (r = 0,9; P = 0,003).

V.3.2.9. Le Virus Yaoundé

Une seule souche de ce virus a été capturée à partir d'un lot de *Cx. tritaeniorhynchus* capturé au niveau d'une mare par la méthode CDC-S en Juillet 2012 (**Tableau 9**).*

V.3.2.10. Le Virus de la fièvre de la vallée du Rift

La souche unique de VFVR a été isolée à partir d'un lot d'*Ae. ochraceus* en septembre 2013 (**Tableau 10**). Ce lot a été capturé au niveau de la mare de Fourdou par le piège MC.

V.3.2.11. Virus non classé

Ce virus a été isolé à partir d'un lot d'*Ae. sudanensis* capturés en septembre 2013 par la méthode CDC-C dans une mare (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Les virus isolés et le taux d'infection minimum du champ par la méthode d'échantillonnage, zone de Barkedji, 2012-2013

		CDC-S		CDC-C		M-C		M-H		M-M		PAA-C		PAA-M		PAO-P		PAO-PgC		Total	
Virus	espèces	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM	P+	TMIM
WNV	*Culex antennatus*	3	3.2																	3	2.2
	Aedes dalzieli	1	1.0																	1	0.7
	Culex neavei	7	4.3	2	4.2	3	8.7	4	17.5	1	4.3	2	12.3	1	3.7	1	4.8	1	6.1	22	5.8
	Culex perfuscus	1	2.9																	1	1.8
	Culex poicilipes	1	0.2																	1	0.1
	Culex quinquefasciatus	1	13.2																	1	12.0
	Anopheles rufipes	1	9.6																	1	9.0
	Culex tritaeniorhynchus			1	33.3															1	0.6
	Total vecteurs	15	1.4	3	1.7	3	2.9	4	7.3	1	1.0	2	4.2	1	1.8	1	3.5	1	4.1	31	1.9
USUV	*Culex antennatus*	2	2.2																	2	1.5
	Culex neavei	1	0.6	2	4.2			2	8.7			1	6.1	1	3.7			2	12.1	9	2.4
	Total vecteurs	3	1.2	2	4.0			2	8.3			1	4.2	1	2.7			2	11.8	11	2.1
ACAV	*Culex antennatus*					1	8.8													1	0.7
	Culex neavei	1	0.6	1	2.1			1	4.4	1	4.3							1	6.1	5	1.3
	Total vecteurs	1	0.4	1	2.0	1	2.2	1	4.2	1	3.0							1	5.9	6	1.2
BAGV	*Culex antennatus*	1	1.1																	1	0.7
	Culex neavei					1								1	3.7			1	6.1	2	0.5
	Total vecteurs	1	0.4											1	2.7			1		3	0.6
BARV	*Culex neavei*	2	1.2	4	8.5	1	2.9	3	13.1	3	12.9					1	4.8	2	12.1	16	4.3

NDUV	*Aedes dalzieli*	1	1.0													1	0.7
	Culex poicilipes	1	0.2													1	0.1
	Anopheles rufipes	1	9.6													1	9.0
	Mansonia uniformis	3	1.6													3	0.7
	Aedes vexans	1	0.1													1	0.1
	Anopheles ziemanni	1	1.0													1	0.4
	Total vecteurs	10	0.4	4	2.0	1	0.4	3	3.1	3	1.0		1	2.8	2	7.8	24	0.6
SANV	*Culex antennatus*					1	8.8										1	0.7
	Culex neavei	1	0.6	1	2.1			1	4.4	1	4.3						4	1.1
	Total vecteurs	1	0.4	1	2.0	1	2.2	1	4.2	1	3.0						5	1.0
SINV	*Culex antennatus*	1	1.1														1	0.7
	Culex neavei	5	3.1	3	6.4	1	2.9	1	4.4	1	4.3		1	4.8			12	3.2
	Total vecteurs	6	2.3	3	6.0	1	2.2	1	4.2	1	3.0		1	4.5			13	2.5
RVFV	*Aedes ochraceus*					1	6.5										1	0.5
UNCV	*Aedes sudanensis*			1	15.9												1	1.3
YAOV	*Culex tritaeniorhynchus*	1	0.7														1	0.6

CDC+CO_2 light traps set at ground (CDC-G) and canopy level (CDC-C); Mosquito-net baited with goat (M-G), Sheep (M-S), human (M-H); animal + light trap baited with goat (ABT-G), Sheep (ABT-S) and chicken (ABT-C); bird baited trap with pigeons at canopy (BBT-PC); P+: number of positive pools; MFIR: minimum field infection rate (total number positive pools / the total number of mosquitoes tested *1000)

Tableau 11 : Les taux d'infection minimum et de virus isolés sur le terrain par mois, zone Barkedji, 2012-2013

		Juillet			Septembre			Octobre			Novembre		
Virus	Species	Nb	P+	MFIR	Nb	P+	MFIR	Nb	P+	MFIR	Nb	P+	MFIR
WNV	*Culex antennatus*	46			176			990	2	2.0	96	1	10.4
	Aedes dalzieli	367			108			7	1	142.9			
	Culex neavei	12			669	3	4.5	1193	6	5.0	1721	13	7.6
	Culex perfuscus	155	1	6.5	222			64					
	Culex poicilipes	19			3168			2401	1	0.4	1974		
	Culex quinquefasciatus	4	1	250.0	13			23			20		
	Anopheles rufipes	1			33			61	1	16.4	8		
	Culex tritaeniorhynchus	842			98			343	1	2.9	14		
	Total vecteurs	1446	2	1.4	4487	3	0.7	5082	12	2.4	3833	14	3.7
USUV	*Culex antennatus*	46			176			990	1	1.0	96	1	10.4
	Culex neavei	12			669	3	4.5	1193	2	1.7	1721	4	2.3
	Total vecteurs	58			845	3	3.6	2183	3	1.4	1817	5	2.8
ACAV	*Culex antennatus*	46			176			990			96	1	10.4
	Culex neavei	12			669			1193	1	0.8	1721	4	2.3
	Total vecteurs	58			845			2183	1	0.5	1817	5	2.8
BAGV	*Culex antennatus*	46			176			990	1	1.0	96		
	Culex neavei	12			669			1193			1721	2	1.2
	Total vecteurs	58			845			2183	1	0.5	1817	2	1.1
BARV	*Culex neavei*	12			669	2	3.0	1193	4	3.4	1721	10	5.8
NDUV	*Aedes dalzieli*	367			108			7	1	142.9			
	Culex poicilipes	19			3168			2401	1	0.4	1974		
	Anopheles rufipes	1			33			61	1	16.4	8		
	Mansonia uniformis				2277	3	1.3	864			127		
	Aedes vexans	6603			1408			278	1	3.6	4		
	Anopheles ziemanni	6			1879	1	0.5	434			62		
	Total vecteurs	6996			8873	4	0.5	4045	4	1.0	2175		
SANV	*Culex antennatus*	46			176			990			96	1	10.4
	Culex neavei	12			669			1193			1721	4	2.3
	Total vecteurs	58			845			2183			1817	5	2.8
SINV	*Culex antennatus*	46			176			990			96	1	10.4
	Culex neavei	12			669	1	1.5	1193	5	4.2	1721	6	3.5
	Total vecteurs	58			845	1	1.2	2183	5	2.3	1817	7	3.9
RVFV	*Aedes ochraceus*	83			1250	1	0.8	516			5		
UNCV	*Aedes sudanensis*	15			517	1	1.9	111			2		
YAOV	*Culex tritaeniorhynchus*	842	1	1.2	98			343			14		

V.4 Discussion

La localité de Barkedji, d'après ces résultats, est caractérisée par une grande diversité d'arthropodes. Cette diversité spécifique a été plus élevée comparée aux résultats obtenus dans la même zone par Diallo (2005) avec 40 et 38 en 2006 dans le cadre de sa thèse. Elle a été inférieure aux 58 espèces trouvées au cours d'une étude de 6 ans à Barkedji (Traore-Lamizana *et al.*, 2001). Ces différences dans la diversité peuvent s'expliquer par les techniques différentes de collecte mais également par une évolution de la population de moustiques du fait de changements environnementaux. L'utilisation de techniques additionnelles d'échantillonnage, comme la capture sur homme ou l'aspiration des moustiques au repos dans la nature mais également l'augmentation des sites d'échantillonnages, auraient sans doute permis de récolter beaucoup plus d'espèces.

Cette diversité présente des dynamiques spatio temporelles contraste en fonction du genre, de l'espèce, de la période et de l'espace. En effet, ces trois genres n'ont pas les mêmes dynamiques spatio temporelles.

Pour les *Aedes*, ils présentent un pic très précoce d'activité au tout début de la saison des pluies. Le nombre de ces pics dépend des poses et de l'intensité pluviométrique observées au cours de la saison des pluies. Alors que les populations de *Culex* et de *Mansonia* apparaissent vers le milieu de la saison pluvieuse avec l'apparition des hydrophytes. Elles augmentent progressivement avec le développement de ces hydrophytes pour atteindre son pic en fin septembre. Par la suite, elle décline avant de disparaître en fin d'hivernage.

Concernant la présence accentuée d'une espèce à un site par rapport aux autres comme le montre les résultats avec *Aedes vexans* qui est plus abondant à la mare Niakha alors que *Culex poicilipes* et *Mansonia uniformis* sont plus abondants au niveau de la mare de Kangaledji peut être expliqué par le fait qu'écologiquement le site renferme toutes les conditions nécessaires au développement de l'espèce. C'est pourquoi il y a plus d'*Aedes vexans* à la mare de Niakha alors comme il y a plus d'hydrophytes à Kangaledji, les *Culex poicilipes* et *Mansonia uniformis* sont plus abondants.

Ces trois espèces possèdent donc des modalités de développement très différentes, en relation avec leurs caractéristiques biologiques. En effet, l'évolution et la dynamique des populations d'*Aedes* reposent sur des variations du milieu aquatique, tandis que celles des *Culex* et des *Mansonia* sur sa stabilité. Le régime des pluies et le type de couvert d'eau auront donc des conséquences importantes sur l'abondance et la proportion relative de ces espèces tout au long de la saison de transmission des Arbovirus.

Dans cette étude, nous avons détecté 11 espèces virales mettant en exergue l'importance de la zone de Barkedji comme un hot-spot de la transmission des arbovirus enzootiques et aussi comme plate-forme privilégiée pour la surveillance des maladies à transmission vectorielle. La détection des VNDU, VACA, VSIN et VIND pour la première fois dans la zone de Barkedji après plus de 20 années de surveillance d'arbovirus indique la grande biodiversité des arbovirus. Il indique également que nous avons toujours été loin d'être exhaustifs et nous le sommes encore. Une des premières hypothèses est que ces virus sont nouvellement introduits dans le milieu. On peut aussi penser que ces résultats sont le fruit d'une amplification chez les moustiques d'arbovirus qui étaient présents dans la zone en attente de conditions écologiques favorables à leur émergence. A ce stade de notre étude, il est difficile de statuer sur l'origine de ces virus. Cependant, il semble claire que le fait de diversifier les approches, les méthodes et les sites d'échantillonnage a probablement contribué à leur détection. La plupart des espèces et des souches virales ont été détectées chez des moustiques capturés au niveau des étangs, en particulier la mare de Kangaledji, mettant en évidence les modèles selvatiques et foyer de transmission de ces arbovirus. En effet, les animaux domestiques et humains sont impliqués qu'accidentellement et ne jouent pas un rôle important dans les cycles normaux de transmission de ces virus. VWN, VNDU et SINV sont les trois espèces virales isolées à partir de villages.

L'isolement de VACA et VSAN à partir d'un lot de *Ma. uniformis* mâle et VUSU et VBAR à partir d'un lot de *Cx. Neavei* mâle, pour la première fois dans nos connaissances, la possibilité de soutenir le maintien de ces virus par transmission verticale à l'état sauvage. Ainsi, ces espèces de moustiques peuvent être considérées comme des réservoirs de ces virus au cours de la saison défavorable.

Le VFVR a été isolé à partir de plusieurs espèces de moustiques dans de nombreux pays africains (Traore-Lamizana et *al.*, 2001 ; Turell et *al.*, 1987). Il a été isolé pour la première fois au Sénégal en 1974 *d'Ae. dalzieli*. Plus tard, le virus a été isolé à partir d'*Ae. vexans, Ae. ochraceus, Cx. poicilipes, Ae. fowleri, Ma. uniformis,* et *Ma. africana* au Sénégal (Traore-Lamizana et *al.*, 2001 ; Ba et *al.*, 2012 ; Diallo et *al.*, 2005 ; Diallo et *al.*, 2000 ; Fontenille et *al.*, 1998 ; Fontenille et *al.*, 1995). Le VFVR a été responsable d'épidémies généralisées chez les humains et les ongulés domestiques en Afrique et la péninsule arabique (Caminade et *al.*, 2014 ; Carroll et *al.*, 2011 ; de La Rocque et *al.*, 2014 ; Nderitu et *al.*, 2011 ; Perez et *al.*, 2010 ; Sanchez-Vizcaino et *al.*, 2013 ; Sindato et *al.*, 2014). Le virus est transmis par les moustiques vecteurs, les aérosols ou par contact direct avec du sang et d'autres fluides

corporels d'animaux infectés virémiques (Gerdes, 2004 ; Meegan et *al.*, 1988). La maladie est caractérisée par des avortements de masse et une forte mortalité chez l'animal (Easterday et *al.*, 1962 ; Coetzer, 1977 ; Bird et *al.*, 2009) résultant de pertes économique élevés. Chez l'homme aussi, les taux élevés de mortalité et les complications graves (y compris la fièvre hémorragique, la cécité et les déficits neurologiques résiduels) ont été observés (Laughlin et *al.*, 1979 ; Jouan et *al.*, 1988 ; Madani et *al.*, 2003). Cette amplification du VFVR, détecté par l'isolement d'une souche unique en septembre dans notre étude, a été suivie par plusieurs flambées de FVR chez l'homme et d'autres ongulés dans les régions du Sénégal (http://www.oie.int/wahis_2 /public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=14211). Cette très faible amplification de la FVR n'implique pas les *Aedes vexans* et les *Culex poicilipes*, connus, comme étant des espèces les plus abondantes et les principaux vecteurs de la FVR en Afrique de l'Ouest (Ba et *al.*, 2012 ; Diallo et *al.*, 2005). Cet isolement unique du VFVR peut également suggérer que l'amplification était très faible pour déclancher une épizootie/épidémie dans la zone de Barkedji.

Cette étude fournit la première preuve documentée de la circulation du VACA au Sénégal. Le VACA, est un membre du sérogroupe Corriparta / (famille : *Reoviridae*, genre: *Orbivirus*). Il a été isolé pour la première en 1963 à partir d'un lot de *Culex antennatus* mixte et un lot de *Cx. neavei* capturés dans la rivière acado Baro, Illubabor Pro en Ethiopie (Gonzalez et Knudson, 1987). Dans notre étude, il a été isolé principalement de *Cx. neavei* (qui pourrait être considéré comme le principal vecteur) et *Cx. antennatus* et *Ma. uniformis* mâle (probablement les vecteurs secondaires). Le VACA n'a jamais été trouvés associées à des vertébrés, par conséquent on ne lui connaît aucun rôle pathogène. Cependant les espèces de moustiques infectés par le VACA sont connus ornithophiles, ce qui laisse penser à un rôle important que les oiseaux pourrait jouer dans son cycle de transmission. Ce virus n'a été détecté seulement dans une des 22 mares étudiées et principalement en novembre indiquant un modèle d'amplification spatio-temporelle encore très localisé. En outre, les virus appartenant à la même sérogroupe, détectés en Australie, en Afrique et en Amérique du Sud (Gonzalez et *al.*, 1987) ont été associés dans un large éventail d'hôtes vertébrés (Whitehead et *al.*, 1968 ; Doherty et *al.*, 1963 ; Doherty et *al.*, 1970 ; Boughton et *al.*, 1990). Ainsi, le VACA peut être potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux à Barkedji. Un possible rôle de mammifères dans son cycle de transmission n'est donc pas non plus à exclure.

Le VWN a été isolé à partir de 31 lots de moustiques (appartenant à 8 espèces), 8 mares et 5 villages confirmant une importante amplification du virus mais également une bonne dissémination dans toutes les classes d'occupation (Traore-Lamizana et *al.*, 2001; Traore-Lamizana et *al.*, 1994). En effet, la circulation de ce virus est bien connue dans la zone puisqu'il est fréquemment isolé à partir de moustiques collectés. Les derniers isolements de moustiques remontent à 2005. Des anticorps dirigés contre le virus ont souvent été détectés dans plus de 78% des chevaux, et dans 39% des oiseaux résidents de Barkedji (Traore-Lamizana et *al.*, 1994 ; Chevalier et *al.*, 2006). VWN n'a pas été étudiée chez l'homme à Barkedji mais les anticorps dirigés contre le virus ont été détectés dans 80% d'un échantillon humain prélevé dans un village situé à 80 km de Barkedji (Traore-Lamizana et *al.*, 2001). Cette maladie humaine attribuable au VWN en Afrique a le plus souvent été classée comme maladie fébrile avec de légères éruptions, bien que des symptômes plus graves comme l'hépatite et l'encéphalite ont été rapportés (Burt et *al.*, 2002 ; Kulasekera et *al.*, 2001). Le VWN a été isolé principalement chez *Cx. neavei, Cx. antennatus, Cx. poicilipes, Cx. perfuscus, Cx. tritaeniorhynchus, Cx. quinquefasciatus, Ae. dalzieli* et *An. rufipes*. Le VWN a été isolé auparavant à partir de *Cx. neavei, Cx. perfuscus* et *Cx. tritaeniorhynchus* à Barkedji et de *Cx. antennatus* et *Ma. uniformis* dans le bassin du fleuve Sénégal (Diallo et *al.*, 2005 ; Traore-Lamizana et *al.*, 1994) et chez *Ae. dalzieli* à Kédougou (CRORA, 2015). Le virus a été détecté pour la première fois à partir de *Cx. antennatus, Ae. dalzieli* et *Ma. uniformis* à Barkedji et de *Cx. quinquefasciatus* au Sénégal. La compétence des vecteurs comme *Cx. neavei, Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* et *Ae. vexans* pour le VWN a été démontrée (Fall et *al.*, 2014 ; Jupp et *al.*, 1986 ; Goddard et *al.*, 2002). En outre, *Cx. neavei* est connu pour être principalement ornithophage mais il se nourri occasionnellement sur l'homme, le bétail et les chevaux (McIntosh, 1972 ; Snow, 1983 ; Fall et *al.*, 2013) et *Cx. antennatus* est zoophage mais se nourri occasionnellement sur l'homme, le bétail et les oiseaux (Ba et *al.*, 2006 ; McIntosh, 1985). Ces faits suggèrent que *Cx. neavei* devrait être considéré comme le principal vecteur enzootique et *Cx. antennatus* un vecteur épizootique de cette amplification de VWN à Barkedji. Ces deux espèces sont probablement les deux vecteurs ponts. Les autres espèces, avec un seul isolat, ont probablement joué des rôles secondaires. Contrairement à nos résultats, la plupart des souches du VWN ont été isolés dans des études antérieures de *Cx. poicilipes* dans la région Barkedji (Traore-Lamizana et *al.*, 2001 ; Traore-Lamizana et *al.*, 1994) et de *Ma. uniformis* dans le bassin du fleuve Sénégal et aucun VWN n'a été isolé de *Cx. neavei* dans ce domaine (Diallo et *al.*, 2005), ce qui suggère que l'importance qu'on peut donner un vecteur peut varier dans l'espace et le temps.

VUSU a été isolé principalement de *Cx. neavei* au niveau des mares temporaires. Ce résultat confirme le rôle important de cette espèce dans la transmission du VUSU qui a été isolé pour la première fois en 1959 chez *Culex neavei* en Afrique du Sud (McIntosh, 1985). En outre, le virus a été isolé essentiellement chez *Cx. neavei, Cx. perfuscus, Ae. minutus* et *Ma. africana* au Sénégal et dans la sous-région (Ashraf et *al.*, 2015 ; Nikolay et *al.*, 2011). Et chez l'homme un seulement isolement du virus a été obtenu chez un patient ayant présenté des symptômes cliniques de fièvre et éruption cutanée (CRORA, 2015). Le VUSU a été détecté en Europe pour la première fois en Autriche en 2001 avec un taux de mortalité élevé de merles (Pecorari et *al.,* 2009). Dans les années suivantes, l'isolement du virus par les moustiques, les oiseaux, les chauves-souris et la mortalité inhabituelle chez les oiseaux est propagé en Italie, l'Allemagne, l'Espagne, la Hongrie, la Suisse, la Pologne, l'Angleterre, la République tchèque, la Grèce, et la Belgique (Ashraf et *al.*, 2015). Les moustiques trouvés infectés au virus en Europe sont *Culex pipiens, Culex perexiguus, Aedes albopictus, Aedes caspius, Anopheles maculipennis* et *Coquillettidia aurites* (Ashraf et *al.*, 2015). En 2009, les deux premiers cas d'infection humaine par le VUSU en Europe ont été signalés en Italie, causant la méningo-encéphalite chez les patients immunodéprimés (Pecorari et *al.,* 2009). *Culex neavei* est la seule espèce de moustiques dont la compétence vectorielle du VUSU est connue (Nikolay et *al.,* 2012). Considérant la bio-écologie et les isolements de virus, nous devrions envisager *Cx. neavei* comme le principal vecteur enzootique du virus USU au Sénégal. À notre connaissance, c'est le premier isolement du VUSU à partir de *Cx. antennatus* qui pourrait jouer un rôle secondaire compte tenu de sa biologie et le nombre d'isolats obtenus de cette espèce.

BAGV a été isolé à partir de *Cx. neavei* et *Cx. antennatus* au niveau des mares dans cette étude, ce qui suggère que le virus circule dans un cycle enzootique entre ces moustiques ornithophiles et les oiseaux au niveau des mares. Ce virus a une large distribution et a été isolé dans plusieurs pays Ouest Africains, Afrique du Sud, Espagne, Israël et l'Inde (Fernandez-Pinero et *al.*, 2014 ; Gamino et *al.*, 2012 ; Garcia-Bocanegra et *al.*, 2013 ; Sudeep et *al.*, 2013 ; Aguero et *al.*, 2011 ; Bondre et *al.*, 2009). Ce virus a été isolé d'abord en 1966 dans la province de Bagaza de la République centrafricaine à partir de *Culex ssp*. (Digoutte, 1978) et plus tard de *Cx. perfuscus, Cx. thalassius, Cx. univittatus, Cx. ethiopicus, Cx. neavei, Cx. poicilipes, Cx. antennatus, An. nili, An. ziemanni, Ae. dalzieli, Ae. fowleri, Aed. africana, Mi. hispida, Mi. splendens* au Sénégal (Traore-Lamizana et *al.*, 2001 ; Diallo et *al.*, 2005 ; Traore-Lamizana et *al.*, 1994 ; (CRORA 2015) ; Gordon et *al.*, 1992). D'autres isolements de

Cx. decens, Cx. ingrami, Cx. pruine Cx. guiarti, Cx. quinquefasciatus, Cx. nebulosus, Ae. furcifer, Ae. taylori, Ae. africanus et *Ae. opok* ont été signalés dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest (CRORA, 2015). Ce virus a également été isolé à partir de *Cx. tritaeniorhynchus* d'Inde (Bondre et *al.*, 2009). La compétence vectorielle de *Cx. tritaeniorhynchus, Cx. quinquefasciatus* et *Ae. aegypti* et la transmission verticale du virus par *Cx. tritaeniorhynchus* ont été démontrés en Inde (Sudeep et *al.*, 2013). Des études de la compétence vectorielle impliquant des espèces de moustiques africains devraient être faites pour confirmer leur statut de vecteur. Dans l'étude actuelle, *Cx. neavei* et *Cx. antennatus* pourraient être considérés comme vecteurs probables du VBAG. Ce virus est responsable d'une maladie fébrile chez les humains et une forte mortalité chez les oiseaux sauvages en Espagne (Gamino et *al.*, 2012 ; Garcia-Bocanegra et *al.*, 2013 ; Aguero et *al.*, 2011). Des anticorps dirigés contre ce virus ont été également trouvés dans 15% des échantillons humains de l'Inde (Bondre et *al.*, 2009).

Toutes les souches du VBAR (genre: *Flavivirus*, famille: *Flaviviridae*) ont été isolées de *Cx. neavei.* Ce virus a été isolé pour la première fois à Barkedji chez les moustiques du genre *Culex* et en Israël en 2011 (Kolodziejek et *al.*, 2013). Le VBAR n'a jamais été isolé à partir d'hôtes vertébrés humains ou autres, et la pathogénicité chez les vertébrés est encore inconnue. Cependant, la tendance ornithophile (Ba et *al.*, 2006 ; McIntosh, 1972 ; Snow, 1983 ; Fall et *al.*, 2013) de ces vecteurs suggère que les oiseaux peuvent jouer un rôle potentiel dans l'histoire naturelle de ce virus.

Le VNDU (genre : *Alphavirus*, famille: *Togaviridae*) a été identifié principalement à partir de *Ma. uniformis* suggérant ainsi que c'est le principal vecteur de ce virus. Les isolement unique à partir d'*Ae. dalzieli, Ae. vexans, An. rufipes, An. ziemanni* et *Cx. poicilipes* suggèrent qu'ils peuvent jouer des rôles secondaires dans la transmission du VNDU. Le VNDU a été isolé pour la première en 1959 à partir de *Ma. uniformis* en Afrique du Sud et plus tard d'*Ae. dalzieli, Ae. minutus* et *Amblyomma variegatum* au Sénégal et d'*Ae. abnormalis, Ae. aegypti, Ae. luteocephalus, Ae. mcintoshi, Ae. circumluteolus, Ae. ochraceus, Culex rubinotus* et *Ma. uniformis* dans d'autres pays africains (Crabtree et *al.*, 2009 ; Ochieng et *al.*, 2013 ; (CRORA 2015);. Le WNDU a également été isolé à partir de 2 lots de *Cx. pipiens* femelles capturés sous forme de larves au Kenya, suggérant pour la première fois une transmission verticale naturel de ce virus (Lutomiah *et al.*, 2014). Ce virus a été isolé au niveau des villages dans notre étude suggérant ainsi la possibilité d'implication humaine et/ou des animaux domestiques dans le cycle de transmission. Cette affirmation est étayée par la détection du VNDU chez les porcs domestiques d'Ouganda (Masembe et *al.*, 2012). Les

anticorps dirigés contre le VNDU ont été identifiés chez l'homme à partir de plusieurs pays africains, mais il n y a pas de maladies humaines qui ont été attribués à l'infection du VNDU (Kokernot et *al.*, 1961 ; Karabatsos, 1985).

Le VSIN (genre : *Alphavirus*, famille : *Togaviridae*) a été isolé à l'origine chez *Culex pipiens* et *Cx. bivittatus* capturés dans un village nommé Sindbis en Egypte en 1952 (Taylor *et al.*, 1955). Plus tard, le virus a été détecté à partir de *Cx. thalassius* au Sénégal, *Cx. perfuscus, Cx. priuna, Cx. tigripes, Cx. antennatus, Cx. theileri, Cx. quinquefasciatus, Ae. sudanensis An. pharonesis, Ma. africana* et *Ma. fuscopenna* en Afrique, et plusieurs espèces de moustiques et de tiques dans le monde (CRORA 2015 ; Monath, 1988). La compétence vectorielle de *Cx. neavei* pour le VSIN a été démontrée en Afrique du Sud (Jupp et *al.*, 1986). Dans cette étude, nous avons isolé le VSIN principalement à partir de *Cx. neavei* et à partir d'un seul lot de *Cx. antennatus* pour la première fois dans la zone de Barkedji. Les moustiques infectés ont été trouvés dans les mares et le village soutenant l'implication possible des oiseaux, des animaux domestiques et humains dans le cycle de transmission de ce virus. En effet, la séropositivité du VSIN chez les humains a été rapportée dans diverses régions d'Afrique, Australie, Europe du Nord et du Moyen-Orient, et des anticorps du VSIN ont également été trouvés à partir de divers vertébrés y compris les oiseaux (Kurkela *et al.*, 2008 ; Buckley et *al.*, 2003 ; Brummer-Korvenkontio et *al.*, 2002 ; Lundstrom et *al.*, 2001) orangs outangs (Wolfe *et al.*, 2001) et moutons (Juricova *et al.*, 1986). Le virus a été isolé à partir de grenouilles (Kozuch et *al.*, 1978), roseau fauvettes (Ernek et *al.*, 1973 ; Blackburn et *al.*, 1982) chauves-souris et les humains (Kurkela et *al.*, 2008 ; Malherbe et *al.*, 1963 ; Zhou et *al.*, 1999). Les symptômes d'infection chez les humains du VSIN comprennent la fièvre, l'arthrite, une éruption cutanée, de la sensibilité et de la persistance de l'arthralgie (Karabatsos, 1985 ; Kurkela et *al.*, 2008).

Le VSAN, comme le VACA sont des membres du sérogroupe *Corriparta*/(famille : *Reoviridae*, genre : *Orbivirus*). Ce virus a été isolé pour la première fois en 1990 à partir de *Cx. poicilipes* à Dakar-Bango près de Saint Louis et plus tard, principalement de *C x. poicilipes, Cx. perfuscus, Cx. quinquefasciatus, Cx. antennatus, Cx. neavei, Ma. uniformis, An. pharoensis* et *An. ziemanni* dans le bassin du fleuve Sénégal, de Kédougou et de la zone de Barkedji (Traore-Lamizana et *al.*, 2001 ; Diallo et *al.*, 2005 ; (CRORA 2015). Dans cette étude, le virus a été isolé principalement à partir de *Cx. neavei*, qui devrait être considéré comme le principal vecteur. *Cx. antennatus* et *Ma. uniformis* sont des vecteurs secondaires potentiels. Le virus a été isolé dans une seule mare indiquant une activité localisée dans la

zone de Barkedji malgré une large répartition géographique au Sénégal (CRORA 2015). Ses hôtes vertébrés et son potentiel pathogène sont inconnus. Cependant, la tendance ornithophile des vecteurs suggère que les oiseaux peuvent jouer un rôle potentiel dans l'histoire naturelle de ce virus.Virus appartenant au sérogroupe *Corriparta* virus a été détecté en Australie, en Afrique et en Amérique du Sud (Gonzalez et Knudson, 1987) dans un large éventail d'hôtes vertébrés (Whitehead et *al.*, 1968 ; Doherty et *al.*, 1963 ; Doherty et *al.*, 1970 ; Boughton et *al.*, 1990).

Le VYAO a été isolé pour la première en 1968 à partir de *Cx. nebulosus au* Cameroun (Digoutte et *al.*, 1992). Plus tard, le virus a été isolé rarement d'*Ae. taylori, Ae. luciocephalus, Cx. neavei* et *Cx. univittatus* au Sénégal et d'*Ae. aegypti, Cx. perfuscus, Cx. duttoni, Cx. pruine, Cx. telesilla, Cx. nebulosus, Er. oedipodeios* dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest (CRORA, 2015) Ces espèces ornithophagiques ont été considérées comme les principaux vecteurs de certains virus d'importance médicale et vétérinaire y compris le virus de l'encéphalite japonaise et le VWN (Rosen et *al.*, 1989 ; Hayes et *al.*, 1980 ; Samuel et *al.*, 2010 ; Kuno et *al.*, 1998). Le YAOV a été isolé chez un oiseau (*Bycanistes sharpii*), deux rongeurs (*Praomys sp*. et *Cavia porcellus*) mais ce virus n'a jamais été associé à l'homme (CRORA, 2015).

Nos données indiquent que la zone de Barkedji se caractérise par une biodiversité de virus élevée d'importance médicale, vétérinaire et qu'on ignore encore. La détection des espèces et des souches virales varient entre les méthodes d'échantillonnage. L'amplification des arbovirus était très centrale, détectée au début de la saison des pluies en juillet et était plus accentuée en octobre et novembre.

Conclusion Générale et Perspectives

En conclusion, nous avons pour la première fois démontré la capacité des populations de moustiques au Sénégal à s'infecter, disséminer et transmettre différentes souches du virus de la fièvre de la vallée du Rift notamment des souches d'Afrique de l'ouest et de Est. Nos résultats ont également montré une circulation à base bruit de ce même virus avec l'isolement d'une souche en 2013 mais surtout celle de beaucoup d'autres arbovirus non spécifiquement recherchés. C'est le cas des virus WN, USUV, ACAV, BAGV, BKJV, SANV, SINV, NDUV, UNCV et YAOV qui ont une importance médicale et/ou vétérinaire avéré, des virus considérés comme mineurs et/ou dont le potentiel pathogène est complétement méconnu. Parmi ces virus, certains sont bien connus endémiques dans la zone alors d'autres n'ont jamais été répertoriés dans le contexte de Barkedji (ACAV, UNCV, SINV, NDUV) voir du Sénégal (ACAV, UNCV).

Si nos résultats ont permis de mesurer la compétence vectorielle des moustiques du Sénégal, ils n'ont pas permis de comprendre les facteurs qui sous-tendent les variations observées suivant les souches virales utilisées mais également selon les espèces de moustiques testés. L'effet souche fortement suspecté nécessiterait des études complémentaires utilisant la génétique réverse pour mieux identifier les gènes qui faciliteraient la réplication et la transmission du virus. D'autres facteurs comme le microbiote associé aux moustiques devraient être aussi exploré. De nombreuses études ont montré que les moustiques sont associés à une microfaune bactérienne importante qu'ils prennent de leurs sites de reproduction, du sang de vertébrés ou verticalement de leurs parents qui peut affecter de nombreux aspects de la biologie des moustiques mais également leur compétence vectorielle. En ce qui concerne les arbovirus, certaines espèces bactériennes sont connues pour sécréter des substances antiviral qui, peuvent impacter positivement ou négativement sur la compétence vectorielle.

Cette étude devrait aussi être élargie à toutes les espèces trouvés associées au virus de la FVR au Sénégal notamment *Ae. ochraceus, Aedes dalzieli, Ae. fowleri, Ma. uniformis.*

La capacité prouvée d'*Ae. vexans* à transmettre la souche MP-12 serait un atout majeur comme mécanisme de dissémination de cette souche qui protégerait les hôtes vertébrés contre les infections à des souches naturelles. Cependant, si notre étude donne des indications sur la faisabilité de cette approche de vaccination naturelle, elle nécessite des travaux complémentaires sur les devenirs des souches après infection du moustiques. D'une part, il faut s'assurer que le virus après passage chez le moustique garde ses marques d'atténuation d'autre part il faudrait nécessairement vérifier que les possibles réassortiments avec des souches naturelles n'affecteraient pas ce caractère du virus.

En effet, nous pouvons dire que tous les trois espèces sont des vecteurs compétent du VFVR et que la souche humaine (SH172805) est plus virulente que celle animale (AnD133719) et celle d'arthropode (ArD141967). En plus, *Aedes vexans* est compétent vis- à –vis de la MP-12. Ce virus (la souche humaine virulente SH172805) influence la longévité des vecteurs de façon négative chez les *Aedes vexans* et les *Cx. quinquefasciatus* mais positivement chez les *Cx. poicilipes*.

Les données obtenues sur les associations virus - vecteurs dans la nature indiquent que la zone de Barkedji est caractérisée par une diversité élevée de virus d'importance médicale, vétérinaire et qu'on ignore encore. Le nombre et la diversité exceptionnellement important de virus isolés comparé aux années précédentes témoigne de leur dynamique complexe de maintien et d'émergence. Bien que la détection des espèces et des souches virales varient entre les méthodes d'échantillonnage, il est difficile de croire qu'elles en sont la cause. Les mêmes méthodes ont été utilisés les années précédentes mais sans succès. L'introduction de nouvelles méthodes de diagnostic qui peuvent améliorer significativement leur détection tout comme les facteurs environnementaux favorables à leur émergence pourraient expliquer ce profil particulier de circulation.

A ce stade, les données obtenues dans la nature tout comme celles obtenues expérimentalement sur la capacité d'*Ae. vexans* à transmettre verticalement le VFVR, et l'impact de l'infection sur la longévité ne permettent pas de conclure sur le rôle des moustiques dans les cycles de maintien et d'émergence.

Liste des publications

Publications soumises et acceptées

El Hadji Malick Ngom1, Ndèye Diango Faye, Cheikh Talla1, El Hadji Ndiaye, Jacques-André Ndione, Ousmane Faye, Yamar Ba, Mawlouth Diallo and Ibrahima Dia1. (2014) Anopheles arabiensis seasonal densities and infection rates in relation to landscape classes and climatic parameters in a Sahelian area of Senegal. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14:711

El Hadji Ndiaye, Gamou Fall, Alioune Gaye, Ndeye Sakha Bob, Cheikh Talla, Cheikh Diagne, Diawo Diallo, Yamar Ba, Ibrahima Dia, Alain Kohl, Amadou Alpha Sall, Mawlouth Diallo. Vector competence of Aedes vexans (Patton), Culex poicilipes (Theobald) and Cx. quinquefasciatus (Say) from Senegal for West and East African lineages of Rift Valley fever virus. *Parasites & Vectors* (Accepté)

Publications soumises

Gamou Fall, Martin Faye, Manfred Weidmann, Marco Kaiser, Anne Dupressoir, El Hadj Ndiaye, Yamar Ba, Mawlouth Diallo, Ousmane Faye, Amadou Alpha Sall. Real time RT-PCR assays for detection and genotyping of West Nile Virus lineages circulating in Africa. (soumis)

Isabelle Dietrich; Stephanie Jansen; Gamou Fall; Stephan Lorenzen; Martin Rudolf; Katrin Huber; El Hadji Ndiaye; Mick Watson; Ilaria Castelli; Benjamin Brennan; Mawlouth Diallo; Amadou Alpha Sall; Anna-Bella Failloux; Esther Schnettler; Alain Kohl; Stefanie Christine Becker RNA interference restricts Rift Valley fever virus in multiple insect systems. (soumis et en révision)

Liste des articles en préparation

El Hadji Ndiaye, Gamou Fall, Diawo Diallo, Yamar Ba, Ibrahima Dia, Amadou Alpha Sall, Mawlouth Diallo. Arboviruses isolation after an update of the Barkedji Mosquito based surveillance system, 2012-2013 (En preparation)

El Hadji Ndiaye, Gamou Fall, Diawo Diallo, Yamar Ba, Ibrahima Dia, Amadou Alpha Sall, Mawlouth Diallo Aedes vexans Susceptibility and capacity to Transmit the MP_12 vaccine Strain. (En préparation)

Bibliographie

1. Abd El-Rahim IHA, Abd El-Hakim U, Hussein M. (1999) An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1997. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Épizooties*, **18** (3) : 741-748.

2. Aguero M, Fernandez-Pinero J, Buitrago D, Sanchez A, Elizalde M, San Miguel E, Villalba R, Llorente F, Jimenez-Clavero MA. (2011) Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases,* **17,** 1498-501.

3. Akakpo AJ, Saluzzo JF, Bada R, Bornarel P, Sarradin P. (1991) Epidemiology of Rift Valley fever in west Africa. 1. Serological investigation of small ruminants in Niger. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 84(3):217-224.

4. Al Hazmi, M., Ayoola, E.A., Abdurahman, M., Banzal, S., Ashraf, J., El Bushra,A., Hazmi, A., Abdullah, M., Abbo, H., Elamin, A., Al Sammani el T, Gadour, M.,Menon, C., Hamza, M, Rahim, I., Hafez, M., Jambavalikar, M., Arishi, H., Aqeel, A. (2003) Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans. *Clinical Infectious Diseases,* **36,** 245-252.

5. Anderson, RM.; May, RM. (1991) Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. Oxford University Press; NY: p. 768

6. Andreadis, T., Anderson, J., Vossbrinck, C. & Main, A. (2004) Epidemiology of West Nile virus in Connecticut: a five-year analysis of mosquito data 1999–2003. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* , **4(4)**, 360–378.

7. Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB. (2013) Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in Aedes albopictus are controlled at the midgut barrier level. *PLoS One*, **8(2),** 57548.

8. Arthur, R., El-Sharkawy, M. S., Cope, S. E., Botros, B. A., Oun, S., Morrill, J. C., Shope, R.
E., Hibbs, R. G., Darwish, M. A. & Imam, I. Z. E. (1993) Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *Lancet*, **342**, 1149-1150.

9. Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. (2015) Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses* **7,** 219-38.

10. Ba Y, Sall AA, Diallo D, Mondo M, Girault L, Dia I, Diallo M. (2012) Re-emergence of Rift Valley fever virus in Barkedji (Senegal, West Africa) in 2002-2003: identification of new vectors and epidemiological implications. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **28,** 170-8.

11. Ba Y, Diallo D, Dia I, Diallo M. (2006) [Feeding pattern of Rift Valley Fever virus vectors in Senegal. Implications in the disease epidemiology]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique,* **99,** 283-9.

12. Ba, Y., Diallo, D., Kebe, C.M., Dia, I. & Diallo, M. (2005) Aspects of Bioecology of Two Rift Valley Fever Virus Vectors in Senegal (West Africa): *Aedes vexans* and *Culex poicilipes* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **42**, 739-750.

13. Ba Y, Trouillet J, Thonnon J, Fontenille D. (1999) Phlébotomes du Sénégal : Inventaire de la faune de la région de Kédougou - Isolements d'arbovirus. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique,* **92,** 131-135.

14. Balkhy HH, Memish ZA. (2003) Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **21,** 153-157.

15. Baskerville, A., Hubbard K., & Stephenson J. (1992) Comparison of the pathogenicity for pregnant sheep of Rift valley fever virus and a live attenuated vaccine. *Research in Veterinary Sciences,* **52,** 307-311.

16. Beier, J.C., Perkins, P.V., Wirtz, R.A., Koros, J., Diggs, D., Gargan, TP. & Koech, D.K. (1988) Blood meal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology*, **25,** 9-16.

17. Billecocq A, Gauliard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, Bouloy M. (2008) RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology,* **378 (2),** 377-84.

18. Billecocq A, Spiegel M, Vialat P, Kohl A, Weber F, Bouloy M, Haller O. (2004) NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of Virology,* **78,** 9798–9806.

19. Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ. (2009) Rift Valley fever virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* **234,** 883-93.

20. Blackburn NK, Foggin CM, Searle L, Smith PN. (1982) Isolation of Sindbis virus from bat organs. *Central African Journal of Medicine,* **28,** 201.

21. Boakye, D., Tang, J.M., Truc, P., Merriweather, A. & Unnasch, T.R. (1999) Identification of blood meals in hematophagous Diptera by polymerase chain reaction amplification and heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology*, **13,** 282–287.

22. Boiro I, Konstaninov OK, Numerov AD. (1987) Isolement du virus de la fièvre de la Vallée du Rift à partir de chéiroptères en République de Guinée. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **80,** 62-67.

23. Bondre VP, Sapkal GN, Yergolkar PN, Fulmali PV, Sankararaman V, Ayachit VM, Mishra AC, Gore MM. (2009) Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *Journal of General Virology*, **90,** 2644-9.

24. Boughton CR, Hawkes RA, Naim HM. (1990) Arbovirus infection in humans in NSW: seroprevalence and pathogenicity of certain Australian bunyaviruses. *Australian & New Zealand Journal of Medicine,* **20,** 51 -5.

25. Bowers DF, Coleman CG, Brown DT. (2003) Sindbis virus-associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. **40,** 698–705.

26. Brummer-Korvenkontio M, Vapalahti O, Kuusisto P, Saikku P, Manni T, Koskela P, Nygren T, Brummer-Korvenkontio H, Vaheri A, 2002. Epidemiology of Sindbis virus infections in Finland 1981-96: possible factors explaining a peculiar disease pattern. *Epidemiology and Infection,* **129,** 335-45.

27. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. (2003) Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology,* **84,** 2807-17.

28. Burt FJ, Grobbelaar AA, Leman PA, Anthony FS, Gibson GV, Swanepoel R. (2002) Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerging Infectious Diseases,* **8,** 820-6.

29. Caminade C, Ndione JA, Diallo M, MacLeod DA, Faye O, Ba Y, Dia I, Morse AP. (2014) Rift Valley Fever outbreaks in Mauritania and related environmental conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11,** 903-18.

30. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. (2002) West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases,* **2,** 519-29.

31. Caplan, R. D., Tripathi, R. C., & Naidu, R. K. (1985) Subjective past, present, and future fit: Effects on anxiety, depression, and other indicators of well-being. *Journal of Personality and Social Psychology*, **8,** 180-197.

32. Carnec X, Ermonval M, Kreher F, Flamand M, Bouloy M. (2014) Role of the cytosolic tails of Rift Valley fever virus envelope glycoproteins in viral morphogenesis. *Virology*, **448(5),** 1-14

33. Carroll SA, Reynes JM, Khristova ML, Andriamandimby SF, Rollin PE, Nichol ST. (2011) Genetic evidence for Rift Valley fever outbreaks in Madagascar resulting from

virus introductions from the East African mainland rather than enzootic maintenance. *Journal of Virology*, **85,** 6162-7.

34. CDC. 2005. Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, West Nile Virus, Entomology. http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosquitoSpecies.htm (Accées le 20 août 2005)

35. Chevalier V, Lancelot R, Diaite A, Mondet B, Sall B, De Lamballerie X. (2006) Serological assessment of West Nile fever virus activity in the pastoral system of Ferlo, Senegal. *Annals of the New York Academy of Sciences,* **1081**, 216-25.

36. Coetzer JA. (1977) The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs. *Onderstepoort of Journal Veterinary Researches,* **44,** 205-11.

37. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. (2014) Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Virology 1,* **1**, 71-88

38. Copeland, R. S. (1981) An electron microscopic study of the development of dengue virus in the salivary glands of *Aedes aegypti* (L.). Master's thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

39. Crabtree MB, Kent Crockett RJ, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, Erickson BR, Biqqerstaff BJ, Horiuchi K, Miller BR. (2012) Infection and Transmission of Rift Valley Fever Viruses Lacking the NSs and/or NSm Genes in Mosquitoes: Potential Role for NSm in Mosquito Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 6 **(5),** 1639.

40. Crabtree M, Sang R, Lutomiah J, Richardson J, Miller B. (2009) Arbovirus surveillance of mosquitoes collected at sites of active Rift Valley fever virus transmission: Kenya, 2006-2007. *Journal of Medical Entomology,* **46,** 961-4.

41. CRORA. (2015) (Virus d'Afrique) : Centre collaborateur OMS de référence et de recherche sur les arbovirus africains. Base de données sur les caractéristiques

d'arbovirus africains isolés par l'Institut Pasteur de Dakar. www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA. (Accès le 10 Décembre 2015)

42. CRORA. (2005) Centre collaborateur OMS de référence et de recherche sur les arbovirus africains. Base de données sur les caractéristiques d'arbovirus africains isolés par l'Institut Pasteur de Dakar. www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/ (Accès le 02 juillet 2007).

43. Daubney R., Hudson J.R., Garnham PC, Enzootic hepatitis or Rift Valley fever. (1931) an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *Journal of Pathology and Bacteriology*, **34,** 2: 545-557.

44. de La Rocque S, Formenty P. (2014) Applying the One Health principles: a trans-sectoral coordination framework for preventing and responding to Rift Valley fever outbreaks. *Revue Scientifique et Technique,* **33,** 555-67.

45. Detinova, T.S. (1962) Age-grading methods in Diptera of medical importance. *World Health Organization Monographic Series,* **47,** 216 pp.

46. Diagne, N., Fontenille, D., Konate, L., Faye, O., Traore-Lamizana, M., Legros, F., Molez, J.F. & Trape, J.F. (1994) Les anophèles du Sénégal. Liste commentée et illustrée. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique,* **87,** 267-277.

47. Diallo D, Talla C, Ba Y, Dia I, Sall AA, Diallo M. (2011) Temporal distribution and spatial pattern of abundance of Rift valley fever and West Nile fever vectors in Barkedji, Senegal. *Journal of Vector Ecology,* **36,** 426-436.

48. Diallo M, Nabeth P, Ba K, Sall AA, Ba Y, Mondo M, Girault L, Abdalahi MO, Mathiot C. (2005) Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Medical and Veterinary Entomology,* **19,** 119-26

49. Diallo M, Lochouarn L, Ba K, Sall AA, Mondo M, Girault L, Mathiot C. (2000) First isolation of the Rift Valley fever virus from Culex poicilipes (Diptera: Culicidae) in nature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **62,** 702-4.

50. Diallo S. Epidémio-surveillance de la FVR au Mali. Dans. (2001) Actes du séminaire sur la surveillance épidémiologique et le contrôle de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest (Mali-Mauritanie-Sénégal). Dakar, Sénégal. 9-12. p. 19-21.

51. Digoutte JP. (1981) Viruses identified from 1963-1981. Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar.

52. Digoutte JP. (1978) Bagaza (BAG) strain: Dak Ar B 209. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **27,** 376-377.

53. Doherty RL, Whitehead RH, Wetters EJ, Gorman BM, Carley JG, (1970) A survey of antibody to 10 arboviruses (Koongol group, Mapputta group and ungrouped) isolated in Queensland. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **64,** 748-53.

54. Doherty RL, Carley JG, Mackerras MJ, Marks EN. (1963) Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. *The Australian Journal Experimental Biology and Medical Sciences,* **41,** 17-39.

55. Durand JP, Bouloy M, Richecoeur L, Peyrefitte CN, Tolou H. (2003) Rift Valley Fever Virus Infection among French Troops in Chad. *Emerging Infectious Diseases,* **9 (6).**

56. Dye, C. (1992) The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual Review of Entomology* **37,** 1-19.

57. Dye C. (1986) Vectorial capacity: must we measure all its components? *Parasitology Today,* **2,** 203–209.

58. Easterday BC, McGavran H, Roonry JR, Murphy LC. (1962) The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs. *American Journal of Veterinary Research*, **23** : 470-479.

59. Edwards, F.W. (1941) *Mosquitoes of the Ethiopian region. III Culicine Adults and Pupae*. British Museum (Natural History), London.

60. Elizondo-Quiroga A, Flores-Suarez A, Elizondo-Quiroga D, Ponce-Garcia G, Blitvich BJ, Contreras-Cordero JF, Gonzalez-Rojas JI, Mercado-Hernandez R, Beaty BJ, Fernandez-Salas I. (2006) Gonotrophic cycle and survivorship of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, northeastern Mexico. *The American Journal of Mosquito Control and Association,* **22,** 10–14.

61. EMPRES-FAO Le Bulletin EMPRES des maladies animales transfrontalières. *Bulletin* N°9- Mars 1999.

62. Ernek E, Kozuch O, Gresikova M, Nosek J, Sekeyova M, (1973) Isolation of Sindbis virus from the reed warbler (Acrocephalus scirpaceus) in Slovakia. *Acta Virologica* **17,** 359-61.

63. Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, Sall AA. (2014) Vector Competence of Culex neavei and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* **90 (4),** 747–754

64. Fall AG, Diaite A, Seck MT, Bouyer J, Lefrancois T, Vachiery N, Aprelon R, Faye O, Konate L, Lancelot R. (2013) West Nile virus transmission in sentinel chickens and potential mosquito vectors, Senegal River Delta, 2008-2009. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **10,** 4718-27.

65. Failloux A. B., M. Vazeille, and F. Rodhain. (2002) Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution,* **55,** 653_63.

66. Failloux A. B., M. Vazeille_Falcoz, L. Mousson, and F. Rodhain. 1999. [Genetic control of vectorial competence in *Aedes* mosquitoes]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique,* **92,** 266_73.

67. Faran ME, Turell MJ, Romoser WS, Routier RG, Gibbs PH, Cannon TL, Bailey CL. (1987) Reduced survival of adult *Culex pipiens* infected with Rift-Valley fever virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **37,** 403– 409.

68. Faye O, Ba H, Ba Y, Freire CC, Faye O, Ndiaye O, Elgady IO, Zanotto PM, Diallo M, Sall AA. (2014) Reemergence of Rift Valley fever, Mauritania, 2010. *Emerging Infectious Diseases,* **20,** 300-3.

69. Faye O, Diallo M, Diop D, Bezeid OE, Ba H, Niang M, Dia I, Mohamed SA, Ndiaye K, Diallo D, Ly PO, Diallo B, Nabeth P, Simon F, Lo B, Diop OM. (2007) Rift Valley fever outbreak with East-Central African virus lineage in Mauritania, 2003. *Emerging Infectious Diseases* **13,** 1016-23.

70. Fernandez-Pinero J, Davidson I, Elizalde M, Perk S, Khinich Y, Jimenez-Clavero MA, 2014. Bagaza virus and Israel turkey meningoencephalomyelitis virus are a single virus species. *Journal of General Virology* **95,** 883-7.

71. Filone CM, Heise M, Doms RW, Bertolotti-Ciarlet A. (2006) Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. Virology, **356,** 155–164.

72. Fontenille D, Traore-Lamizana M, Diallo M, Thonnon J, Digoutte JP, Zeller HG (1998) New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerging Infectious Diseases,* **4,** 289-93.

73. Fontenille D, Traore-Lamizana M, Zeller H, Mondo M, Diallo M, Digoutte JP. (1995) Short report: Rift Valley fever in western Africa: isolations from Aedes mosquitoes during an interepizootic period. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **52,** 403-4.

74. Fontenille D, Diallo M, Mondo M, Ndiaye M, Thonnon J, Lagno. (1997) First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **91 (5).**

75. Gamino V, Gutierrez-Guzman AV, Fernandez-de-Mera IG, Ortiz JA, Duran-Martin M, de la Fuente J, Gortazar C, Hofle U. (2012) Natural Bagaza virus infection in game birds in southern Spain. *Veterinary Research,* **43,** 65.

76. Garcia-Bocanegra I, Zorrilla I, Rodriguez E, Rayas E, Camacho L, Redondo I, Gomez-Guillamon F. (2013) Monitoring of the Bagaza virus epidemic in wild bird species in Spain, 2010. *Transboundary and Emerging Diseases,* **60,** 120-6.

77. Garrett-Jones, C. (1964) The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin of the World. Health Organization,* **30,** 241-261.

78. Garry CE, Garry RF. (2004) Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theoretical Biology and Medical Modeling,* **1,** 10.

79. Gerdes GH. (2004) Rift Valley fever. *Revue Scientifique et Technique,* **23,** 613-23.

80. Gerrard, SR, Bird, BH, Albarino, CG, Nichol, ST. (2007) The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. *Virology*, **359 (2),** 459–465.

81. Giorgi, C., Accardi, L., Nicoletti, L., Gro, M.C., Takehara, K., Hilditch, C., Morikawa, S., Bishop, D.H. (1991) Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology.* **180 (2),** 738_753.

82. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. (2002) Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases,* **8,** 1385-91.

83. Gonzalez JP, Le Guenno B, Some MJ, Akakpo JA. (1992) Serological evidence in sheep suggesting Phlebovirus circulation in a Rift Valley fever enzootic area in Burkina Faso. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **86 (6),** 680-682.

84. Gonzalez HA, Knudson DL, 1987. Genetic relatedness of corriparta serogroup viruses. *Journal of General Virology,* **68 (3),** 661-72.

85. Gora, D., Y. Thiongane, Jocelyn T, Didier F, Maoulouth D, Amadou S, Ruel TD & Gonzalez JP. (2000) The potential role of rodents in the enzootic cycle of Rift Valley Fever virus in Senegal. *Microbes and Infection,* **2,** 343_346.

86. Gordon SW, Tammariello RF, Linthicum KJ, Dohm DJ, Digoutte JP, Calvo-Wilson MA. (1992) Arbovirus isolations from mosquitoes collected during 1988 in the Senegal River basin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **47,** 742-8.

87. Grimstad, P.R., Ross, Q. E., and Craig, G. B., Jr. (1980) *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *Journal of Medical Entomology,* **17,** 1-7.

88. Gu W, Unnasch TR, Katholi CR, Lampman R, Novak RJ, 2008. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **102,** 817-22.

89. Gubler DJ, 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research,* **33,** 330-42.

90. Hamon, J., Sales, S., Coz, J., Ouedraogo, C.S., Dyemkouma, A. & Diallo, B. (1964) Observations sur les préférences alimentaires des moustiques de Haute Volta. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique,* **57,** 1133-1150.

91. Hardy J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer, and W. C. Reeves. (1983) Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology,* **28**, 229_62.

92. Hayes CG, Basit A, Bagar S, Akhter R. (1980) Vector competence of Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *Journal of Medical Entomology* **17,** 172-7.

93. Hennessy, K.J. & Whetton, P. (1997) *Development of Australian Climate Change Scenarios*. *Australian Medical Association and Greenpeace International,* Canberra.

94. Hunter P., Erasmus B.J & Voster J.H. (2002) Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley Fever Virus (MP12) in scheep. *Journal of Veterinary Research,* **69,** 95–98.

95. Ikegami T. (2012) Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Research,* **95,** 293–310

96. Inoue S., Morita K. et al., 2003. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *Journal of Medical Primatology,* **32,** 89_94

97. Iranpour M, Turell MJ, Lindsay LR. (2011) Potential for Canadian mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **27,** 363–369.

98. Jouan A, Le Guenno B, Digoutte JP, Philippe B, Riou O, Adam F. (1988) An RVF epidemic in Southern Mauritania. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie,* **139,** 307-308.

99. Julvez, J. & Mouchet, J. (1994) Peuplement culicidien des les du Sud-Ouest de l'Océan Indien. L'action de l'homme dans l'importation des espèces d'intérêt médical. *Annales de la Société Entomologique de France,* **30,** 391-401.

100. Jupp, P.G., Kemp, A., Grobbelaar, A.A., Leman, P.A., Burt, F.J., Alahmed, A.M., Al Mujalli, D., Al Khamees, M. & Swanepoel, R. (2002) The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies. *Medical and Veterinary Entomology,* **16(3)**, 245-252.

101. Jupp, P.G. & Kemp, A. (1992) Aedes albopictus and other mosquitoes imported in tyres into Durban, South Africa. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **8**, 321- 2.

102. Jupp, P.G. & Cornel, A.J. (1988) Vector competence tests with Rift Valley fever virus and five South African species of mosquito. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **4(1)**, 4-8.

103. Jupp PG, McIntosh BM, Blackburn NK, 1986. Experimental assessment of the vector competence of Culex (Culex) neavei Theobald with West Nile and Sindbis viruses in South Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **80,** 226-30.

104. Jupp, P.G., McIntosh, B.M. & Thompson, D.L. (1984) Mechanical transmission of Rift Valley fever by mosquitoes. *South African Journal of Science,* **80,** 276.

105. Juricova Z, Mitterpak J, Prokopic J, Hubalek Z. (1986) Circulation of mosquito-borne viruses in large-scale sheep farms in eastern Slovakia. *Folia Parasitologica,* (Praha) **33,** 285-8.

106. Kading RC, Crabtree MB, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, Horiuchi K, Biggerstaff BJ, Miller BR. (2014) Deletion of the NSm virulence gene of Rift Valley fever virus inhibits virus replication in and dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* **8 (2),** 2670.

107. Kalveram B, Lihoradova O, Ikegami T. (2011) NSs Protein of Rift Valley Fever virus promotes posttranslational downregulation of the TFIIH. *Journal of Virology,* **85,** 6234–6243.

108. Kamal, S.A., 2009. Pathological studies on postvaccinal reactions of Rift Valley feverin goats. *Virology Journal,* **6,** 94.

109. Kaschula V. R., Van dellen A. F., Devos V. (1978) Some infectious diseases of wild vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*) in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association,* **49,** 223_227.

110. Karabatsos N. (1985) International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates.

111. Kokernot RH, McIntosh BM, Worth CB. (1961) Ndumu virus, a hitherto unknown agent, isolated from culicine mosouitoes collected in northern Natal. Union of South Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **10,** 383-6.

112. Kolodziejek J, Pachler K, Bin H, Mendelson E, Shulman L, Orshan L, Nowotny N. (2013) Barkedji virus, a novel mosquito-borne flavivirus identified in *Culex perexiguus* mosquitoes, Israel, 2011. *Journal of General Virology,* **94,** 2449-57.

113. Kozuch O, Labuda M, Nosek J. (1978) Isolation of sindbis virus from the frog Rana ridibunda. *Acta Virologica,* **22,** 78.

114. Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, Glaser C, Miller JR. (2001) West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerging Infectious Diseases,* **7,** 722-5.

115. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB, (1998) Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of Virology,* **72,** 73-83.

116. Kurkela S, Ratti O, Huhtamo E, Uzcategui NY, Nuorti JP, Laakkonen J, Manni T, Helle P, Vaheri A, Vapalahti O. (2008) Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, Finland. *Emerging Infectious Diseases,* **14,** 41-7.

117. Kurkela S, Helve T, Vaheri A, Vapalahti O. (2008) Arthritis and arthralgia three years after Sindbis virus infection: clinical follow-up of a cohort of 49 patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases,* **40,** 167-73.

118. Laughlin LW, Meegan JM, Strausbaugh LJ, Morens DM, Watten RH. (1979) Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **73,** 630-3.

119. Lee JH, Rowley WA, Platt KB. (2000) Longevity and spontaneous flight activity of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) infected with western equine encephalomyelitis virus. *Journal of Medical Entomology,* **37,** 187– 193.

120. Lefèvre PC. Fièvre de la Vallée du Rift. Dans. (2003) Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes I : Généralités Maladies Virales. *Lavoisier*. 643-657.

121. Lefèvre PC. (1989) La fièvre de la vallée du Rift. *Annales de Médecine Vétérinaire,* **133,** 453-463.

122. Linthicum K, Anyamba A, Tucker C, Kelley P, Myers M, Peters C, 1999. Climate and Satellite Indicators to forecast Rift Valley Fever Epidemics in Kenya. *Science,* **285,** 397-400.

123. Linthicum, K.J., Davies, F.G., Kairo, A. & Bailey, C.L. (1985) Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an interepidemic period in Kenya. *Journal of Hygiene,* **95**, 197-209.

124. Lokugamage N, Freiberg AN, Morrill JC, Ikegami T. (2012) Genetic subpopulations of Rift Valley fever virus strains ZH548 and MP-12 and recombinant MP-12 strains. *Journal of Virology,* **86 (24),** 13566-75.

125. Lundstrom JO, Lindstrom KM, Olsen B, Dufva R, Krakower DS. (2001) Prevalence of sindbis virus neutralizing antibodies among Swedish passerines indicates that thrushes are the main amplifying hosts. *Journal of Medical Entomology,* **38,** 289-97.

126. Lutomiah J, Ongus J, Linthicum KJ, Sang R, (2014) Natural vertical transmission of ndumu virus in Culex pipiens (Diptera: Culicidae) mosquitoes collected as larvae. *Journal of Medical Entomology,* **51,** 1091-5.

127. Luz PM, Codec¸o CT, Massad E, Struchiner CJ (2003) Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* **87,** 871– 878.

128. Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, Mishkhas AA, Al-Rabeah AM, Turkistani AM, Al-Sayed MO, Abodahish AA, Khan AS, Ksiazek TG, Shobokshi O. (2003) Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clinical Infectious Diseases,* **37,** 1084-92.

129. Mahmood F, Reisen WK, Chiles RE, Fang Y. (2004) Western equine encephalomyelitis virus infection affects the life table characteristics of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **41,** 982–986.

130. Malherbe H, Strickland-Cholmley M, Jackson AL. (1963) Sindbis virus infection in man. Report of a case with recovery of virus from skin lesions. *South African Medical Journal* **37,** 547-52.

131. MARCHOUX E. et SIMOND P.L. (1905) La transmission héréditaire du virus de la fièvre jaune chez le Stegomyia fasciata. Comptes Rendus de la Société de Biologie (Paris), **59**, 259- 260.

132. Masembe C, Michuki G, Onyango M, Rumberia C, Norling M, Bishop RP, Djikeng A, Kemp SJ, Orth A, Skilton RA, Stahl K, Fischer A. (2012) Viral metagenomics demonstrates that domestic pigs are a potential reservoir for Ndumu virus. *Virology Journal,* **9,** 218.

133. McIntosh BM. (1985) Usutu (SA Ar 1776), nouvel arbovirus du groupe B. *International Catalogue of Arboviruses,* **3,** 1059-1060.

134. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I, Barnard JH. (1980) Vector studies on Rift Valley fever virus in South Africa. *South African Medical Journal*, **58,** 127-132.

135. McIntosh BM, Dickinson DB, Dos Santos I. (1973a.) Rift Valley fever. 3. Viremia in cattle and sheep. 4. The susceptibility of mice and hamsters in relation to transmission

of virus by mosquitoes. *Journal of South African Veterinary Medicine and Association,* **44,** 167-169.

136. McIntosh BM. (1972) Rift Valley fever. 1. Vector studies in the field. *Journal of the South African Veterinary Medicine Association,* **43,** 391-5.

137. McManus, T.J., Russell, R.C., Wells, P.J., Clancy, J.G., Fennell, M. & Cloonan, M.J. (1992) Further studies on the epidemiology and effects of Ross River virus in Tasmania. *Arbovirus Research Australia,* **6**, 68–72.

138. McMichael, A.J., Haines, A., Kovats, R.S. & Slooff, R. (1996) *Climate Changes and Human Health*. WHO, Geneva.

139. Meegan JM, Bailey CJ. (1989) Rift Valley Fever. Dans: Monath TP. The Arboviruses : Epidemiology and Ecology IV. *CRC Press Inc., Boca Raton,* FI.

140. Meegan JM, Digoutte JP, Peters CJ, Shope RE. (1983) Monoclonal antibodies to identify Zinga virus as Rift Valley Fever virus. *The Lancet,* **8325 (1),** 641.

141. Meegan, JM, Khalil, GM, Hoogstraal, H, Adham, FK. (1980) Experimental transmission and field isolation studies implicating Culex pipiens as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **29,** 1405–1410.

142. Mellor P. S. (2000) Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology,* **123,** 231_47.

143. Miller B. R, Godsey MS, Crabtree MB, Savage HM, Al-Mazrao Y, Al-Jeffri MH, Abdoon A-MM, Al-Seghayer SM, Al-Shahrani AM, Ksiazek TG. (2002) Isolation and Genetic Characterization of Rift Valley fever virus from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia. *Emerging Infectious Diseases*, **8 (12),** 1492-1494.

144. Miller B. R., Nasci R. S., Godsey M. S., Savage H. M., Lutwama J Robert S. Lanciotti, and Clarence J. Peters. J. (2000) First field evidence for natural vertical transmission of

West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *The American Journal of Tropical Medical and Hygiene,* **62,** 240_246.

145. Mims, C. A., Day, M. F., and Marshall, I. D. (1966) Cytopathic effect of Semliki Forest virus in the mosquito *Aedes aegypti. The American Journal of Tropical Medical and Hygiene,* **15,** 775- 784.

146. Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Anderson JF, Vossbrinck CR. (2006) Host feeding patterns of Culex mosquitoes and West Nile virus transmission, Northeastern United States. *Emerging Infectious Diseases,* **12,** 468–474.

147. Monath TP, (1988) The Arboviruses: Epidemiology and Ecology: Boca Raton: CRC Press.

148. Moncayo AC, Edman JD, Turell MJ. (2000) Effect of eastern equine encephalomyelitis virus on the survival of *Aedes albopictus, Anopheles quadrimaculatus,* and *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology,* **37,** 701–706.

149. Monlun E, Zeller H, Le Guenno B, Traoré-Lamizana M, Hervy JP, Adam F, Ferrera L, Fontenille D, Sylla R, Mondo M, Digoutte JP. (1993) [Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique,* **86 (1),** 21-28.

150. Morrill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997) Safety and efficacy of mutagen- attenued Rift Valley Fever Virus vaccine in cattle. *American Journal of Veterinary Research,* **58 (10),** 1104-1109.

151. Morrill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997) Safety of mutagen- attenued Rift Valley Fever Virus vaccine in a fetal and neotanal bovids. *American Journal of Veterinary Research* **58 (10),** 1110-1114.

152. Morrill J. C., McClain D. J. (1996) Epidemiology and pathogenesisof Rift Valley fever and other Phlebovirus. *In "The Bunyaviridae". RM Elliot, ED Springer verlag/berlin*: 159_188.

153. Morrill J.C, Carpenter L., Taylor D., Ransburg H.H., Quance J. & Peters C.J. (1991) Further evaluation of a mutagen-attenued RVF vaccine in sheep. *Vaccine*, **9,** 35 - 41.

154. Morvan J., Rollin P. E., Laventure S., Rakotoarivony I. & Roux J.. (1992a) RVF epizootic in the central highlands of Madagascar. *Research in Virology*, **143,** 407-415.

155. Morvan J, Rollin PE, Laventure S, Rakotoarivony I, Roux J. (1992[b]) Rift Valley fever epizootic in the central Highlands of Madagascar. *Research in Virology*, **143 (6),** 407-415.

156. Morvan J, Lesbordes JL, Rollin PE, Mouden JC, Roux J. First fatal human case of Rift Valley fever in Madagascar. *Res. Virol*., 1992[c] May-June; **86 (3),** 320.

157. Moutailler S, Krida G, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB. (2008) Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **8,** 749–54.

158. Moutailler, S., Bouloy, M. & Failloux, A.B. (2007) Efficient oral infection of *Culex pipiens*
quinquefasciatus by rift valley fever virus using a cotton stick support. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**, 827 - 829.

159. Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, Bouloy M. (1995) Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53,** 405-11.

160. Nabeth, P., Kane, Y., Abdalahi, M., Diallo, M., Ndiaye, K., Ba, K., Schneegans, F., Alpha Sall, A. & Mathiot, C. (2001) Rift Valley Fever outbreak, Mauritania, 1998:

Seroepidemiologic, virologic, entomologic and zoologic investigations. *Emerging Infectious Diseases,* **7**, 1052-1054.

161. Nderitu L, Lee JS, Omolo J, Omulo S, O'Guinn ML, Hightower A, Mosha F, Mohamed M, Munyua P, Nganga Z, Hiett K, Seal B, Feikin DR, Breiman RF, Njenga MK. (2011) Sequential Rift Valley fever outbreaks in eastern Africa caused by multiple lineages of the virus. *The Journal of Infectious Diseases,* **203,** 655-65.

162. Nikolay B, Diallo M, Faye O, Boye CS, Sall AA. (2012) Vector competence of Culex neavei (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **86,** 993-6.

163. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. (2011) Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Diseases,* **11,** 1417-23.

164. Ochieng C, Lutomiah J, Makio A, Koka H, Chepkorir E, Yalwala S, Mutisya J, Musila L, Khamadi S, Richardson J, Bast J, Schnabel D, Wurapa E, Sang R. (2013) Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. *Virology Journal*, **10,** 140.

165. Olloy A, Zeller H, Massoumou A, Akakpo AJ. (1994) Epidémiologie de la fièvre de la vallée du Rift en Afrique tropicale. 3. Enquête sérologique au Congo. *Revue de Medecine Vet*érinaire, **145 (10),** 729-733.

166. Ould El Mamy AB, Ould Baba M, Barry Y, Isselmou K, Dia ML, Ba H, Diallo MY, Ould Brahim El Kory M, Diop M, Lo MM, Thiongane Y, Bengoumi M, Puech L, Plee L, Claes F, De La Rocque S, Doumbia B. (2011) Unexpected Rift Valley Fever Outbreak, Northern Mauritania. *Emerging Infectious Diseases,* **17,** 1894-1896.

167. Patrican, L.A., DeFoliart, G. R., and Yuill, T. M. (1985) La Crosse viremias in juvenile, subadult and adult chipmunks *(Tamias striatus)* following feeding by transovarially-infected *Aedes triseriatus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **34,** 596-602.

168. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini A, Tagliazucchi S, Savini G, Monaco F, Simone M, Lelli R, Rumpianesi F. (2009) First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveillance*, **14**.

169. Pepin M. (2011) Fièvre de la Vallée du Rift. *Medecine et maladies infectieuses,* 1_8.

170. Perez AM, Medanic RC, Thurmond MC. (2010) Rift Valley fever outbreaks in South Africa. *Veterinary Record*, 166: 798.

171. Peters CJ. (1997) Emergence of Rift Valley fever. Dans: Saluzzo JF, Dodet B. Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases. Elsevier. Paris.

172. Platt, K.B., K.J. Linthicum, K.S.A. Myint, B.L. Innis, K. Lerdthusnee, and D.W. Vaughn. (1997) Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **57,** 119-125.

173. Prehaud C, Bouloy M. (1997) La fièvre de la vallée du Rift – Un modèle d'étude des fièvres hémorragiques virales. *Annales de l'Institut Pasteur,* **8 (3),** 233-244.

174. Putman, J.L. and T.W. Scott. 1995. Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 225-227.

175. Reeves, W. C. (2001) Partners: serendipity in arbovirus research. *Journal of Vector Ecology*, **26**, 1–6.

176. Reeves, W. C. (1969) Evolving concepts of encephalitis prevention in California. *Proceedings of the Californian Mosquito Control Association,* **37,** 3-6.

177. Reeves, W. C. (1968) A review of developments associated with the control of western equine and St. Louis encephalitis in California during 1967. *Proceedings of the Californian Mosquito Control Association,* **36**, 65-70.

178. Reeves, W. C. (1965) Ecology of mosquitoes in relationship to arboviruses. *Annual Review of Entomology*, **10,** 25-46.

179. Reiskind MH, Lounibos LP. (2009) Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, **23,** 62–68.

180. Rickenbach, A. & Mouchet, J. (1981) Les diptères hématophages vecteurs d'arbovirus en
Afrique. *Médecine Tropicale*, **41 (1)**, 13-22.

181. Rodhain, F. (1998) La notion de réservoir naturel en arbovirologie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **91**, 279-282.

182. Rhodain, F. (1991) Le fonctionnement des systèmes virus-vecteurs. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*, **71 (1)**, 189-199.

183. Rhodain F. (1989) La transmission vectorielle. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **82,** 167_172.

184. Rhodain F, Hannoun C. (1979) Ecologie dynamique des systèmes virus-vecteurs. *Revue Epidémiologie et Santé Publique*, **27,** 399-408.

185. Romoser, W.S., Oviedo, M.N., Lerdthusnee, K., Patrican, L.A., Turell, M.J., Dohm, D.J., Linthicum, K.J. & Bailey, C.L. (2011) Rift Valley fever virus-infected mosquito ova and associated pathology: possible implications for endemic maintenance. Dove Journal Press 121-127.

186. Rosen L, Lien JC, Lu LC, 1989. A longitudinal study of the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult and larval Culex tritaeniorhynchus mosquitoes in northern Taiwan. *The American Journal of Troprical Medicine and Hygiene*, **40,** 557-60.

187. Rossi CA, TurellMJ. (1988) Characterization of attenuated strains of Rift Valley fever virus. *Journal of General Virology*, **69,** *817-823.*

188. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ (1964) Studier on the feeding response of mosquitoes to nutritive solution in a new membrane feeder. *Mosquito News*, **24,** 407-419.

189. Sall AA, (2001) Epidémiosurveillance de la FVR au Sénégal. Dans : Actes du séminaire sur la surveillance épidémiologique et le contrôle de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest (Mali-Mauritanie-Sénégal). Dakar, 9-12 avril. p. 17-19.

190. Sall AA, Zanotto PMA, Sene OK, Zeller HG, Digoutte JP, Thiongane Y, Bouloy M. (1999) Genetic reassortment of Rift valley fever virus in nature. *Journal of Virology*, **73 (10),** 8196-8200.

191. Sall AA, Zanotto PMA, Vialat P, Sene OK, Bouloy M. (1998[a]) Origin of 1997-98 Rift Valley fever outbreak in East Africa. *The Lancet*, **352 (9140),** 1596-1597.

192. Saluzzo J, Smith J: (1990) Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *Vaccine,* **8,** 369–375.

193. Saluzzo JF, Chartier C, Bada R, Martinez D, Digoutte JP. (1987) La fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. *Revue d'Elevage et de Medecine Vetérinaires des Pays Tropicale*, **40 (3),** 215-223.

194. Samuel PP, Arunachalam N, Rajendran R, Leo SV, Ayanar K, Balasubramaniam R, Tyagi BK (2010) Temporal variation in the susceptibility of Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) to Japanese encephalitis virus in an endemic area of Tamil Nadu, South India. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **10,** 1003-8.

195. Sanchez-Vizcaino F, Martinez-Lopez B, Sanchez-Vizcaino JM. (2013) Identification of suitable areas for the occurrence of Rift Valley fever outbreaks in Spain using a multiple criteria decision framework. *Veterinary Microbiology,* **165,** 71-8.

196. Sechan, Y., Lardeux, F., Loncle, S., Rivière, F. & Mouchet, J. (1993) Les arthropodes vecteurs de maladies et agents de nuisances en Polynésie française. Atlas de la Polynésie française. Orstom, planche **58.**

196. Service, M.W. (1993) *Mosquito ecology. Field sampling methods. Second edition. Vector*
Biology and Control. Liverpool School of Tropical Medicine. Liverpool, United Kingdom. Elsevier Applied Science, 988 pages.

197. Scott TW, Lorenz LH. (1998) Reduction of *Culiseta melanura* fitness by eastern equine encephalomyelitis virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **59,** 341–346.

198. Sindeko V. P. Grekov V. S. (1974) Ornitologiya. **11,** 356_360.

199. Sindato C, Karimuribo ED, Pfeiffer DU, Mboera LE, Kivaria F, Dautu G, Bernard B, Paweska JT, (2014) Spatial and temporal pattern of Rift Valley fever outbreaks in Tanzania; 1930 to 2007. PLoS One **9,** 88897.

200. Sissoko D., Giry C., Gabrie P., Tarantola A., Pettinelli F., Collet L., D'Ortenzio E., Renault P. & Pierre V. (2009) Rift Valley Fever, Mayotte, 2007–2008. *Emerging Infectious Diseases,* **15 (4),** 568 570.

201. Slatkin, M. (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecological Systematic*, **16,** 393-430.

202. Smithburn R. (1949) Rift valley fever: A neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *British Journal of Experimental Pathology,* **30 (1),** 1-16.

203. Snow WF, (1983) The attractiveness of some birds and mammals for mosquitoes in The Gambia, West Africa. Annals of tropical medicine and parasitology **77,** 641-651.

204. Sow A, Faye O, Ba Y, Ba H, Diallo D, Faye O, Loucoubar C, Boushab M, Barry Y, Diallo M, Sall AA. (2014) Rift Valley Fever Outbreak, Southern Mauritania, 2012. *Emerging Infectious Dis*eases, **20,** 296–299.

205. Styer, L.M., J.R. Carey, J-L. Wang, and T.W. Scott. (2007a) Mosquitoes do senesce: departure from the paradigm of constant mortality. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **76,** 111-117.

206. Styer, L.M., M.A. Meola, and L.D. Kramer. (2007c) West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. *Journal of Medical Entomology* **44,** 1074-1085.

207. Styer LM, Meola MA, Kramer LD. (2007) West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. *Journal of Medical Entomology,* **44,** 1074–1085.

208. Sudeep AB, Bondre VP, Mavale MS, Ghodke YS, George RP, Aher RV, Gokhale MD, (2013) Preliminary findings on Bagaza virus (Flavivirus: Flaviviridae) growth kinetics, transmission potential & transovarial transmission in three species of mosquitoes. *Indian Journal Medical of Research,* **138,** 257-61.

209. Sunit K. Singh, _Daniel Ruzek - 2013 - _Medical. Viral Hemorrhagic Fevers. https://books.google.fr/books?isbn=1439884315

210. Swanepoel R., Manning B., Watt J. A. (1979) Fatal Rift Valley fever of man in Rhodesia.
Central African Journal of Medicine, **25 (1),** 1_8.

211. Talla C, Diallo D, Dia I, Ba Y, Ndione JA, Sall AA, Morse A, Diop A, Diallo M. (2014) Statistical modelling of the abundance of vectors of West African Rift Valley fever in Barkédji, Senegal. *PLoS One,* **9 (12),** e114047

212. Taylor RM, Hurlbut HS, Work TH, Kingston JR, Frothingham TE. (1955) Sindbis virus: a newly recognized arthropod transmitted virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **4,** 844-62.

213. Team RC. (2013) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing.

214. Tesh, R. B. (1980) Experimental studies on the transovarial transmission of Kunjin and San Angelo viruses in mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **29,** 657-666.

215. Thiongane Y, Martin V. (2002) Système sous régional d'alerte et de contrôle de la Fièvre de la Vallée du Rift. FAO-EMPRES. Bulletin d'information N°6. Web: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAH/EMPRES/BullRVF/Bull6.htm>

216. Thonnon J, Picquet M, Thiongane Y, Lo M, Sylla R, Vercruysse J. (1999) Rift Valley fever surveillance in the lower Senegal river basin: update 10 years after the epidemic. *Tropical Medicine and International Health,* **4,** 580-585.

217. Traore-Lamizana M, Fontenille D, Diallo M, Ba Y, Zeller HG, Mondo M, Adam F, Thonon J, Maiga A. (2001) Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus. *Journal of Medical Entomology,* **38,** 480-92.

218. Traore-Lamizana M, Zeller HG, Mondo M, Hervy JP, Adam F, Digoutte JP, (1994) Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central Senegal (Ferlo). *Journal of Medical Entomology,* **31,** 934-8.

218. Tse. C et Capeau J. (2003) Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique,* **61,** 279-93

220. Turell MJ., William C. Wilson, and Kristine E. Bennett. (2010) Potential for North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit Rift Valley Fever Virus. *Journal of Medical Entomology,* **47 (5),** 884-889

221. Turell MJ, Dohm DJ, Mores CN, Terracina L, Wallette DL Jr, Hribar LJ, Pecor JE, Blow JA. (2008) Potential for North American mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **24 (4),** 502-507.

222. Turell MJ, Lee JS, Richardson JH, Sang RC, Kioko EN, Agawo MO, Pecor J, O'Guinn ML. (2007) Vector competence of Kenyan Culex zombaensis and Culex quinquefasciatus mosquitoes for Rift Valley fever virus. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **23,** 378–382.

223. Turell, M.J. & Kay, B.H. (1998) Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera:Culicidae) to Rift Valley fever virus. *Journal of Medical Entomology,* **35,** 132135.

224. TURELL And CI)YNTHIA A. ROSSI. (1991) Potential for Mosquito Transmission of Attenuated Strains of Rift Valley fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **44 (3),** 278-282

225. Turell M. J, Linthicum K. J & Beaman J. R. **(**1990) Transmission of Rift Valley fever virus by adult mosquitoes after ingestion of virus as larvae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **43,** 677_680.

Turell, M.J., Bailey, C.L. & Beaman, J.R. (1988 b) Vector competence of a Houston, Texas strain of Aedes albopictus for Rift Valley fever virus. *Journal of the American Mosquito Control Association,* **4 (1),** 94.

226. Turell MJ, Bailey CL. (1987) Transmission studies in mosquitoes (Diptera: Culicidae) with disseminated Rift Valley fever virus infections. *Journal of Medical Entomology,* **24,** 11-8.

227. Turell, M. J., Gargan II, T. P., and Bailey, C. L. (1985) *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) morbidity and mortality associated with Rift Valley fever virus infection. *Journal of Medical Entomology* **22,** 332-

228. Turell, M. J., Reeves, W. C., and Hardy, J. L. (1982) Transovarial and trans-stadia! Transmission of California encephalitis virus in *Aedes dorsalis* and *Aedes melanimon. Journal of the American Mosquito Control Association,* **31,** 1021-1029.

229. van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Johansen CA, Warrilow D, Ritchie SA. (2012) Evolution of mosquito-based arbovirus surveillance systems in Australia. *Journal of Biomedicine and* Biotechnology, 325659.

230. Van Velden DJ, Meyer JD, Oliver J, Gear JH, McIntosh B. (1977) Rift Valley fever affecting humans in South Africa: A clinico-pathological study. *South African Medical Journal,* **51,** 867-871.

231. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB. (2007) Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus* . *PLoS ONE,* **2,** 1168.

232. Wallace DB, Ellis CE, Espach A, Smith SJ, Greyling RR & Viljoen GJ. (2006) Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine,* **24,** 7181-7189.

234. Weaver SC, Reisen WK. (2010) Present and future arboviral threats. Antiviral Research **85,** 328-45.

235. Weaver SC, Lorenz LH, Scott TW. (1992) Pathological-changes in the midgut of *Culex tarsalis* following infection with western equine encephalomyelitis virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **47,** 691–701.

236. Whitfield, S. G., Murphy, F. A., and Sudia, W. D. (1973) St. Louis encephalitis virus: An ultrastructural study of infection in a mosquito vector. *Virology,* **56,** 70-87.

237. Whitehead RH, Doderty RL, Domrow R, Standfast HA, Wetters EJ. (1968) Studies of the epidemiology of arthropod-borne virus infections at Mitchell River Mission, Cape

York Peninsula, North Queensland. 3. Virus studies of wild birns, 1964-1967. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* **62,** 439-45.

238. Wilson ML, Chapman LE, Hall DB, Dykstra EA, Ba K, Zeller HG, Traore-Lamizana M, Hervy JP, Linthicum KJ, Peters CJ. (1994) Rift Valley fever in rural northern Senegal: human risk factors and potential vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **50,** 663-75.

239. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, Andau M, Spielman A, Gubler DJ. (2001) Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **64,** 310-6.

240. Wolfe N. D., Escalante A. A., Karesh W. B., A. Kilbourn, A. Spielman, and A. A. Lal. (1998) *Emerging Infectious Diseases,* **4,** 149_158.

241. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. (2007) NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus induced apoptosis. *Journal of Virology,* **81,** 13335–13345.

242. Won S., Ikegami, T., Peters, C. J., Makino, S. 2006. NSm and 78_kilodalton proteins of Rift Valley fever virus are nonessential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology* **80 (16),** 8274_ 8278.

243. Woods, C., Karpati, A., Grein, T., McCarthy, M., Gaturuku, P., Muchiri, E., Dunster, L., Henderson, A., Khan, A., Swanepoel, R., Bonmarin, I., Martin, L., Mann, L., Smoak, B., Ryan, M., Ksiazek, T., Arthur, R., Ndikuyeze, A., Agata, N. & Peters, C. (2002) An outbreak of Rift Valley fever in northeastern Kenya, 1997-1998. *Emerging Infectious Diseases*, **8 (2)**, 138-144.

244. Zeller HG, Fontenille D, Traore-Lamizana M, Thiongane Y, Digoutte JP. (1997) Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **56,** 265-72.

245. Zeller HG. (1993) Recent Rift Valley fever outbreaks and RVF virus circulation in Western Africa. Dans : World Health Organization : Consultation on recent

development in RVF (with the participation of FAO, OIE and IAFA). Teramo, Italy. 14-15.

246. Zeller HG[1], Traoré-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*, **143(2),** 101-2

247. Zhou G, Liang G, Li L. (1999) [Complete nucleotide sequence of the nonstructural gene of alphavirus YN87448 strain isolated in China and its relationship to other Sindbis viruses]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **13,** 314-20.

Ndiaye et al. Parasites & Vectors (2016) 9:94
DOI 10.1186/s13071-016-1383-y

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Vector competence of *Aedes vexans* (Meigen), *Culex poicilipes* (Theobald) and *Cx. quinquefasciatus* Say from Senegal for West and East African lineages of Rift Valley fever virus

El Hadji Ndiaye[1,2], Gamou Fall[3], Alioune Gaye[1,2], Ndeye Sakha Bob[3], Cheikh Talla[1], Cheikh Tidiane Diagne[1,2], Diawo Diallo[1], Yamar BA[1], Ibrahima Dia[1], Alain Kohl[4], Amadou Alpha Sall[3] and Mawlouth Diallo[1*]

Abstract

Background: Rift Valley fever virus (RVFV; *Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) is a mosquito–borne, zoonotic pathogen. In Senegal, RVFV was first isolated in 1974 from *Aedes dalzieli* (Theobald) and thereafter from *Ae. fowleri* (de Charmoy), *Ae. ochraceus* Theobald, *Ae. vexans* (Meigen), *Culex poicilipes* (Theobald), *Mansonia africana* (Theobald) and *Ma. uniformis* (Theobald). However, the vector competence of these local species has never been demonstrated making hypothetical the transmission cycle proposed for West Africa based on serological data and mosquito isolates.

Methods: *Aedes vexans* and *Cx. poicilipes,* two common mosquito species most frequently associated with RVFV in Senegal, and *Cx. quinquefasciatus*, the most common domestic species, were assessed after oral feeding with three RVFV strains of the West and East/central African lineages. Fully engorged mosquitoes (420 *Ae. vexans*, 563 *Cx. quinquefasciatus* and 380 *Cx. poicilipes*) were maintained at 27 ± 1 °C and 70–80 % relative humidity. The saliva, legs/wings and bodies were tested individually for the RVFV genome using real-time RT-PCR at 5, 10, 15 and 20 days post exposure (dpe) to estimate the infection, dissemination, and transmission rates. Genotypic characterisation of the 3 strains used were performed to identify factors underlying the different patterns of transmission.

Results: The infection rates varied between 30.0–85.0 % for *Ae. vexans*, 3.3–27 % for *Cx. quinquefasciatus* and 8.3–46.7 % for *Cx. poicilipes*, and the dissemination rates varied between 10.5–37 % for *Ae. vexans*, 9.5–28.6 % for *Cx. quinquefasciatus* and 3.0–40.9 % for *Cx. poicilipes*. However only the East African lineage was transmitted, with transmission rates varying between 13.3–33.3 % in *Ae. vexans*, 50 % in *Cx. quinquefasciatus* and 11.1 % in *Cx. poicilipes*. *Culex* mosquitoes were less susceptible to infection than *Ae. vexans*. Compared to other strains, amino acid variation in the NSs M segment proteins of the East African RVFV lineage human-derived strain SH172805, might explain the differences in transmission potential.

Conclusion: Our findings revealed that all the species tested were competent for RVFV with a significant more important role of *Ae. vexans* compared to *Culex* species and a highest potential of the East African lineage to be transmitted.

Keywords: Mosquito, Oral infection, Vector competence, Viral genetic diversity, Rift Valley fever virus, Senegal

* Correspondence: diallo@pasteur.sn
[1]Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220 Dakar, Senegal
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 Ndiaye et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Rift Valley fever virus (RVFV) is an emerging mosquito-borne, zoonotic pathogen in the genus *Phlebovirus* of the family *Bunyaviridae*. The virus, first isolated in 1930 in Kenya [1], is transmitted primarily through the bites of infected mosquitoes [2–4]. The genome of the virus consists of three negative-stranded RNA segments called large (L), medium (M), and small (S). Other modes of transmission include direct contact with the blood, organs, foetus, tissues or excretions of infected animals through exposure to aerosols. Rift Valley fever (RVF) in animals is characterised by high rates of abortion in pregnant females and deaths of young ruminants. The vast majority of human infections are asymptomatic, but symptomatic infections can lead to severe haemorrhages, meningoencephalitis, retinopathy and in some cases death [5–8]. The disease has cumulatively caused hundreds of thousands of human infections and the deaths of more than 2000 humans and millions of domestic animals in Kenya [9]. To date, no specific treatment against RVF is available. For humans, the available vaccine is restricted to the use for at-risk personnel only, as multiple inoculations are required to achieve protective immunity [10]. Several veterinary vaccine candidates were proposed (MP12, Clone 13, and the Smithburn neurotropic strain), but adverse effects were observed after vaccination [11–13]. Another candidate vaccine (R566) is still currently under investigation [14]. Recently, the MP-12 virus containing a deletion in the NSs gene proved promising as it prevented lethal disease when administered to hamsters [15]. Nonetheless, this new generation of genetically modified vaccines are not yet approved for use in humans or animals.

The recent expansion of RVFV from Africa into Saudi Arabia and Yemen in 2000, and the outbreaks recorded in Africa, particularly those in Mauritania in 2003, 2010 and 2012 [16–19], in Senegal in 2012 and 2013 [20], in Kenya [21, 22], and in Mayotte in 2008 [23], reflect the ongoing emerging potential of the virus. The introduction and spread of the virus into new areas were mainly linked to the migration of infected animals [24], but the dispersal of infected vectors could not be ruled out. As no specific treatment against the RVFV is available, prevention is key, and control of epidemics centred on vector control and the vaccination of cattle and populations at risk (i.e., veterinarians, slaughterhouse staff and medical surveillance personnel, among others).

In Senegal, RVFV was first isolated in 1974 from the mosquito *Ae. dalzieli* collected in Kedougou during a Yellow Fever (YF) surveillance programme. Following the first extensive RVFV outbreak in Mauritania in 1987, the active surveillance programme implemented resulted in the detection of several animal cases and also the isolation of the virus from several mosquito species, including *Ae. fowleri, Ae. ochraceus, Ae. vexans, Cx. poicilipes, Ma.. uniformis* and *Ma. africana* [25–27].

Based on isolates from mosquitoes and the sero-epidemiological data gathered from animals, a transmission cycle similar to that of East Africa was proposed for West Africa. However, this transmission cycle is still hypothetical, because specific entomological parameters such as vector competence of the local species of mosquito for RVFV remain to be determined [28]. Furthermore, although entomological surveillance provided essential information on circulation of the virus and ecology of the vectors, this approach did not determine the effect of RVFV amplification on human populations. Human cases of RVFV are still rare in Senegal [29]. The data generated during a trans-sectional study and following an epizootic event revealed a low seroprevalence of IgG in human populations that ranged from 14.02–22.3 % in 1989 in Yonoféré [30] and 6.12 % in Barkédji in 1993 [29]. The seroprevalence was from 5–26 % amongst children born after the 1987 epidemic, and 25.3 % amongst adults [28, 29]. A low seroprevalence of IgG against RVFV during an investigation of an epidemic was also recorded in Diawara, northern Senegal (5.2 %), and in the south of the country (≤3.1 %) in Kedougou, Tambacounda and Casamance [31–33]. Several factors could explain the difference in infection rates between animals and humans, including the efficiency of transmission by the vector or ecological parameters of the vector.

The purpose of the present study was to investigate the vector competence of *Ae. vexans* and *Cx. poicilipes,* the two most common mosquito species in the Barkédji area and the species most frequently associated with the RVFV in Senegal, and that of *Cx. quinquefasciatus*, the most common domestic species, for different strains and lineages of the RVFV.

Methods

Mosquito species

The mosquito species *Ae. vexans, Cx. poicilipes* and *Cx. quinquefasciatus* were collected in Barkédji (15°17′N, 14°53′W). *Aedes vexans* and *Cx. quinquefasciatus* were chosen as target organisms due to their widespread Afrotropical distribution and potential involvement in the transmission cycle of RVFV in Senegal and neighbouring countries [26, 28]. *Aedes vexans* is regularly found naturally infected with RVFV in West Africa [25, 27, 34], has a worldwide distribution and is a biting nuisance pest also in Europe and America. The wide distribution of *Ae. vexans* is a major concern because of the potential for RVFV to invade new geographic areas, as occurred during the epidemic / epizootic in Saudi Arabia [35, 36]. In West Africa, the abundance and the biology of *Ae. vexans*, including the close interactions with vertebrate hosts, highlight the potentially important role that this species may play in the transmission of RVFV.

Culex quinquefasciatus was selected because this species is the member of the *Cx. pipiens* complex best adapted to the tropical and sub-tropical regions. *Culex pipiens* was implicated in the transmission of RVFV during an outbreak in Egypt and on the Arabian Peninsula [36, 37]. In tropical regions, *Cx. quinquefasciatus* is ubiquitous, colonizing domestic environments year-round because of its association with artificial breeding sites. This species is abundant, anthropophagic and a competent vector for arboviruses in some geographic locations, making it a good candidate for the study of RVFV transmission in urban settings.

Culex poicilipes was targeted in this study as it is considered as one of the main vectors of RVFV in West Africa due to its abundance, bionomics and the number of RVFV strains isolated from this species in Senegal and Mauritania [26, 38]. In our previous studies, the dominance in abundance regularly switched between *Cx. poicilipes* and *Ae. vexans* in Barkédji [39, 40]. Feeding preference studies indicated that *Cx. poicilipes* was mainly attracted to bovines and sheep, adding further indication as to its vectorial potential [41].

Virus strains and preparation of the stocks

The three RVFV strains used in this study were isolated from goats (AnD133719), mosquitoes (ArD141967) (both West African lineages), and humans (SH172805, East/central African lineage) in Mauritania in the years 1998, 2000, and 2003, respectively (Table 1). The viral stock of each strain used to infect mosquitoes was prepared from the brains of suckling mice inoculated intracerebrally with 20 μl of the virus. Brains were triturated in Leibovitz-15 (L-15) medium (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) containing penicillin and streptomycin (Sigma, GmBh, Germany) and 10 % FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). After centrifugation, the suspension was aliquoted, and stored at −80 °C.

Experimental infection procedure

Three to five day-old F_1 generation female mosquitoes were starved for 48 h and then exposed for 1 h to an infectious blood meal, using the previously described artificial feeding method using a mouse skin membrane [42]. The infectious blood meal contained at equal volume, washed rabbit erythrocytes, foetal bovine serum (FBS) and the viral suspension of one of the three natural RVFV strains described above. As a phagostimulant, adenosine triphosphate (ATP) was added to a final concentration of 0.005 M. For each infection experiment, a sample of the virus-blood suspension was collected at the end of the mosquito feeding for virus titration. At the end of feeding, the mosquitoes were cold anaesthetised, and fully engorged specimens were selected and subsequently maintained in an incubator at 27 °C, a relative humidity of 70–80 % and 10 % sucrose for food. Between 25 and 40 individuals were randomly selected for each batch at 5 days post exposure (dpe), 25 to 50 at 10 dpe, 36 to 100 at 15 dpe, and 6 to 66 at 20 dpe (Fig. 3). Mosquitoes were again cold anaesthetised, and the legs and wings removed and put together in a tube. Each of these mosquitoes was then forced to salivate individually into a capillary tube containing FBS. After 15–20 min of salivation, the mosquitoes were removed, and the FBS-saliva mix was added into a vial containing 500 μl of L-15 medium.

Virus detection in mosquitoes

The mosquito bodies, legs/wings and collected saliva were stored separately at −80 °C until virus detection was attempted by real-time RT-PCR. All mosquito bodies as well as the legs/wings of infected bodies and saliva of infected legs/wings were tested for presence of virus. The samples were homogenised in 500 μl of L-15 cell culture medium containing 20 % FBS and were then centrifuged for 20 min at 10,000 rpm at 4 °C. For real-time PCR, 100 μl of supernatant was used for RNA extraction using the QIAamp Viral RNA Extraction Kit (QIAgen, Heiden, Germany), according to the manufacturer's protocol. The RNA was amplified using ABI Prism 7000 SDS Real-Time apparatus (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) with the QuantiTect kit (QIAgen).

The RT-PCR was performed in a 25 μl reaction volume containing 5 μl of extracted RNA (Triplicate), 2x QuantiTect Probe, RT-Master Mix, 10 μM of each primer and 200 nM of the probe. The specific primers and probe sequences for RVFV used were first described in Weidman et al. [43]. The thermal profile was as follows: a single cycle of reverse transcription for 10 min at 50 °C, 15 min at 95 °C for reverse transcriptase inactivation and DNA polymerase activation, and then 40 amplification cycles of 15 s at 95 °C and of 1 min at 60 °C

Table 1 RVFV strains used in this study, and titre of virus in the infectious blood meal after exposure

Virus strain	Host Origin	Geographic Origin	Year of isolation	Passage history	Lineage	Virus titer post exposure (PFU/ml)		
						Ae. vexans	*Cx. quinquefasciatus*	*Cx. poicilipes*
SHM172805	Human	Mauritania	2003	3	East/Central Africa	4.5×10^6	1.5×10^6	9.7×10^8
ArD141967	*Cx. poicilipes*	Mauritania	2000	4	West Africa	5.5×10^6	5.5×10^8	1.1×10^7
AnD133719	Goat	Mauritania	1998	7	West Africa	9.5×10^6	1.7×10^6	3×10^6

(annealing-extension step). Fluorescence was analysed at the end of the amplifications.

Viral RNA extraction, RT-PCR and sequencing

The RNA were extracted from the three viral stocks (AnD133719, SHM172805 and ArD141967) and were used as templates for RT-PCR. Specific primers (Table 2), the M-MLV system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the Go-Taq PCR Kit (Promega, Madison, WI, USA) were used for cDNA synthesis and amplification, according to the manufacturer's instructions. All primers used to amplify the S and M segments were designed according to RVFV sequences available in GenBank. Accession numbers of all RVFV sequences used to design the primers are presented in Additional file 1: Table S1. The PCR products of the expected sizes were purified directly from the agarose gel using a QIAgen Gel extraction kit and sequenced by Cogenics (Beckman Coulter Genomics, Essex, United Kingdom). Sequencing was performed in both directions, using the original reverse and forward primers as for the amplification.

Data analysis

Detection of RVFV in the mosquito bodies without the subsequent detection of the infection in the legs/wings was considered a non- disseminated infection, which was limited to the midgut. Conversely, detection of the virus in both the mosquito legs/wings and saliva indicated a disseminated infection from the midgut into the mosquito haemocoel and the potential for transmission, respectively. The infection rate (number of infected mosquito bodies per 100 mosquitoes tested), the dissemination rate (number of mosquitoes with infected legs/wing per 100 mosquitoes infected) and the transmission potential (number of mosquitoes with infected saliva per 100 mosquitoes with infected legs/wings) were calculated and compared for each mosquito species, according to dpe and the viral strains. Fisher's exact tests were performed to compare the rates of infection, dissemination and transmission using the R statistical software package (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Nucleotides sequences from Beckman Coulters were analysed and assembled with GeneStudio, version 2.2.0.0 (http://genestudio.com/). The amino acid sequences were then aligned using MEGA 5.05 software [44] to identify variable motifs between the human (SHM172805) and other strains that could explain the different patterns in the mosquito species tested.

Table 2 List of primers used

Nom	Segment	Position	Sequence	Tm
NSng	S	31–48	TATCATGGATTACTTTCC	48
NSca	S	841–824	CCTTAACCTCTAATCAAC	50
M1F	M	3–22	ACAAAGACCGGTGCAACTTC	53.9
M1R	M	1120–1140	CCAYGCAAAGGGTATGCAAT	53.2
M2F	M	1035–1054	TGAGGACTCTGAATTRCACCT	48.7
M2R	M	2395–2415	TCCAGAGAGTTGAGCCTTGC	53.3
MRV1a	M	3050–3068	CAAATGACTACCAGTCAGC	44.6
MRV2g	M	2262–2292	GGTGGAAGGACTCTGCGA	52.5
M3F	M	2979–2998	CAGTCCTCAGTGAGCYCATA	46.1
M3R	M	3763–3782	TCTCGGTTCTGGRGTGTGAA	52.5

Results

The sequences of the S and M segments of the coding region obtained for the three strains of virus were aligned using MEGA. Based on these alignments, variation in amino acids were observed in the NSs, NSm, Gc and Gn proteins of the human strain (SHM172805) compared to the two other strains (Figs. 1 and 2). This variability occurred primarily among amino acids of the same type (I/V/M and R/K) but also between amino acids of different types, acid/polar, polar/apolar, and aliphatic/aromatic (D/N, V/T, L/F respectively). The N-linked glycosylation sites of the envelope proteins were all conserved.

A total of 420 *Ae. vexans*, 563 *Cx. quinquefasciatus* and 380 *Cx. poicilipes* were tested for RVFV competence. All three virus strains (with virus titers ranging from 1.5×10^6 pfu/ml to 9.7×10^8 pfu/ml) infected the three species of mosquito and were disseminated, but only the East African lineage RVFV was capable of being transmitted by all three species. Infection rates varied between 30 and 85 % for *Ae. vexans*, 3.3–27 % for *Cx. quinquefasciatus* and 8.3–46.7 % for *Cx. poicilipes*. For each mosquito-virus combination, the infection rates were comparable at each dpe, as well between the different dpe. However, significant variation was detected when comparing the infection rates by the different virus strains at different dpe (Fig. 3 and Additional file 2: Table S2).

The infection rates of *Ae. vexans* with the ArD141967 strain were significantly lower than those with the SH172805 strain ($P \leq 0.04$). The same trend was observed between the ArD141967 and the AnD133719 strains ($P \leq 0.03$), except at 20 dpe ($P = 0.3$). However, no significant difference was recorded between the infection rates of AnD133719 and SH172805 ($P \geq 0.25$). With *Cx. quinquefasciatus*, the infection rates were similar between SH172805 and ArD141967 strains. AnD133719 was the only strain that exhibited infection rates significantly lower than those of the SH172805 strain ($P = 0.03$) and the ArD141967 strain ($P = 0.004$).

For *Cx. poicilipes*, no significant differences were observed irrespective of dpe ($P > 0.05$), except at 10 and 15 dpe with the ArD141967 strain ($P = 0.021$). Comparison

	75	111	133	141	151	167	202	217	239	242	250	251	253
NSs AEF79995.1| South Africa 1974	V	I	S	I	I	V	R	A	V	V	I	E	E
NSs ACE78446.1| Kenya 2007	A	.	N	.	.	.	.	.	I	.	M	.	G
NSs YP 003848706.1| Egypt 1977	A	.	N	.	.	A	K	V	I	I	M	.	.
NSs ACA14356.1| Mauritania 1988	A	.	N	.	V	.	K	.	I	.	M	D	G
NSs AnD133719	A	V	N	.	.	.	K	.	I	I	M	.	.
NSs ArD141967	A	.	N	.	.	.	K	.	I	I	M	D	.
NSs SHM172805	A	.	N	V	.	.	K	.	I	.	.	.	G

Fig. 1 Alignment of S segment. NSs proteins were aligned and variable amino acids were shown with their positions refer to the genome sequence of South Africa 1974 (Accession number: AEF79995.1). Human strain SHM172805 (East/Central African lineage) is in bold. Dots: conserved amino acids. Rectangles: variables amino acids in the human strain sequence compared to ArD141967 and AnD133719 (West African lineage)

A

	60	95	105	120
NSm YP003848705.1 Egypt 1977	I	D	G	R
NSm ACE78395.1 Kenya 2007	V	N	.	.
NSm AFD98306.1 South Africa 2009	.	.	.	.
NSm ACE78394.1 Kenya 2007	V	N	.	.
NSm AnD133719	.	.	.	.
NSm ArD141967	.	.	S	.
NSm SHM172805	V	N	.	.

B

	232	373	385	386	442	453	494	566	589	595	602	605	608	615	616	631	659
Gn YP003848705.1 Egypt 1977	L	V	M	D	I	K	R	D	V	I	I	R	K	R	K	I	V
Gn ACE78395.1 Kenya 2007	Q	.	.	.	.	.	.	G	I	T	V	.	.	.	.	V	A
Gn AFD98306.1 South Africa 2009	Q	.	I	.	.	.	.	G	.	V	.	K	R	K	.	V	A
Gn ACE78394.1 Kenya 2007	Q	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	V	.
Gn AnD133719	Q	.	.	G	.	R	.	G	.	V	.	K	.	K	.	V	A
Gn ArD141967	Q	.	.	.	.	.	Q	G	.	V	.	K	.	.	.	V	A
Gn SHM172805	Q	I	.	.	T	.	.	G	.	T	V	.	.	.	R	V	A

C

	685	687	739	747	848	850	860	872	954	1059	1185
Gc YP003848705.1 Egypt 1977	V	Y	E	I	R	F	T	T	I	S	L
Gc ACE78395.1 Kenya 2007	.	.	.	.	.	.	.	.	V	T	.
Gc AFD98306.1 South Africa 2009	I	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
Gc ACE78394.1 Kenya 2007	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
Gc AnD133719	.	H	D	M	.	.	S	I	.	T	F
Gc ArD141967	.	.	.	.	.	L	.	.	.	T	F
Gc SHM172805	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.

Fig. 2 Alignment of M segment. M proteins were aligned and variable amino acids in NSm, Gn and Gc proteins were shown with their positions refer to the genome sequence of Egypt 1977 (Accession number: YP003848705.1). Human strain SHM172805 is in bold. Dots: conserved amino acids. Rectangles: variables amino acids in the human strain sequence compared to ArD141967 and AnD133719

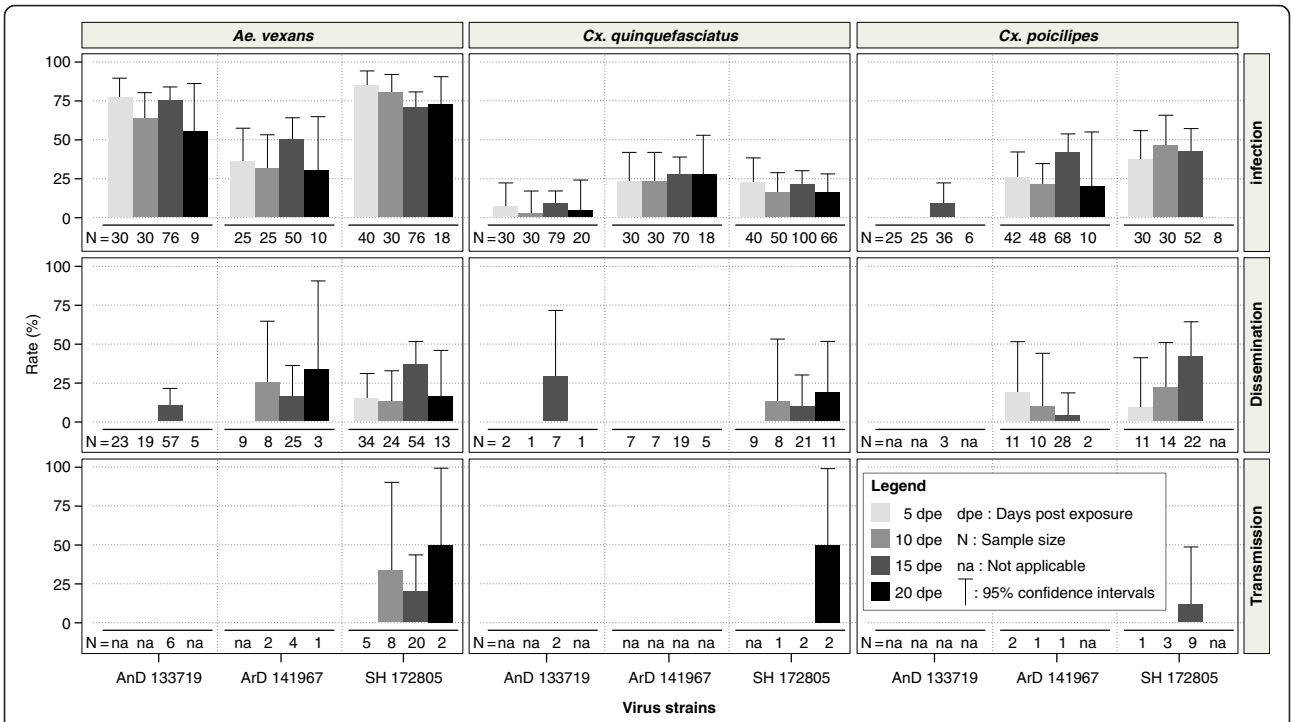

Fig. 3 RVFV infection, dissemination and transmission rates throughout incubation periods as indicated for *Ae. vexans, Cx. quinquefasciatus* and *Cx. poicilipes* that were orally exposed to infectious blood meal containing 10^6-10^8 PFU/ml virus suspension with RVFV strains SH72805, ArD14196 or AnD133719. N: number of specimens tested. dpe: day post exposure

among the viral strains revealed that at 10 dpe, the SH172805 strain was more infectious than the ArD141967 strain ($P = 0.016$), and at 15 dpe, the infection rate of the AnD133719 strain was significantly lower than both the ArD141967 ($P = 0.00049$) and SH172805 strain ($P = 0.0002$).

Based on a pairwise analysis of infection rates between the species, *Ae. vexans* was generally more susceptible to infection than *Cx. quinquefasciatus*. The unique exception was the infection obtained with the ArD141967 strain at 15 dpe, when the infection rate of *Ae. vexans* was significantly higher than that of *Cx. quinquefasciatus* ($P = 0.001$). Indeed using the same strain of virus, a comparable rate of infection was found for *Ae. vexans* and *Cx. quinquefasciatus* at 5, 10, and 20 dpe ($P \geq 0.3$).

Independent of the virus strain used, dissemination rates were relatively low for the three species of mosquitoes ranging from 10.5–37 % in *Ae. vexans,* from 9.5–28.6 % in *Cx. quinquefasciatus* and from 3–40.9 % in *Cx. poicilipes*. Dissemination was recorded relatively quickly in *Ae. vexans* at 5 dpe for the SH172805 strain but was delayed to 10, and 15 dpe, for the ArD141967 and AnD133719 strains, respectively. With the exception of the significant difference observed at 15 dpe between the AnD133719 and SH172805 strains ($P = 0.001$), the dissemination rates were comparable for all virus strains and incubation periods ($P \geq 0.07$). In *Cx. quinquefasciatus*, the dissemination rates remain similar irrespective of the dpe ($P \geq 0.1$). This species did not disseminate the ArD141967 strain, despite the high viral titres of 5.510^8 PFU/ml detected in the blood meal post-feeding. The observation was similar for *Cx. poicilipes*, which did not disseminate the animal strain (AnD133719).

For all mosquito species tested, only the SH172805 strain was transmitted (i.e. present in saliva) from 10 dpe and thereafter for *Ae. vexans*, 15 dpe for *Cx. poicilipes* and only after 20 dpe for *Cx. quinquefasciatus*. The transmission rates ranged from 13.–33.3 % for *Ae. vexans* and was 11.1 % for *Cx. poicilipes* and 50 % for *Cx. quinquefasciatus*, but the differences between the three species and the dpe were not significant ($P \geq 0.05$).

Discussion

Our study showed that the three mosquito species were susceptible to infection by the different RVFV strains with *Ae. vexans* mosquitoes being more susceptible than *Cx. poicilipes* or *Cx. quinquefasciatus*. The highest infection rates were obtained with *Ae. vexans*, which was also the only species that disseminated all the virus strains and transmitted the SH172805 strains at different dpe. Despite a lower viral titre ($\approx 10^6$ PFU/ml) in the blood meal post-feeding, the rates of infection, dissemination and transmission rates obtained were as high as those obtained in US populations of *Ae. vexans* that were

exposed to a viraemic animal that exceeded or was equal to $10^{8.5}$ PFU/ml [45]. The rates of infection, dissemination and transmission were 47.9–95.4 %, 10.3–60.8 % and 25–100 %, respectively. However, our results differed from those of other studies [46] that reported absence of competence after exposure to viral titres that ranged from $10^{7.9}$–10^{9} PFU/ml and led to an infection rate of only 15 % without dissemination or transmission. Geographical diversity in the competence of *Ae. vexans* has already been observed in populations from different localities in the USA. Populations from Louisiana and Florida exhibited 27 % transmission rates, whereas the rate of transmission in colonies from Colorado and California was only 1 % [47]. Indeed, the *Ae. vexans* complex includes three subspecies: *Ae. vexans vexans* (Meigen, 1830) found in Europe, *Ae. vexans nipponii* (Theobald, 1907) from eastern Asia, and *Ae. vexans arabiensis* (Patton, 1905) is the only representative in Africa. Because this study focused on only one strain of each mosquito species and vector competence of mosquito populations can vary spatially, our results may not apply to population from other regions of West Africa. Further studies are needed to evaluate the vector competence of other populations of these species for RVFV.

The low infection rates among the two *Culex* species observed in our study are consistent with previous results of *Cx. quinquefasciatus* from South Africa, Australia and the south-eastern United States [45, 47–50], with a maximum infection rate of 26 %, without dissemination and transmission. The low transmission rate (11.1 %) found here for *Cx. poicilipes* is similar to the results of a previous South African study at 15 dpe [51]. This transmission rate could become higher with longer incubation periods, as it was suggested that the South African population of *Cx. poicilipes* reached 80 % transmission after 30 days of extrinsic incubation.

Only the RVFV strain belonging to the East African lineage (SH172805) was transmitted. These observed variations were not caused by differences in viral titres because no significant correlation was observed between viral titres and infection rates. Contrary to our findings, Turell et al. [47] found that mosquito infection and dissemination rates were higher when mosquitoes were exposed to higher viral doses. This discordance could be explained by differences in mosquito strains and the experimental protocol.

The genetic variability of the virus strains used in our experiment could explain the differences in patterns of infection and transmission. The results of the sequence analysis of a portion of the genome at the L, M and S segments provided some support for this hypothesis. Indeed, in addition to classification into the East African lineage, the alignment of partial segments showed a number of differences between the M and S segments of the SH172805 strain to those of the other West African strains. Amino acid changes were detected in the NSs, NSm, Gc and Gn proteins of the human East African strain compared with those of the West African strains. Notably, the M segment proteins are essential and necessary for virus spread. Indeed the Gn and Gc proteins are implicated in the RVFV entry during infection, although the cell receptor remains unknown [52, 53]. The M segment proteins also play important roles in the assembly of the Golgi and the budding of viral particles [54]. It has been shown that the NSm protein has an anti-apoptotic function and a negative effect on virus development in the cell [55–57]. Additionally, NSm has been described to play a functional role in influencing vector competence for RVFV at the level of the midgut barrier [58]. The NSs protein acts on the antiviral response of mammalian cells by direct or indirect inhibition of transcription factor [59, 60]. Alone or combined, these two proteins (NSs and NSm) affect vector competence of some species by reducing the rate of infection or the potential to transmit the virus [61]. Therefore, the single amino acid mutations observed in all these proteins could influence the viral replication and lead to different patterns of transmission. A single amino acid mutation can indeed enhance transmission in a mosquito vector. In chikungunya virus, a single mutation (A226V) in the E1 glycoprotein enhanced viral transmission by *Ae. albopictus* [62, 63]. Further studies are required to assess the effects of these amino acid differences between RVFV strains. Studies with reassortant viruses from these strains or genetically engineered viruses could pinpoint what segment exactly carries determinants for the competence phenotype to further inform risk analysis. The lower susceptibility of *Cx. quinquefasciatus*, which is the most abundant domestic vector and a highly anthropophilic species may explain why human cases of RVFV are still rare in Senegal. Only the strain belonging to the East African lineage (SH172805) was transmitted, suggesting that this lineage is more infectious for mosquito vectors than the West African lineage in agreement with the fact than more RVFV outbreaks were observed in East Africa compared to West Africa.

Considering that *Ae. vexans, Cx. poicilipes* and *Cx. quinquefasciatus* exhibited a minimum EIP of 10, 15 and 20 days, respectively and given their estimated survival rates obtained from previous studies [64, 65], the infective life expectancy was estimated at between $(0.91)^{10}$ to $(0.96)^{10}$ for *Ae. vexans,* between $(0.70)^{15}$ to $(0.79)^{15}$ for *Cx. poicilipes,* and between $(0.871)^{20}$ and $(0.883)^{20}$ for *Cx. quinquefasciatus*. This means that 38.9–66.4 % of *Ae. vexans,* but only 0.5–2.9 % of *Cx. poicilipes* and 6.31–8.3 % of *Cx. quinquefasciatus* populations would be expected to survive long enough for transmission to

occur.**Conclusion**Our findings revealed that all the species tested were competent for RVFV with a significant more important role of *Ae. vexans* compared to *Cx. poicilipes* or *Cx. quinquefasciatus* and a highest potential of the East African lineage to be transmitted.

Additional files

Additional file 1: Table S1. GenBank accession numbers of Rift Valley Fever Virus sequences used to design the primers used in this study. (DOC 19 kb)

Additional file 2: Table S2. Mosquito tested, number infected, that disseminated and transmitted by species and Rift valley fever strains. (XLS 25 kb)

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
MD, AAS, AK conceived and designed the study. EN'D CTD, AG, DD, ID and YB carried out the fieldwork and the vector competence studies. GF, NDSB, AAS performed molecular and phylogenetic studies. CT carried the statistical analysis. EN'D, DD, GF and MD analysed the data and drafted the manuscript. All authors read, critically revised and approved the final manuscript.

Acknowledgements
This study was part of a project supported by the EMIDA ERA Net (contract N° 219235). AK, the project coordinator is funded by the UK MRC (grant number MC_UU_12014/8). The authors would like to thank Anna Bella Failloux Institut Pasteur, Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors for comments suggestions and critical review of the manuscript, Amadou Thiaw and Abdou Karim Bodian for their technical assistance in the insectary and all the population of Barkédji for their collaboration.

Author details
[1]Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220 Dakar, Senegal. [2]Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Dakar, Senegal. [3]Institut Pasteur de Dakar, Unité des Arbovirus et Virus de Fièvres hémorragiques, Dakar, Senegal. [4]MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow G61 1QHScotland, UK.

Received: 8 October 2015 Accepted: 16 February 2016
Published online: 20 February 2016

References
1. Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from East Africa. J Path Bact. 1931;34(4):545–79.
2. Lutomiah J, Omondi D, Masiga D, Mutai C, Mireji PO, Ongus J, et al. Blood meal analysis and virus detection in blood-fed mosquitoes collected during the 2006–2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014;14(9):656–64.
3. Arum SO, Weldon CW, Orindi B, Landmann T, Tchouassi DP, Affognon HD, et al. Distribution and diversity of the vectors of Rift Valley fever along the livestock movement routes in the northeastern and coastal regions of Kenya. Parasit Vectors. 2015;8:294.
4. Nepomichene TN, Elissa N, Cardinale E, Boyer S. Species diversity, abundance, and host preferences of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in two different ecotypes of Madagascar with recent RVFV transmission. J Med Entomol. 2015;52(5):962–9.
5. Easterday BC, McGavran H, Roonry JR, Murphy LC. The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs. Am J Vet Res. 1962;23:470–9.
6. Meegan JM, Bailey CL: Rift Valley fever in « Arboviruses Epidemiology and ecology » Edited by TP Monath CRC, Boca Raton, FL 1988;IV:51–76.
7. Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, Mishkhas AA, Al-Rabeah AM, Turkistani AM, et al. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. Clin Infect Dis. 2003; 37(8):1084–92.
8. Al-Hazmi A, Al-Rajhi AA, Abboud EB, Ayoola EA, Al-Hazmi M, Saadi R, et al. Ocular complications of Rift Valley fever outbreak in Saudi Arabia. Ophthalmology. 2005;112(2):313–8.
9. Murithi RM, Munyua P, Ithondeka PM, Macharia JM, Hightower A, Luman ET, et al. Rift Valley fever in Kenya: history of epizootics and identification of vulnerable districts. Epidemiol Infect. 2011;139(3):372–80.
10. Pittman PR, Liu C, Cannon TL, Makuch RS, Mangiafico JA, et al. Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. Vaccine. 1999;18:181–9.
11. Muller R, Saluzzo J-F, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, et al. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:405–11.
12. Saluzzo J, Smith J. Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. Vaccine. 1990;8:369–75.
13. Smithburn KC. Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. British J Exp Pathol. 1949;30:1–16.
14. Bouloy M, Flick R. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. Antiviral Res. 2009;84:101–18.
15. Gowen BB, Westover JB, Sefing EJ, Bailey KW, Nishiyama S, Wandersee L, et al. MP-12 virus containing the clone 13 deletion in the NSs gene prevents lethal disease when administered after Rift Valley fever virus infection in hamsters. Front Microbiol. 2015;6(651):1–8.
16. Faye O, Diallo M, Diop D, Bezeid OE, Bâ H, Niang M, et al. Rift Valley fever outbreak with East-Central African virus lineage in Mauritania, 2003. Emerg Infect Dis. 2007;13(7):1016–23.
17. Ould El Mamy AB. Ould Baba M, Barry Y, Isselmou K, Dia ML, Ba H, Diallo MY, Ould Brahim El Kory M, Diop M, Lo MM, Thiongane Y, Bengoumi M, Puech L, Plee L, Claes F, De La Rocque S, Doumbia B: Unexpected Rift Valley Fever Outbreak Northern Mauritania. Emerg Infect Dis. 2011;17:1894–6.
18. Faye O, Ba H, Ba Y, Freire CC, Faye O, Ndiaye O, et al. Reemergence of Rift Valley fever, Mauritania, 2010. Emerg Infect Dis. 2014;20:300–3.
19. Sow A, Faye O, Ba Y, Ba H, Diallo D, Faye O, et al. Rift Valley Fever Outbreak, Southern Mauritania, 2012. Emerg Infect Dis. 2014;20:296–9.
20. Sow A, Faye O, Faye O, Diallo D, Sadio BD, Weaver SC, et al. Rift Valley Fever in Kedougou, Southeastern Senegal, 2012. Emerg Infect Dis. 2014; 20(3):504–5.
21. Sang R, Kioko E, Lutomiah J, Warigia M, Ochieng C, O'Guinn M, et al. Rift Valley fever virus epidemic in Kenya, 2006/2007: The entomologic investigations. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(2 Suppl):28–37.
22. Tchouassi DP, Bastos AD, Sole CL, Diallo M, Lutomiah J, Mutisya J, et al. Population genetics of two key mosquito vectors of Rift Valley fever virus reveals new insights into the changing disease outbreak patterns in Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(12), e3364.
23. Sissoko D, Giry C, Gabrie P, Tarantola A, Pettinelli F, Collet L, et al. Rift Valley Fever, Mayotte, 2007–2008. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):568–70.
24. Munyua P, Murithi RM, Wainwright S, Githinji J, Hightower A, Mutonga D, et al. Rift Valley fever outbreak in livestock in Kenya, 2006–2007. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(2 Suppl):58–64.
25. Fontenille D, Traore-Lamizana M, Zeller H, Mondo M, Diallo M, Digoutte JP. Rift Valley fever in Western Africa: isolations from *Aedes* mosquitoes during an interepizootic period. Am J Trop Med Hyg. 1995;52:403–4.
26. Diallo M, Lochouarn L, Ba K, Sall AA, Mondo M, Girault L, et al. First isolation of the Rift Valley fever virus from *Culex poicilipes* (Diptera: Culicidae) in nature. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:702–4.
27. Ba Y, Sall AA, Diallo D, Mondo M, Girault L, Dia I, et al. Re-emergence of Rift Valley fever virus in Barkédji (Senegal, West Africa) in 2002–2003: identification of new vectors and epidemiological implications. J Am Mosq Control Assoc. 2012;28:170–8.
28. Zeller HG, Fontenille D, Traore-Lamizana M, Thiongane Y, Digoutte JP. Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal. Am J Trop Med Hyg. 1997;56:265–72.
29. Thonnon J, Picquet M, Thiongane Y, Lo M, Sylla R, Vercruysse J. Rift Valley fever surveillance in the lower Senegal river basin: update 10 years after the epidemic. Trop Med Int Health. 1999;4:580–5.

30. Wilson ML, Chapman LE, Hall DB, Dykstra EA, Ba K, Zeller HG, et al. Rift Valley fever in rural northern Senegal: human risk factors and potential vectors. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:663–75.
31. Saluzzo JF, Chartier C, Bada R, Martinez D, Digoutte JP. La fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1987; 40(3):215–23.
32. Zeller HG, Bessin R, Thiongane Y, Bapetel I, Teou K, Gbaguidi Ala M, et al. Rift Valley fever antibody prevalence in domestic ungulates in several West-African countries (1989–1992) following the 1987,Mauritanian outbreak. Res Virol. 1987;1995(146):14681–5.
33. Monlun E, Zeller H, Le Guenno B, Traoré-Lamizana M, Hervy JP, Adam F, et al. Digoutte JP: [Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal]. Bull Soc Pathol Exot. 1993;86(1):21–8.
34. Fontenille D, Traore-Lamizana M, Diallo M, Thonnon J, Digoutte JP, Zeller HG. New vectors of Rift Valley fever in West Africa. Emerg Infect Dis. 1998; 4(2):289–93.
35. Jupp PG, Kemp A, Grobbelaar AA, Leman PA, Burt FJ, Alahmed AM, et al. The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies. Med Vet Entomol. 2002;16(3):245–52.
36. Miller BR, Godsey MS, Crabtree MB, Savage HM, Al-Mazrao Y, Al-Jeffri MH, et al. Isolation and genetic characterization of Rift Valley fever from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia. Emerg Infect Dis. 2002;8(12):1492–4.
37. Meegan JM, Khalil GM, Hoogstraal H, Adham FK. Experimental transmission and field isolation studies implicating *Culex pipiens* as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:1405–10.
38. Diallo M, Nabeth P, Ba K, Sall AA, Ba Y, Mondo M, et al. Mosquito vectors of the 1998-19999 Rift Valley Fever (RVF) outbreak, and other arboviruses (Bagaza, Sanar, West Nile & Wesselsbron), in Mauritania & Senegal. Med Vet Entomol. 2005;2005(19):119–26.
39. Diallo D, Talla C, Ba Y, Dia I, Sall AA, Diallo M. Temporal distribution and spatial pattern of abundance of Rift valley fever and West Nile fever vectors in Barkédji, Senegal. J Vector Ecol. 2011;36:426–36.
40. Traore-Lamizana M, Fontenille D, Diallo M, Ba Y, Zeller HG, Mondo M, et al. Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkédji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus. J Med Entomol. 2001;38:480–92.
41. Ba Y, Diallo D, Dia I, Diallo M. Feeding pattern of Rift Valley Fever virus vectors in Senegal. Implications in the disease epidemiology. Bull Soc Pathol Exot. 2006;99:283–9.
42. Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare ML, Dia I, Sall AA. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2008;102:493–8.
43. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lo MM, et al. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. J Clin Virol. 2008;41(2):138–42.
44. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using *MEGA* version 5. Mol Biol Evol. 2011;28(10):2731–9.
45. Turell MJ, Dohm DJ, Mores CN, Terracina L, Wallette DL, Hribar LJ, et al. Potential for North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Rift Valley fever virus. J Am Mosq Control Assoc. 2008;24:502–7.
46. Iranpour M, Turell MJ, Lindsay LR. Potential for Canadian mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus. J Am Mosq Control Assoc. 2011;27:363–9.
47. Turell MJ, Wilson WC, Bennett KE. Potential for North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Rift Valley fever virus. J Med Entomol. 2010;47:884–9.
48. McIntosh BM, Jupp PG, Dos Santos I, Barnard JH. Vector studies on Rift Valley fever virus in South Africa. South Afr Med J. 1980;58:127–32.
49. Turell MJ, Kay B. Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus. J Med Entomol. 1998;35:132–5.
50. Turell MJ, Lee JS, Richardson JH, Sang RC, Kioko EN, Agawo MO, et al. Vector competence of Kenyan *Culex zombaensis* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Rift Valley fever virus. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23:378–82.
51. Jupp PG, Cornel AJ. Vector competence tests with Rift Valley fever virus land five South African species of mosquito. J Am Mosq Control Assoc. 1988;4(1):4–8.
52. Filone CM, Heise M, Doms RW, Bertolotti-Ciarlet A. Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. Virology. 2006;356:155–64.
53. Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). Theor Biol Med Model. 2004;1:10–26.
54. Carnec X, Ermonval M, Kreher F, Flamand M, Bouloy M. Role of the cytosolic tails of Rift Valley fever virus envelope glycoproteins in viral morphogenesis. Virology. 2014;448(5):1–14.
55. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus induced apoptosis. J Virol. 2007;81:13335–45.
56. Gerrard SR, Bird BH, Albarino CG, Nichol ST. The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. Virology. 2007;359(2):459–65.
57. Ikegami T. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. Antiviral Res. 2012;95:293–310.
58. Kading RC, Crabtree MB, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, Horiuchi K, et al. Deletion of the NSm virulence gene of Rift Valley fever virus inhibits virus replication in and dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):2670.
59. Kalveram B, Lihoradova O, Ikegami T. NSs Protein of Rift Valley Fever virus promotes posttranslational downregulation of the TFIIH. J Virol. 2011;85:6234–43.
60. Billecocq A, Spiegel M, Vialat P, Kohl A, Weber F, Bouloy M, et al. NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. J Virol. 2004;78:9798–806.
61. Crabtree MB, Kent Crockett RJ, Bird BH, Nichol ST, Erickson BR, Erickson BR, et al. Infection and transmission of Rift Valley Fever viruses lacking the NSs and/or NSm Genes in mosquitoes: Potential role for NSm in mosquito infection. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(5):1639.
62. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, Aedes albopictus. PLoS One. 2007;2:1168.
63. Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB. Dissemination and transmission of the E1-226 V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. PLoS One. 2013; 8(2):57548.
64. Ba Y, Diallo D, Kebe CM, Dia I, Diallo M. Aspects of bioecology of two Rift Valley fever virus vectors in Senegal (West Africa): *Aedes vexans* and *Culex poicilipes* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2005;42:739–50.
65. Elizondo-Quiroga A, Flores-Suarez A, Elizondo-Quiroga D, Ponce-Garcia G, Blitvich BJ, Contreras-Cordero JF, et al. Gonotrophic cycle and survivorship of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, northeastern Mexico. Am J Mosq Control Assoc. 2006;22:10–4.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE Open Access

Anopheles arabiensis seasonal densities and infection rates in relation to landscape classes and climatic parameters in a Sahelian area of Senegal

El Hadji Malick Ngom[1,2], Ndèye Diango Faye[2], Cheikh Talla[1,3], El Hadji Ndiaye[1,2], Jacques-André Ndione[4], Ousmane Faye[2], Yamar Ba[1], Mawlouth Diallo[1] and Ibrahima Dia[1*]

Abstract

Background: The influence of environmental and climatic factors on malaria vector bionomics and transmission is an important topic in the context of climatic change particularly at macro-geographical level. Sahelian areas could be particularly affected due to heterogeneous features including high inter-annual variability in rainfall and others associated parameters. Therefore, baseline information on the impact of environmental and climatic factors on malaria transmission at micro-geographical level is required for vector risk management and implementation of control strategies.

Methods: Malaria vectors were collected indoors by pyrethrum spray catches in 14 villages belonging to 4 different landscape classes (wooded savanna, shrubby savanna, bare soils and steppe) in the sylvo-pastoral area of Senegal. *Plasmodium falciparum* infection rates were determined using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: *An. arabiensis* was the predominant species in all landscape classes and was the only species collected at the end of the rainy season excepted in villages located in bare soils where it cohabited with *An. coluzzii*. Mean temperature and relative humidity showed similar variations in all the landscape classes covered whereas rainfall was more heterogeneous in terms of pattern, frequency and amount. The mean densities of *An. arabiensis* displayed high seasonal differences with peaks observed in August or September. A positive non-significant correlation was observed between *An. arabiensis* densities for rainfall and humidity whereas a negative non-significant correlation was reported for temperature. *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes were detected only in wooded savanna and bare soils villages.

Conclusions: These observations suggest key roles played by landscape classes and rainfall in malaria vector densities, infection rates and malaria transmission that could be more pronounced in villages situated in wooded savanna and bare soils. Due to the close relationship between environmental and meteorological parameters in this Sahelian region, additional studies on the impact of these parameters are required to further ascertain their association with entomological parameters involved in malaria transmission. From the public health point of view, such information could be useful for human population settlements as well as for monitoring and modelling purposes giving early warning system for implementation of interventions in these unstable transmission zones.

Keywords: *Anopheles arabiensis*, Sahelian area, Landscape classes, Climatic parameters, Malaria transmission

* Correspondence: dia@pasteur.sn
[1]Unité d'entomologie médicale, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220 Dakar, Senegal
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Ngom et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Many vector-borne diseases occur in tropical and subtropical areas where climatic and environmental conditions are favourable for their propagation [1]. The recent observations on climatic changes worldwide are causing panic and their impact on these diseases are still not well established. Many studies suggest that climate change would lead to a resurgence of vector-borne diseases like malaria [2,3] and it is well known that malaria transmission and prevalence could be highly influenced by spatial and temporal changes in the environment [4]. This is particularly important in non-endemic areas characterised by a low level of malaria transmission and a high variability of climatic and environmental parameters, where a comeback or resurgence of malaria with a high risk of morbidity and mortality in all age groups is expected. For instance, recent studies conducted in western Kenya highlands have suggested an increase of malaria epidemics attributed to changes in land cover [5,6]. Similar observations are expected in the Sahel (southern edge of the Saharan desert) characterized by heterogeneous features including high inter-annual variability in rainfall [7]. The human populations of this rural area are mainly peasant farmers who depend on seasonal rainfall for agriculture and livestock rearing to generate food and financial gains. On the other hand, water and pastural availability determine human settlements with a direct impact on land cover and use.

While the impact of land use or agricultural practices on malaria vectors occurrence and distribution at macro-geographical levels has been addressed in many situations [8,9], there is very scarce data at micro-geographical levels. Recent findings indicate that small-scale differences within an area may have important consequences [10,11] on malaria epidemiology. Krefis et al. [12] showed a direct link of an increase or decrease of malaria risk depending on the types of land cover. For malaria vectors, few studies were carried out on the correlation between environmental parameters such as land cover or use and adults stages of malaria vectors contrary to the aquatic stages [13,14]. However, as adult vector abundance is positively associated with the availability of aquatic habitats [15,16], results on land cover changes on aquatic stages are usually extrapolated to estimate adult vector densities.

In the present study, we examined the influence of different landscape classes on malaria vector abundance and infection rates in a Sahelian area of Senegal characterised naturally by a low level of malaria transmission, high inter-annual variability of climate changes [17] and high morbidity rates during seasons with heavy rainfall [18]. This information is important for the understanding of environmental determinants of malaria transmission heterogeneity at a micro-geographical level to assess vector pressure, risk management and implementation of control strategies.

Methods

Description of the study area

The current study was conducted in 14 villages situated around the village of Barkedji (14°52′04 W-15°16′42 N) in the Sylvo-pastoral area of Senegal (Figure 1) from July to November 2009. The climate is typically Sahelian and is characterized by a semi-arid climate with a summer monsoon (the rainy season) that lasts from July to mid-October. The mean annual temperature is 28.8°C with the lowest value (24.4°C) recorded in January and the highest (35.5°C) in May. The study area is characterized by a complex and dense network of ponds located within the fossil Ferlo riverbed that are filled with water during the rainy season but which dry out during the rest of the year (Figure 1). It is characterized by the predominance of sandy-loam soils on which grows a grass cover dominated by shrubs represented mostly by thorny bushes. The population of this area is estimated at 14,200 inhabitants comprising of Fulani (85%), Wolof (12%), Moors and Serer (3%). Human activities are dominated by livestock rearing (mainly cattle, sheep, goats) and agriculture (mainly millet).

No specific permission was required for work in each of the selected villages. After explaining the purpose of this study, verbal consent was obtained from the village chief as well as from heads of households. Vector control measures used in the study area include personal protections and use of long-lasting insecticidal nets (LLINs) at community level.

Weather and environmental data collection

Climatic data were collected using weather stations (Campbell scientific BW200) installed near the villages of Barkedji, Keur Alpha, Keur Aliou and Keur Diallo (Figure 1).

The landscape class was chosen as environmental parameter. Landscape classes were defined using remote sensing and geospatial analyses from a SPOT 5 satellite image based on the description of the vegetation classes according to the combination of the FAO and CSA systems [19,20]. All 14 sampling sites were geo-referenced with a hand-held GPS receiver and each of them was classified to the corresponding landscape class. Four landscape classes were identified in the study area. Table 1 and Figure 1 present each of the 14 villages and the corresponding landscape type.

Mosquitoes sampling and processing

Daytime indoor resting mosquitoes were collected monthly within the same selected houses from all 14 villages by pyrethrum spray catches (PSC). Upon collection, *Anopheles* females were sorted and identified to species using the morphological key of Gillies and De Meillon [21]. For the known malaria vectors already described in the study area,

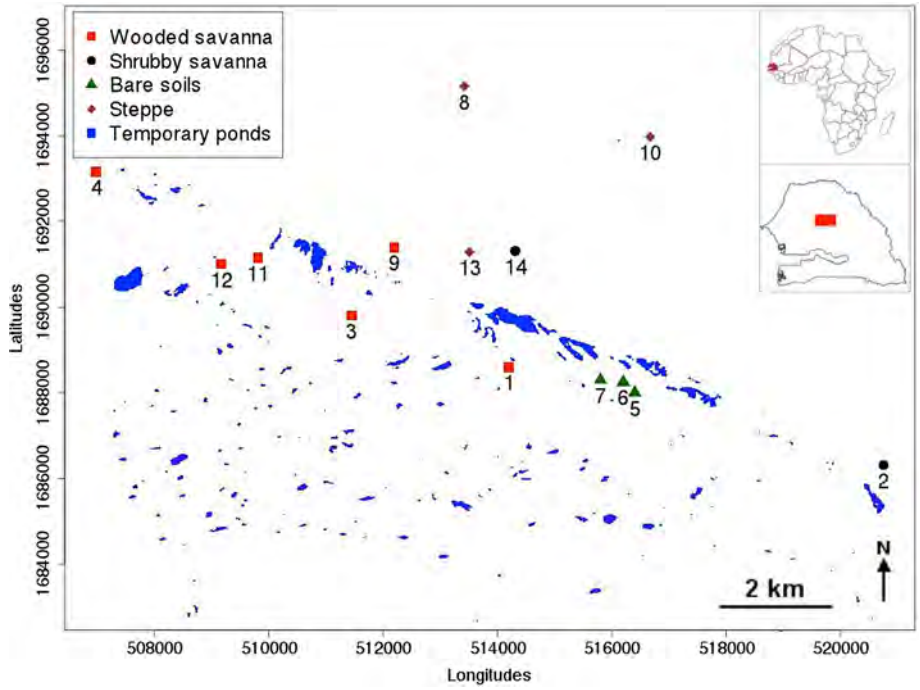

Figure 1 Localisation of the study sites. Numbers indicate the sites ID presented in Table 1. Data points are projected in the UTM zone 28 N. Weather stations were installed in Barkedji (ID:1), Keur Alpha (2), Keur Aliou (6) and Keur Diallo (10).

the physiological status was recorded, then all mosquitoes were stored individually in labelled vials containing silica gel for subsequent analyses. In the laboratory, the mosquitoes from the *Anopheles gambiae* complex were identified using the molecular method of Fanello et al. [22]. The heads and thoraces of all anopheline females were tested by ELISA for the detection of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) using the procedure of Wirtz et al. [23].

Table 1 Main characteristics of studied villages

Sites ID	Villages	Longitudes	Latitudes	Landscape classes
1	Barkedji	15°17′0″N	14°53′0″W	Wooded savanna
2	Keur Alpha	15°14′42″N	14°47′57″W	Shrubby savanna
3	Dague Nabe	15°17′04″N	14°52′96″W	Wooded savanna
4	Diabal	15°18′53″N	14°56′05″W	Wooded savanna
5	Keur Dadal	15°16′23″N	14°51′6″W	Bare soils
6	Keur Aliou	15°15′86″N	14°50′30″W	Bare soils
7	Keur Gallo	15°16′25″N	14°51′01″W	Bare soils
8	Keur Bandji	15°19′34″N	14°52′20″W	Steppe
9	Keur Bathiel	15°17′32″N	14°52′43″W	Wooded savanna
10	Keur Diallo	15°19′10″N	14°50′24″W	Steppe
11	Niakha	15°17′28″N	15°54′18″W	Wooded savanna
12	Niakha Ndiaybe	15°15′56″N	14°50′18″W	Wooded savanna
13	Keur Daha	15°17′31″N	14°52′17″W	Steppe
14	Wouro Thilli	15°17′31″N	14°51′36″W	Shrubby savanna

Data analysis

To study the association between landscape classes and entomological parameters (densities, infection rates), each of the 14 villages was classified to the corresponding landscape class. For analysis of the distribution between landscape classes', monthly anopheline females' densities were calculated as the number of specimens per room (SPR) and log transformed to normalize the distribution. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data and Levene's test for equality of variances. Subsequently, the differences between landscape classes, mean densities and collection months were analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer post-hoc tests. The circum-sporozoite protein infection rates (CSP-IR) was calculated as the proportion of females found to contain the CS protein. To study the associations between the temporal distribution of the vector densities and rainfall, mean relative humidity and temperature, the data from four villages representative of the 4 landcape classes were pooled and the associations evaluated by the Pearson correlation. All these analyses were performed using the R software (version 2.14.1).

Results

Mosquito collection

A total of 7652 *Anopheles* specimens belonging to 6 species were collected by PSC from the four landscape classes (Table 2). *An. gambiae* s.l. was the predominant species in all landscape classes. *An. rufipes* was also collected in all landscape classes but was more frequent in villages located in wooded and shrubby savanna. *An. funestus*, *An. pharoensis* and *An. domicola* were collected only in wooded savanna villages whereas *An. welcomei* was scarce and observed in bare soils villages.

Distribution pattern of *An. gambiae* complex within the study area

Overall, 863 specimens belonging to the *An. gambiae* complex were molecularly identified. Only *An. arabiensis* and *An. coluzzii* were present in the study area; *An. arabiensis* was the most predominant species with 81.8% (706/863) in the collection. No statistically significant difference was observed in the proportions of *An. arabiensis* in the different landscape classes ($\chi^2 = 4.45$, df = 3, p = 0.22). The relative proportions of the two species fluctuated based on the landscape class and month of collection.

An. arabiensis was the most abundant species in wooded and shrubby savanna villages at any time point during the months of collections and moreover, it was the only species collected at the end of the rainy season in November (Table 3 and Additional file 1). *An. coluzzii* on the other hand was absent or had very low proportions at the beginning of the rainy season in July (see Additional file 2). Its abundances increased gradually reaching maximum levels in August or September before it started to decline steadily. In shrubby savanna villages *An. coluzzii* was collected only in August and September with the respective frequencies of 42.9% and 11.1% (Table 3 and Additional file 2).

In bare soils and steppe landscapes, the two species were collected almost throughout the whole collection period (4 out of the 5 months collection period). The lowest frequencies of *An. arabiensis* were observed in August and September respectively (Table 3 and Additional file 2).

Monthly densities of *Anopheles gambiae* mosquitoes

Overall, 2695 rooms were sprayed during the surveys carried out resulting in the collection of 6886 *An. gambiae* mosquitoes. Overall, the mean number of specimens per room (SPR) was estimated to be 3.5. The means for the villages situated in the different landscapes (wooded savanna, shrubby savanna, bare soils and steppe) were 3 ± 0.45, 3.79 ± 2.32, 3.87 ± 0.84, 3.94 ± 1.25 respectively. These means were statistically comparable (F = 0.26, p = 0.85). However, statistically significant differences were observed between the monthly means

Table 2 Number and abundance (%) of anopheline species collected in each of the four landscape classes

Landscape classes/	*An. funestus*		*An. gambiae*		*An. pharoensis*		*An. rufipes*		*An. welcomei*		*An. domicola*	
villages	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Wooded savanna												
Barkedji	4	0.10	3670	90.82	5	0.12	362	8.96	0	0.00	0	0.00
Dague Nabe	1	0.24	404	95.28	0	0.00	18	4.25	0	0.00	1	0.24
Diabal	1	0.13	681	91.53	0	0.00	62	8.33	0	0.00	0	0.00
Keur Bathiel	0	0.00	42	85.71	0	0.00	7	14.29	0	0.00	0	0.00
Niakha	1	0.12	717	82.99	1	0.12	145	16.78	0	0.00	0	0.00
Niakha Ndiaybe	1	0.14	602	83.15	0	0.00	121	16.71	0	0.00	0	0.00
Shrubby savanna												
Keur Alpha	0	0.00	139	96.53	0	0.00	5	3.47	0	0.00	0	0.00
Wouro Thilli	0	0.00	28	90.32	0	0.00	3	9.68	0	0.00	0	0.00
Bare soils												
Keur Dadal	0	0.00	231	94.67	0	0.00	13	5.33	0	0.00	0	0.00
Keur Aliou	0	0.00	55	93.22	0	0.00	4	6.78	0	0.00	0	0.00
Keur Gallo	0	0.00	85	93.41	0	0.00	5	5.49	1	1.10	0	0.00
Steppe												
Keur Bandji	0	0.00	142	98.61	0	0.00	2	1.39	0	0.00	0	0.00
Keur Daha	0	0.00	46	97.87	0	0.00	1	2.13	0	0.00	0	0.00
Keur Diallo	0	0.00	44	95.65	0	0.00	2	4.35	0	0.00	0	0.00
Total	8	0.10	6886	89.99	6	0.08	750	9.80	1	0.01	1	0.01

N = number, % = percentage.

Table 3 Monthly variations of *An. arabiensis* mean proportions (±se) in each of the four landscape classes

Landscape classes	Study period				
	July	August	September	October	November
Wooded savanna	89.9 ± 3.4^{b}	59 ± 12.1^{a}	88.8 ± 5.1^{b}	98 ± 2^{b}	100^{b}
Shrubby savanna	100^{c}	57.1^{a}	88.7 ± 1.3^{b}	100^{c}	100^{c}
Bare soils	-	72.7 ± 13.8^{a}	92.5 ± 3.8^{a}	93.3 ± 6.7^{a}	90 ± 10^{a}
Steppe	$75 \pm 25^{a,b}$	$65.3 \pm 1.4^{a,b}$	53.3 ± 13.3^{a}	66.7 ± 33.3^{a}	100^{b}

For the different landscape classes, means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).
Comparisons were made between months for each of the four landscape classes. Standard errors not presented are null.

in wooded savanna and bare soils villages (Figure 2). Overall, the mean densities were low at the beginning of the surveys in July (beginning of rainy season) with a maximum of 1 SPR in all landscape classes. They increased steadily thereafter reaching a peak in September for shrubby savanna villages, bare soils and steppe whilst for wooded savanna villages the peak was observed in October (Figure 2).

Influence of climate parameters on *Anopheles* densities

This influence was studied in 4 sites representing each of the four landscape classes: Barkedji (wooded savanna), Keur Alpha (shrubby savanna), Keur Aliou (Bare soils) and Keur Diallo (Steppe). In each of these sites, the mean temperature and mean relative humidity showed similar variations whereas the rainfall was heterogeneous in terms of patterns, frequency and quantity. Rainfall peaked in September in Barkedji village and in the three other villages it peaked in August (Figure 3). The highest number of SPR was observed soon after the rainfall peaked either in October and September in Barkedji or September and August for the three other villages. A positive but not significant correlation was observed with rainfall (Pearson $r = 0.09$, $p = 0.71$) and humidity

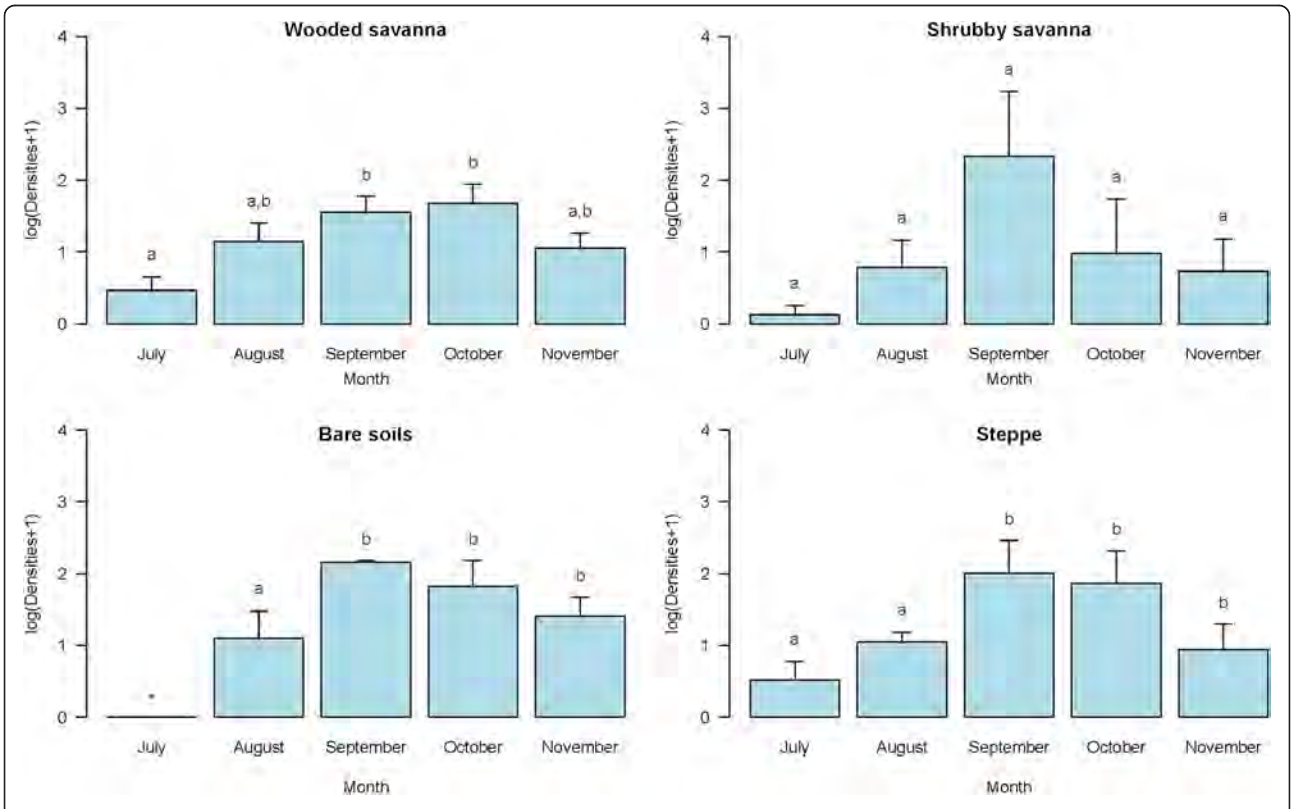

Figure 2 Temporal variations of the mean densities of *An. arabiensis* in each of the four landscape classes. For the different landscape classes, means with different letters are significantly different ($p < 0.05$). *no mosquito collected.

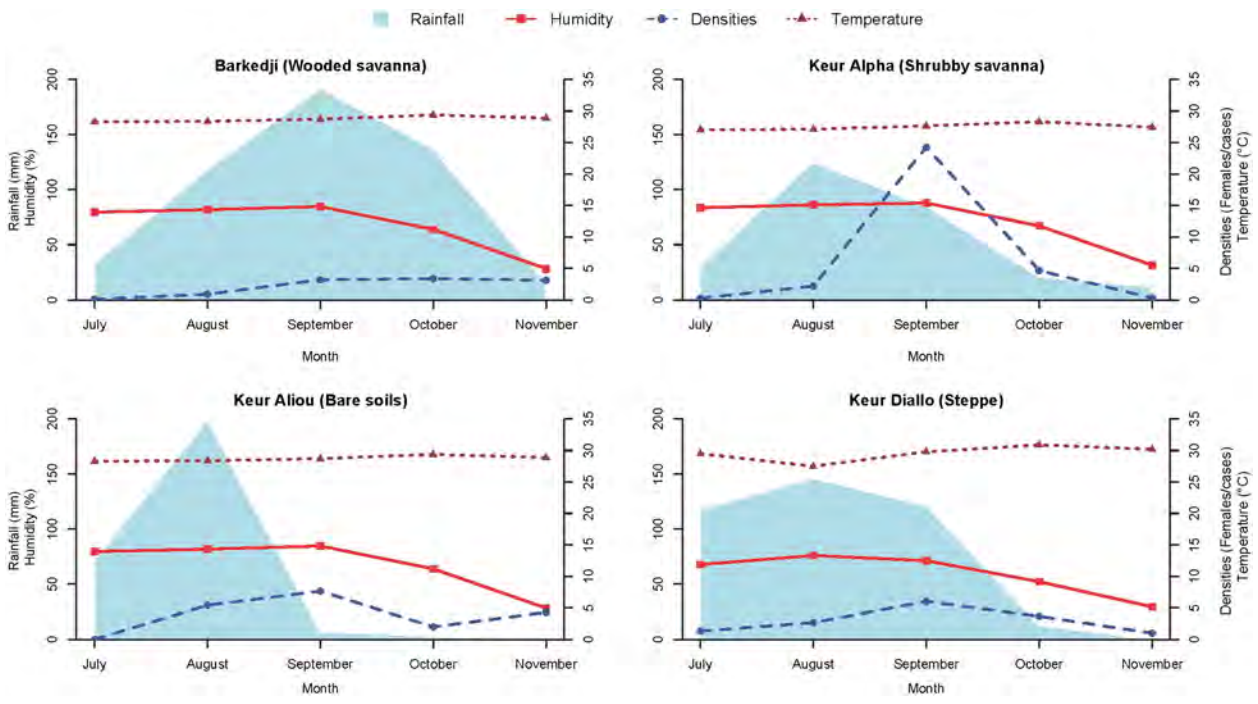

Figure 3 Variations of *An. arabiensis* densities in relation to rainfall, temperature and humidity in each of four villages representative of the four landscape classes.

(Pearson r = 0.25, p = 0.29) while a negative non-significant correlation was observed for temperature (Pearson r = –0.09, p = 0.68) (see Additional file 3).

Circumsporozoite infection rates

The head and thoraces of 3768 *An. gambiae* s.l. females were tested by ELISA for *Plasmodium falciparum* CS antigen detection (Table 4). No specimen collected from villages situated in shrubby savanna and steppe were CS positive. Overall 11 positive females were detected, 10 in villages situated in wooded savanna (6 collected in Barkedji in August, 2 in Niakha in September and 2 in Niakha Ndiaybe in September) and 1 in a village within bare soils (Keur Aliou in August). The mean infection rates were 0.34% in wooded savanna and 0.37% in bare soils, respectively. No statistically significant difference was observed between the four landscape classes ($\chi^2 = 0.84$, df = 3, p = 0.84). A similar result was observed between wooded savanna villages ($\chi^2 = 2.49$, df = 5, p = 0.78) whereas the infection rates were significantly different between bare soils villages ($\chi^2 = 13.94$, df = 2, p < 0.001).

Discussion

All the anopheline species collected during this study were already described in the area [24]. However, the list is not exhaustive since other known species in the area were not collected even though the study was conducted longitudinally. This is due primarily to the collection

Table 4 *An. arabiensis* mean infection rates calculated by enzyme-linked immunosorbent assay for *P. falciparum* in the different villages/lansdcape classes

Villages	Negative	Positive	Total	CSP-IR (%)	95% CI
Wooded savanna					
Barkedji	1705	6	1711	0.35	0.16-0.76
Dague Nabe	227	0	227	0	-
Diabal	301	0	301	0	-
Keur Bathiel	29	0	29	0	-
Niakha	606	2	608	0.33	0.09-1.19
Niakha Ndiaybe	367	2	369	0.54	0.15-1.95
Shrubby savanna					
Keur Alpha	110	0	110	0	-
Wouro Thilli	18	0	18	0	-
Bare soils					
Keur Dadal	195	0	195	0	-
Keur Aliou	17	1	18	5.55	0.28-25.76
Keur Gallo	55	0	55	0	-
Steppe					
Keur Bandji	80	0	80	0	-
Keur Daha	17	0	17	0	-
Keur Diallo	30	0	30	0	-
Total	3757	11	3768	0.29	0.16-0.52

CSP-IR = Circumsporozoite protein infection rate, CI = confidence interval based on a binomial distribution.

method used that may have targeted endophilic species closely associated with human environments.

An. arabiensis was the most common species during this study. *An. pharoensis* and *An. funestus,* also vectors of malaria in Senegal were present but at very low proportions. *An. pharoensis* was previously described in the area [25] whereas *An. funestus* was never observed during previous malaria vector studies conducted in the area [17,26]. The presence of *An. funestus* therefore confirms the comeback of this species in the Senegal River basin which was described in a recent study [27]. This species was first described in the Senegal River basin in the 1970s, but thereafter it disappeared following recurrent droughts only to appear again in 1999 in the low valley of the Senegal River [28]. Its presence in the current study area extends the re-colonization zone to the Ferlo area. This is perhaps due to the restoration and presence of its breeding sites that consist of natural/artificial permanent and semi-permanent water bodies with floating or emerging vegetation. This study area has characteristic favourable breeding sites of this nature constituting temporary pools covered with vegetation emerging from the middle to the end of the rainy season [29].

The presence of *An. funestus* was limited to wooded savanna villages only and at low proportions (0.01%). Therefore, its involvement in malaria transmission is presumed to be low. Like *An. arabiensis*, *An. rufipes* was also observed in all landscape types. Due to the relatively high proportions observed for *An. rufipes*, the determination of the role of this species in malaria transmission needs further investigation to incriminate it, as a recent study conducted in Burkina Faso has demonstrated its involvement in the transmission of human *Plasmodium* [30].

The variations observed in the proportions of the species of the *An. gambiae* complex in the four different landscape classes, could express different adaptive characteristics of these species. *An. arabiensis* was found to be the prevalent species in the whole study area. This observation is in agreement with the distribution of this species, which is located in dry to humid savannah areas [31]. Moreover, it is noteworthy that the highest proportions of this species were observed during the less humid months namely in July and November.

Despite the comparable mean densities observed in the four landscape classes, significant variations were observed when considering the collection months in villages located in wooded savanna and bare soils. Malaria transmission could be higher in these villages during September and October because the highest densities and infected mosquitoes with *P. falciparum* were observed in this period. Additional evidence comes from a recent study conducted in the study area on the spatio-temporal analysis of feeding behaviour [32], which showed that it was mainly during the rainy season that the blood meals taken from human were widespread and homogenously distributed in the study area. The anthropophilic rates were higher in September in villages situated in wooded savanna whereas in bare soils villages, the differences were less marked but the blood meals taken from humans were more uniformly distributed in September. The results of Lemasson et al. [17] is also an evidence to indicate maximal transmission during this period, as they showed that during two successive years, malaria transmission peaks were observed either in October or at the end of September. In shrubby savanna and steppe villages, the absence of infection as well as the seasonal homogeneous variations in densities could lead to a lower transmission in these villages in comparison to wooded savanna and bare soils villages. However, due to the relatively low number of villages involved (small sample size), these results should be confirmed by more intensive and longitudinal studies.

The study of the influence of climatic parameters on densities showed a non-significant positive correlation of rainfall regardless of the landscape class type. This observation is consistent with that of Bi et al. [33]. Indeed, *An. arabiensis* aquatic stages prefer to breed in small, shallow, temporary rain pools or stagnant bodies of water fully exposed to the sun [34]. In our study area, these types of breeding sites are predominant and rainfall-dependent as also observed elsewhere [35,36]. A positive but not significant correlation was also observed for humidity while a negative non-significant correlation was observed for temperature. These observations could be due to the relative uniformity of humidity and temperature in the 4 landscape classes. This is further sustained by the fact that, if we consider that water temperature influences the development of aquatic stages of *Anopheles* species [37], the uniformity of the temperature contributes to similar influences in the different landscape classes.

Conclusions

Thus, as environmental conditions are closely related to meteorological data, additional studies with a close follow-up of climatic parameters are needed to ascertain their relationship with entomological parameters. This is reinforced by the fact that climatic parameters can dramatically shift change in mosquito abundance, longevity and infection [38]. From the public health point of view, such information could be useful for human population settlements as well as for monitoring and modelling purposes generating early warning system for implementing interventions.

Additional files

Additional file 1: Variations of the proportions of *An. arabiensis* between villages belonging to the same landscape class. For the

different villages belonging to the same landscape class, means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Additional file 2: Monthly variations of *An. arabiensis* and *An. coluzzii* mean proportions in each of the four landscape classes.

Additional file 3: Correlation between *An. arabiensis* densities and climatic parameters.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
ID, YB and MD designed and supervised the study. ID, EMN, NDF, CT, EN, JAN and YB performed field and laboratory activities. ID, EMN, MD analyzed the data and drafted the manuscript. MD and ID revised the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments
We are grateful to Sadio Sow for his technical assistance and help during field investigations and the villagers for their cooperation and their active participation in this study. This study was funded by the EU project QWeCI (Quantifying Weather and Climate Impacts on health in developing countries; funded by the European Commission's Seventh Framework Research Programme under the grant agreement 243964) and the Fonds d'Impulsion de la Recherche Scientifique et Technologique (FIRST) du Ministère de la Recherche de la République du Sénégal.

Author details
[1]Unité d'entomologie médicale, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220 Dakar, Senegal. [2]Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Sénégal. [3]Université Gaston Berger, Saint-Louis, Sénégal. [4]Centre de Suivi Ecologique, Dakar, Sénégal.

Received: 5 August 2014 Accepted: 11 December 2014

References
1. Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA: **Changement climatique et maladies à transmission vectorielle: une analyse régionale.** *Bull OMS* 2000, **78:**1136–1147.
2. Bouma MJ, Sondorp HE, Van der Kaay HJ: **Health and climate change.** *Lancet* 1994, **343:**302.
3. Colwell RR, Epstein PR, Gubler D, Maynard N, McMichael AJ, Patz JA, Sack RB, Shope R: **Climate change and human health.** *Science* 1998, **279:**968–969.
4. Rogers DJ, Randolph SE, Snow RW, Hay SI: **Satellite imagery in the study and forecast of malaria.** *Nature* 2002, **415:**710–715.
5. Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML: **Land use change alters malaria transmission parameters by modifying temperature in a highland area of Uganda.** *Trop Med Int Health* 2000, **5:**263–274.
6. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY: **Effects of environmental change on emerging parasitic diseases.** *Int J Parasitol* 2000, **30:**1395–1405.
7. Lebel T, Diedhiou A, Laurent H: **Seasonal cycle and interannual variability of the Sahelian rainfall at hydrological scales.** *J Geophys Res* 2003, **108:**83–89.
8. Ijumba JN, Shenton FC, Clarke SE, Mosha FW, Lindsay SW: **Irrigated crop production is associated with less malaria than traditional agricultural practices in Tanzania.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96:**476–480.
9. Keiser J, de Castro MC, Maltese MF, Bos R, Tanner M, Singer BH, Utzinger J: **Effect of irrigation and large dams on the burden of malaria on a global and regional scale.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72:**392–406.
10. Mwangangi JM, Shililu J, Muturi EJ, Muriu S, Jacob B, Kabiru EW, Mbogo CM, Githure J, Novak RJ: **Anopheles larval abundance and diversity in three rice agro-village complexes Mwea irrigation scheme, central Kenya.** *Malar J* 2010, **9:**228.
11. Jacob BG, Muturi E, Halbig P, Mwangangi J, Wanjogu RK, Mpanga E, Funes J, Shililu J, Githure J, Regens JL, Novak RJ: **Environmental abundance of Anopheles (Diptera: Culicidae) larval habitats on land cover change sites in Karima Village, Mwea Rice Scheme, Kenya.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76:**73–80.
12. Krefis AC, Schwarz NG, Nkrumah B, Acquah S, Loag W, Oldeland J, Sarpong N, Adu-Sarkodie Y, Ranft U, May J: **Spatial analysis of land cover determinants of malaria incidence in the Ashanti Region.** *Ghana PLoS One* 2011, **6:**e17905.
13. Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Yan G: **Habitat characteristics of *Anopheles gambiae s.s.* larvae in a Kenyan highland.** *Med Vet Entomol* 2004, **18:**301–305.
14. Minakawa N, Munga S, Atieli F, Mushinzimana E, Zhou G, Githeko AK, Yan G: **Spatial distribution of anopheline larval habitats in western kenyan highlands: effects of land cover types and topography.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73:**157–165.
15. Fillinger U, Sonye G, Killeen GF, Knols BG, Becker N: **The practical importance of permanent and semipermanent habitats for controlling aquatic stages of *Anopheles gambiae* sensu lato mosquitoes: operational observations from a rural town in western Kenya.** *Trop Med Int Health* 2004, **9:**1274–1289.
16. Shililu J, Mbogo C, Ghebremeskel T, Githure J, Novak R: **Mosquito larval habitats in a semiarid ecosystem in Eritrea: impact of larval habitat management on *Anopheles arabiensis* population.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76:**103–110.
17. Lemasson JJ, Fontenille D, Lochouarn L, Dia I, Simard F, Ba K, Diop A, Diatta M, Molez JF: **Comparison of bahavior and vector competence of *A. gambiae* and *A. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a sahelian area of Senegal.** *J Med Entomol* 1997, **40:**396–403.
18. Molez JF, Diop A, Gaye O, Lemasson JJ, Fontenille D: **Morbidité palustre à Barkedji, village du Ferlo, en zone sahélienne du Sénégal.** *Bull Soc Path Ex* 2006, **99:**187–190.
19. FAO: *Africover, classification de l'occupation du sol.* RSC Series; 1997. 70, 80 pp.
20. Conseil Scientifique pour l'Afrique (CSA): *Phytogéographie (Yangambi).* Londres: CCTA; 1956:35.
21. Gillies MT, De Meillon B: **The Anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edition.** *Publ South Afr Ins Med Res* 1968, **54:**12–36.
22. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A: **Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP.** *Med Vet Entomol* 2002, **16:**461–464.
23. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG: **Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development.** *Bull WHO* 1987, **65:**39–45.
24. Traoré-Lamizana M, Fontenille D, Diallo M, Bâ Y, Zeller HG, Mondo M, Adam F, Thonon J, Maïga A: **Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of Rift Valley fever virus.** *J Med Entomol* 2001, **38:**480–492.
25. Traore-Lamizana M, Zeller HG, Mondo M, Hervy JP, Adam F, Digoutte JP: **Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central Senegal (Ferlo).** *J Med Entomol* 1994, **31:**934–938.
26. Dia I, Diallo D, Duchemin JB, Ba Y, Konate L, Costantini C, Diallo M: **Comparisons of human-landing catches and odor-baited entry traps for sampling malaria vectors in Senegal.** *J Med Entomol* 2005, **42:**104–109.
27. Dia I, Konate L, Samb B, Sarr JB, Diop A, Rogerie F, Faye M, Riveau G, Remoue F, Diallo M, Fontenille D: **Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin.** *Acta Trop* 2008, **105:**145–153.
28. Konate L, Diop A, Sy N, Faye MN, Deng Y, Izri A, Faye O, Mouchet J: **Comeback of *A. funestus* in Sahelian Senegal.** *Lancet* 2001, **358:**336.
29. Lacaux JP, Tourre YM, Vignolles C, Ndione JA, Lafaye M: **Classification of ponds from high-spatial resolution remote sensing: application to Rift Valley Fever epidemics in Senegal.** *J R Sensing Env* 2007, **106:**66–74.
30. Da DF, Diabate A, Mouline K, Lefèvre T, Awono-Ambene HP, Ouedraogo JB, Dabiré KR: **Anopheles rufipes remains a potential malaria vector after the first detection of infected specimens in 1960 in Burkina Faso.** *J Infect Dis Ther* 2013, **1:**1–3.
31. Coetzee M, Craig M, le Sueur D: **Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex.** *Parasitol Today* 2000, **16:**74–77.
32. el Ngom HM, Ndione JA, Ba Y, Konaté L, Faye O, Diallo M, Dia I: **Spatio-temporal analysis of host preferences and feeding patterns of malaria vectors in the sylvo-pastoral area of Senegal: impact of landscape classes.** *Parasit Vectors* 2013, **6:**332.
33. Bi P, Tong S, Donald K, Parton K, Ni J: **Climatic variables and transmission of malaria: a 12-year data analysis in Shuchen County.** *Chin Publ Health Rep* 2003, **118:**65.

34. Gimnig JE, Ombok M, Kamau L, Hawley WA: **Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya.** *J Med Entomol* 2001, **38:**282–288.
35. Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML: **Highland malaria in Uganda: prospective analysis of an epidemic associated with El Niño.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, **93:**480–487.
36. Koenraadt CJM, Githeko AK, Takken W: **The effects of rainfall and evapotranspiration on the temporal dynamics of *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in a Kenyan village.** *Acta Trop* 2004, **90:**141–153.
37. Lyimo EO, Takken W, Koella JC: **Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*.** *Entomol Exp Appl* 1992, **63:**265–271.
38. Bomblies A, Eltahir EA: **Assessment of the impact of climate shifts on malaria transmission in the Sahel.** *Ecohealth* 2009, **6:**426–437.

doi:10.1186/s12879-014-0711-0
Cite this article as: Ngom *et al.*: *Anopheles arabiensis* seasonal densities and infection rates in relation to landscape classes and climatic parameters in a Sahelian area of Senegal. *BMC Infectious Diseases* 2014 **14**:711.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE ED-SEV
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
THESE DE DOSTORAT
Spécialité : Entomologie

Prénoms et nom du candidat : El hadji NDIAYE

Titre : Biodiversité et rôle des moustiques dans les processus de maintien et d'émergence des arbovirus au Sénégal : exemple du virus de la fièvre de la vallée du Rift

Date et lieu de soutenance :

Jury :	**Président :**	**Cheikh Tidiane BA**	**Professeur, FST-UCAD**
	Membres :	**Jacques-André NDIONE**	**HDR, CSE, Dakar**
		Oubri Bassa GBATI	**Maître de Conférences Agrégé, EIESMV, Dakar**
		Roger Clément TINE	**Maître de Conférences Agrégé, FMPOS-UCAD**
		Ibrahima DIA	**HDR, IPD, Dakar**
		Mawlouth DIALLO	**Directeur de Recherche, IPD, Dakar**
		Ousmane FAYE	**Professeur, FST-UCAD**

Résumé

Le principal objectif de notre travail a été de rechercher dans la nature le virus de la fièvre de la vallée du rift (VFVR), de tester la capacité des moustiques ouest Africains à transmettre horizontalement et verticalement différents variants du virus mais également d'étudier l'impact de l'infection sur la longévité des vecteurs. La compétence vectorielle d'*Ae. vexans* et *Cx. poicilipes*, les deux espèces de moustiques les plus fréquemment associés au VFVR au Sénégal, et *Cx. quinquefasciatus*, une espèce très adapté à l'environnement domestique, a été évaluée pour trois souches de lignées ouest et Est africaine mais aussi avec la souche vaccinale MP_12. Les taux d'infection, de dissémination et de transmission ont été estimés à diverses périodes d'incubation (5, 10, 15 et 20 jours post exposition au repas infectieux) et après test de détection du virus par RT -PCR temps réel respectivement sur les corps, Pattes/ailes et salive des moustiques. La caractérisation génétique des 3 souches utilisées a été réalisée pour mieux comprendre les facteurs qui sous-tendent les variations de compétence observées. Au total de 420 *Ae. vexans*, 563 *Cx. quinquefasciatus* et 380 *Cx. poicilipes* ont été testés. Les trois espèces étaient sensibles à l'infection par la FVR et capables de disséminer toutes les souches de virus. Cependant, mais seule la lignée de l'Afrique de l'Est a été transmise. Les espèces du genre Culex ont été moins sensibles à l'infection que *Ae. vexans*. Comparé aux autres souches, des variations en amino acide des protéines NSs du segment M de la lignée d'Afrique de l'Est (SH 172805), pourrait expliquer les différences dans leur potentiel à être transmis. La capacité d'*Ae. vexans* à s'infecter, disséminer et transmettre la souche vaccinale MP-12 a également été démontrée sur 114 individus avec des taux d'infection compris entre 77,77 - 97,36% et des taux de transmission compris entre 5,88 - 25%. L'étude de l'impact de l'infection et de l'exposition au virus RVF a été réalisée sur des lots de moustiques suivis individuellement pour estimer leur longévité après exposition à un repas de sang infectieux. Les taux de survie ont été comparés pour chaque espèce entre un groupe de contrôle non exposé au virus et les moustiques exposés, infectés ou non infectés. Bien que des variations aient été observées, les différences n'ont pas été statistiquement significatives entre les différents groupes aussi bien chez *Ae. vexans* ($p \geq 0{,}153$), *Cx. quinquefasciatus* ($p \geq 0{,}09$), que chez *Cx. poicilipes* ($p \geq 0{,}63$). Le rôle des moustiques dans le processus de maintien du virus a été abordé expérimentalement par l'évaluation de la capacité d'*Ae. vexans* à transmettre verticalement. La progéniture (530 moustiques dont 170 mâles et 360 femelles) de femelles exposées au virus et ayant réalisé 3 cycles trophogoniques, a été testée par RT-PCR pour la présence de virus après différentes périodes d'incubation après leur émergence [J0 ; J5 ; J10 ; J15]. Le taux d'infection des parents femelles a été de 77,27 % (34/44). La transmission verticale n'a cependant pas été mise en évidence chez ces populations puisque aucun virus n'a été détecté dans la descendance des femelles infectées. Cette transmission verticale n'a pas également été mise en évidence chez les 120 individus F1 testés d'une deuxième expérience alors que 100% des parents étaient infectés au virus. En dehors de cette étude expérimentale sur les interactions virus - vecteurs, le virus FVR a également été recherché sur le terrain à Barkédji où un programme d'étude a été mis en place depuis 1990 suite à l'épidémie de FVR en 1987 en Mauritanie. Seule une souche du virus a été détectée après 2 années d'étude (2012-2013). En revanche la diversification des outils utilisés nous a permis de mettre en évidence la circulation de 11 virus dont un qui n'a jamais été décrit, 3 méconnus de la zone (Ndumbu, Acado, Sindbis) et 7 non isolés depuis 2003 (West Nile, Usutu, Sanar, Babanki, Bagaza, Barkedji, Yaounde).

Mots clés : Moustiques, biodiversité, infection orale, virus de la fièvre de la vallée du Rift, compétence vectorielle, Sénégal

Summary

The main objective of our work was to search in the wild virus Rift Valley Fever (RVFV), to test the ability of mosquitoes to transmit West Africans horizontally and vertically different variants of the virus but also to study the impact of infection on the longevity of vectors. Vector competence of *Ae. vexans* and *Cx. poicilipes*, the two species most commonly associated with mosquito RVFV Senegal, and *Cx. quinquefasciatus*, a species very suitable for the domestic environment was evaluated for three West African lines of stem and East but also with the vaccine strain MP_12. The rates of infection, dissemination and transmission were estimated at various incubation periods (5, 10, 15 and 20 days post-exposure to the infectious meal) and after detection test virus by RT -PCR respectively in real time the body, legs / wings and saliva of mosquitoes. Genetic characterization of 3 strains used was conducted to better understand the factors underlying the changes in skill observed. A total of 420 *Ae. vexans*, 563 *Cx. quinquefasciatus* and 380 *Cx. poicilipes* were tested. The three species were susceptible to infection by the RVF and able to spread all virus strains. However, but only the lineage of East Africa was transmitted. *Culex* species were less susceptible to infection than *Ae. vexans*. Compared to other strains, variations in amino acid protein NSs of M segment of the East African line (SH 172805), could explain the differences in their potential to be transmitted. The ability of *Ae. vexans* to fester, disseminate and transmit the MP-12 vaccine strain has also been demonstrated on 114 individuals with infection rates of between 77.77 to 97.36% and transmission rate of between 5.88 to 25 %. The study of the impact of the infection and exposure to RVF virus was performed on mosquito batches individually monitored to estimate their longevity after exposure to infective blood meal. The survival rates were compared to each case between an unexposed control group exposed to the virus and the mosquito, infected or uninfected. Although variations were observed, the differences were not statistically significant among the various groups as well in *Ae. vexans* ($p \geq 0.153$), *Cx. quinquefasciatus* ($p \geq 0.09$) than *Cx. poicilipes* ($p \geq 0.63$). The role of mosquitoes in the virus maintenance process has been experimentally addressed by assessing the ability of *Ae. vexans* to transmit vertically. Progeny (530 mosquitoes which 170 males and 360 females) females exposed to the virus and having realized trophogoniques 3 cycles was tested by RT-PCR for the presence of virus after different incubation periods after emergence [J0; J5; J10; J15]. The rate of female relatives of infection was 77.27% (34/44). Vertical transmission, however, has not been demonstrated in this population since no virus in the offspring of infected females. This vertical transmission has not also been demonstrated in the 120 F1 individuals tested a second experiment, so that 100% of the parents were infected with the virus. Outside this experimental study on viruses interactions - vectors RVF virus was also sought on the ground Barkedji where a study program has been in place since 1990 following the outbreak of RVF in Mauritania in 1987. Only one strain of the virus was detected after two years of study (2012-2013). However diversification tools allowed us to highlight the flow of 11 viruses including one that has never been described, three unknown zone (Ndumbu, Acado, Sindbis) and 7 uninsulated since 2003 (West Nile , Usutu, Sanar, Babanki, Bagaza Barkedji, Yaounde).

Keywords: Mosquitoes, biodiversity, oral infection, fever virus, Rift Valley, vector competence, Senegal